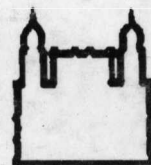




UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

TESE DE DOUTORADO

**EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DO CICLO
CELULAR E DE MOLÉCULAS DE ADESÃO
NA CARCINOGENESE CERVICAL**

CONCEIÇÃO MARIA PASSOS DE QUEIROZ

**Salvador - Bahia - Brasil
2003**



001712

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia

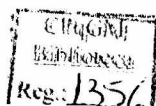
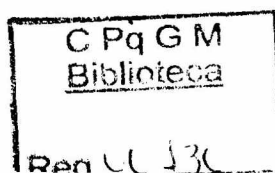
**EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DO CICLO CELULAR E DE
MOLÉCULAS DE ADESÃO NA CARCINOGENESE
CERVICAL**

CONCEIÇÃO MARIA PASSOS DE QUEIROZ

Orientador : Prof. Luiz Antônio Rodrigues de Freitas

Tese apresentada ao
Curso de Pós-Graduação
em Patologia para
obtenção de grau de
Doutor em Patologia
Humana.

**Salvador - Bahia - Brasil
2003**



Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do CPqGM / FIOCRUZ
Salvador - Bahia.

Q3e Queiroz, Conceição Maria Passos de
Expressão de proteínas do ciclo celular e de moléculas de
adesão da carcinogênese cervical/ Conceição Maria Passos de
Queiroz. _ Salvador: Faculdade de Medicina da Universidade
Federal da Bahia / Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz,
Fundação Oswaldo Cruz, 2003.
000f. : il. tab.

Tese (Doutorado em Patologia)– Centro de Pesquisas
Gonçalo Moniz / Universidade Federal da Bahia, 2003.

1. Cancer 2. Neoplasias do Colo Uterino. 3.
Imunoistoquímica.
4. HPV. I. Título.

CDU 616-006.6:618.146

À Miguel, Manuela, Eduardo e
meus pais, Vicente e Yvone,
pelo apoio, compreensão e amor.

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho foi possível graças à colaboração de diversos profissionais eficientes, sempre prontos a ajudar. Seria impossível externar meus agradecimentos nominalmente a todos eles, sem incorrer na possibilidade de esquecer de alguns. Enumero apenas aqueles que tiveram envolvimento direto na execução desta Tese, para os quais desejo expressar minha mais profunda gratidão:

Prof. Luiz Antônio Rodrigues de Freitas, pela orientação e pelo incentivo de fazer este curso.

Dra. Tânia Maria Correia Silva, pela valiosa ajuda na padronização da imunistoquímica e pelo estímulo constante.

Dra. Tatiana Cheto de Queiroz, pela inestimável ajuda na realização da imunistoquímica.

Dra. Luiza Lina Villa, pela análise criteriosa das PCR para DNA-HPV no Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer (SP) e pela acolhida carinhosa naquele Laboratório.

Sra. Maria Cecília Costa, em especial e demais técnicos do Instituto Ludwig, pela realização das PCR para DNA-HPV.

Dr Eduardo Studart, pela ajuda na interpretação dos exames histopatológicos.

Dr. Venâncio Avancini Alves, que gentilmente ajudou na realização da imunoistoquímica com p16^{INK4a}.

Dras. Ana Gabriela Travassos, Carla Cristiane Pinheiro, Edith Chastinet, Fábila Silene, Mônica Pazzeli e Patrícia Almeida Silva pela realização dos questionários, atendimento e assistência cuidadosa às pacientes da UDAI.

Srta. Michelle Borba Lacerda pelo auxílio precioso na digitação deste manuscrito.

Sra Adriana Freitas Abbehusen pela paciência na edição das imagens.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ-CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ por ter possibilitado realizar este Curso, em especial aos professores, responsáveis pelo alto nível deste Doutorado, pela dedicação e interesse. Aos funcionários, Rosália Meire Oliveira da Silva, um pouco mãe de todos nós, Iumara Oliveira Evangelista, sempre meiga e solícita, Ana Maria Fiscina Vaz Sampaio, pela ajuda na normalização desta tese e referências bibliográficas, Adelvany de Araújo pela busca constante dos artigos.

CICAN, na pessoa da sua Diretora, Dra. Sônia Sampaio e através do seu Comitê de Ética, que permitiu a realização de parte deste estudo nas dependências daquele Centro e em especial, Dra Carla Kruschewsky Sarno pela realização das Cirurgias de Alta Frequência.

MTM (Molecular tools in medicine) Laboratories (Heidelberg, Alemanha), na pessoa

do Dr. Markus Trunk-Gehmacher, pela doação do anticorpo monoclonal p16^{INK4a}, parte essencial deste trabalho.

Departamento de Ginecologia, Obstetrícia e Reprodução Humana-UFBA, ao qual pertenço, pelo apoio e pela liberação das minhas atividades nos últimos três meses para conclusão deste trabalho.

Laboratório de Estatística, do Instituto de Matemática da UFBA, pela ajuda inestimável nos testes estatísticos, através dos alunos José Bouzas Araújo Filho, André Luís Santiago Maia e Antônio Carlos Braga Júnior, sob a orientação da Profa. Rosana Castro.

Centro de Documentação do CREMEB (CEDOC), pelo empenho, dedicação e agilidade de suas funcionárias Sônia Maria Ferreira da Silva e Rita de Cássia Ferreira da Silva, em atender às minhas solicitações de artigos.

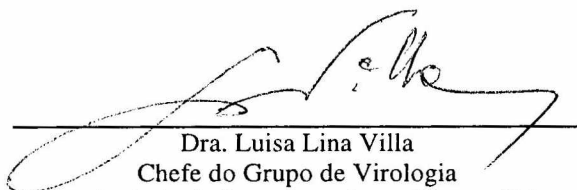
Agradeço em especial à generosidade das pacientes que participaram deste estudo, algumas não mais entre nós, que em meio a sofrimentos físicos e emocionais concordaram em colaborar conosco.

*Expressão de Proteínas do Ciclo Celular e de Moléculas de Adesão na
Carcinogênese Cervical*

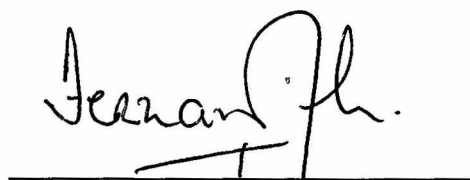
CONCEIÇÃO MARIA PASSOS DE QUEIROZ

FOLHA DE APROVAÇÃO


COMISSÃO EXAMINADORA



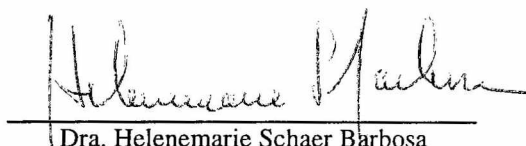
Dra. Luisa Lina Villa
Chefe do Grupo de Virologia
Inst Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer (SP)



Dr. Fernando Augusto Soares
Diretor – Depto. Anat. Patológica
CTPqHC – A C Camargo (SP)



Dra. Olívia Lúcia Nunes Costa
Professora Adjunta
UFBA



Dra. Helenemarie Schaer Barbosa
Professora Adjunta
FAMED - UFBA



Dr. Luiz Antônio Rodrigues de Freitas
Pesquisador Titular
CPqGM - FIOCRUZ

SUMÁRIO

| | |
|--|--------------|
| AGRADECIMENTOS | V |
| SUMÁRIO | VIII |
| LISTA DAS FIGURAS | X |
| LISTA DE TABELAS..... | XI |
| LISTA DOS GRÁFICOS..... | XIV |
| LISTA DE ABREVIATURAS | XV |
| RESUMO | XVII |
| SUMMARY | XVIII |
| INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 1.1. CLASSIFICAÇÃO E ESTRUTURA GENÔMICA DO HPV | 1 |
| 1.2. EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO PELO HPV | 4 |
| 1.3. HPV e co-fatores na carcinogênese cervical | 5 |
| 1.4. Patogênese da infecção pelo HPV | 7 |
| JUSTIFIATIVAS..... | 13 |
| 2. OBJETIVOS | 18 |
| 2.1 Geral..... | 18 |
| 2.2 Específicos | 18 |
| 3 CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS..... | 19 |
| 3.1 Perfil sócio-demográfico E CLÍNICO..... | 199 |
| 3.1.1 Características sócio-demográficas..... | 199 |
| 3.1.2.História Ginecológica e Obstétrica..... | 20. |
| 3.2 Amplificação enzimática do DNA-HPV através da reação em cadeia da polimerase (PCR) (ver anexo VI)..... | 21 |
| 3.3. Exame histopatológico do colo uterino..... | 22 |

| | |
|---|------------|
| 3.4. Imunoistoquímica | 22 |
| 3.5. Positividade para os anticorpos monoclonais..... | 23 |
| 3.5.1. Reação para p16 ^{INK4a} | 23 |
| 3.5.2. Reação para Ciclina D1 | 25 |
| 3.5.3. Reação para p53..... | 25 |
| 3.5.4. Reação para Ki67 | 27 |
| 3.5.5. Reação para CD44v5 e CD44v6..... | 27 |
| 3.6. Análises estatísticas | 32 |
| 3.7. COMITÊ DE ÉTICA | 33 |
| 4 RESULTADOS | 34 |
| 4.1. Exame histopatológico..... | 34 |
| 4.2. PCR para HPV..... | 34 |
| 4.3 AVALIAÇÃO DA IMUNOISTOQUÍMICA | 35 |
| 4.3.1. Resultado da Imunoistoquímica p16 ^{INK4a} | 35 |
| 4.3.2 Ciclina D1..... | 41 |
| 4.3.3.p53..... | 42 |
| 4.3.4.Ki67..... | 44 |
| 4.3.5.Comparação entre p16 ^{INK4a} , ciclina D1, p53 e Ki67..... | 45 |
| 4.3.6.Moléculas de adesão | 52 |
| 4.3.7. Painel para exame imunoistoquímico de lesões pré-cancerosas e câncer do colo uterino: p16 ^{INK4a} , Ki67 e CD44v6..... | 58 |
| 5 DISCUSSÃO..... | 65 |
| 6. CONCLUSÕES..... | 84 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 87 |
| 8. ANEXOS..... | 107 |

LISTA DAS FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura I HPV-16. Mapa genômico (SHAH & HOWLEY,1990) Organização do genoma (HOWLEY,1990, modificado)..... | 2 |
| Figura II. HPV, fatores de risco e co-fatores na carcinogênese cervical (modificado de SOUTHERN & HERRIGTON, 1998b) | 5 |
| Figura 1. Expressão da proteína p16 ^{INK4a} | 25 |
| Figura 2. Reação para ciclina D1 | 25 |
| Figura 3. Reação para p53. | 29 |
| Figura 4. Reação para Ki67..... | 31 |
| Figura 5. Padrão de reação para CD44v5 e CD44v6..... | 31 |
| Figura 6 Expressão das proteínas do ciclo celular | 47 |
| Figura 7 Aplicação do modelo de regressão logística binária..... | 62 |
| Figura 8. Aplicação do modelo de regressão logística binária..... | 64 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|--|----|
| Quadro 1. Frequência de células positivas para p16 ^{INK4a} | 22 |
| Quadro 2. Intensidade da reação para p16 ^{INK4a} | 23 |
| Quadro 3. Padrão de reação celular para p16 ^{INK4a} | 23 |
| Quadro 4. Positividade para p16 ^{INK4a} no epitélio escamoso presente na amostra..... | 24 |
| Quadro 5. Escores das médias dos parâmetros para p ^{16INK4a} | 24 |
| Quadro 6. Positividade para p16 ^{INK4a} | 24 |
| Quadro 7. Padrão de reação para Ciclina D1 | 25 |
| Quadro 8. Reação para p53 | 25 |
| Quadro 9. Reação para Ki67 | 27 |
| Quadro 10. Padrão da reação para CD44v5 e CD44v6 | 28 |
| Quadro 11. Intensidade da reação para CD44v5 e CD44v6 | 28 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Características Sócio-demográficas. | 20 |
| Tabela 2. Características Ginecológicas e Obstétricas | 21 |
| Tabela 3. Distribuição dos casos de acordo com os resultado histológico, HIV/HPV. | 34 |
| Tabela 4. Distribuição do número de tipos de HPV entre pacientes HIV positivas e negativas de acordo com o diagnóstico histológico..... | 35 |
| Tabela 5. Distribuição das pacientes quanto ao diagnóstico histológico e frequência de células positivas para p16 ^{INK4a} | 36 |
| Tabela 6. Distribuição das pacientes quanto ao grupo histológico e intensidade da reação para moléculas p16 ^{INK4a} | 37 |
| Tabela 7. Distribuição das pacientes quanto ao grupo histológico e padrão de reação celular para moléculas p16 ^{INK4a} | 38 |
| Tabela 8. Porcentagem de acerto dos parâmetros, frequência de células positivas, intensidade da reação e padrão de reação para p16 ^{INK4a} e a média entre eles, segundo o grau histológico..... | 39 |
| Tabela 9. Distribuição das pacientes quanto ao grupo histológico e a positividade para p16 ^{INK4a} | 40 |
| Tabela 10. Distribuição das pacientes quanto ao número de tipos de HPV e positividade para p16 ^{INK4a} | 41 |
| Tabela 11. Distribuição das pacientes quanto ao diagnóstico histológico e padrão de expressão de ciclina D1..... | 42 |
| Tabela 12. Distribuição das pacientes quanto ao diagnóstico histológico e expressão da p53..... | 43 |
| Tabela 13. Distribuição das pacientes quanto ao grupo histológico e Ki67..... | 44 |
| Tabela 14. Positividade para marcadores p16 ^{INK4a} , ciclina D1, p53 e Ki67 | 45 |

| | |
|--|----|
| Tabela 15. Contribuição acumulada dos marcadores em relação ao grau histológico. | 49 |
| Tabela 16. Correlações de Spearman entre os marcadores p16 ^{INK4a} , Ciclina D1, p53 e Ki67..... | 50 |
| Tabela 17. Poder preditivo de cada um dos marcadores segundo o grau histológico . | 50 |
| Tabela 18. Padrão de reação para CD44v5 em relação ao diagnóstico histológico.... | 52 |
| Tabela 19. Padrão de reação para CD44v6 em relação ao diagnóstico histológico.... | 53 |
| Tabela 20. Intensidade da reação para CD44v5 em relação aodiagnósticohistológico | 54 |
| Tabela 21. Intensidade da reação para CD44v6 em relação aodiagnósticohistológico | 55 |
| Tabela 22. Porcentagem de acerto dos marcadores, Intensidade da CD44v6 e CD44v5, Padrão da CD44v6 e CD44v5 e suas médias segundo o grau histológico..... | 57 |
| Tabela 23. Combinações dos resultados da expressão dos marcadores observadas na amostra estudada..... | 59 |

LISTA DOS GRÁFICOS

| | |
|---|----|
| Gráfico 1. Frequência de células positivas para p16 ^{INK4a} segundo diagnóstico histológico. | 36 |
| Gráfico 2. Distribuição da intensidade da reação de p16 ^{INK4a} segundo diagnóstico histológico. | 37 |
| Gráfico 3. Distribuição do padrão de coloração celular de p16 ^{INK4a} segundo diagnóstico histológico. | 38 |
| Gráfico 4. Distribuição de p16 ^{INK4a} (média) segundo diagnóstico histológico. | 40 |
| Gráfico 5. Distribuição de Ciclina D1 segundo diagnóstico histológico. | 42 |
| Gráfico 6. Distribuição de p53 segundo diagnóstico histológico. | 43 |
| Gráfico 7. Distribuição de Ki67 segundo diagnóstico histológico. | 44 |
| Gráfico 8. Distribuição da positividade para os marcadores. | 45 |
| Gráfico 9. Relação entre o grau histológico e a imunopositividades para p16 ^{INK4a} , Ciclina D1, p53 e Ki67. | 48 |
| Gráfico 10. Relação entre a positividade HPV e expressão de p16 ^{INK4a} , Ciclina D1, p53 e Ki67. | 51 |
| Gráfico 11. Distribuição do padrão de reação de CD44v5 segundo diagnóstico histológico. | 52 |
| Gráfico 12. Distribuição do padrão de reação de CD44v6 segundo diagnóstico histológico. | 53 |
| Gráfico 13. Distribuição da intensidade da reação de CD44v5 segundo diagnóstico histológico. | 55 |
| Gráfico 14. Distribuição da intensidade da reação de CD44v6 segundo diagnóstico histológico. | 56 |

LISTA DE ABREVIATURAS

- ACI:** anticoncepcionais injetáveis
- ACO:** anticoncepcionais orais
- AIDS:** síndrome da imunodeficiência adquirida
- CAF:** cirurgia de alta frequência
- CC:** cervicite crônica
- CDC:** Centers for Diseases Control and Prevention
- CDK:** cinases dependentes de ciclinas
- CDKI:** inibidor das cinases dependentes de ciclinas
- E2F:** Fator de transcrição de crescimento epitelial 2
- HIV:** vírus da imunodeficiência humana
- HPV:** papiloma vírus humano
- JEC:** junção escamo-colunar
- KW :** Teste de Kruskal-Wallis
- LCR:** região longa de controle
- LIE-AG:** lesão intra-epitelial de alto grau
- LIE-BG:** lesão intra-epitelial de baixo grau
- LT:** ligadura tubária
- ME:** metaplasia escamosa
- MW:** Teste de Mann-Whitney
- NIC:** neoplasia intraepitelial cervical
- ORFs :** “open reading frames”
- pb:** pares de base
- PCR:** reação em cadeia da polimerase

pRb: proteína retinoblastoma

PV: papiloma vírus

SNR: região curta não codificadora

TW : Teste de Wilcoxon

ZT: zona de transformação

ZTA: zona de transformação anormal

RESUMO

EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DO CICLO CELULAR E DE MOLÉCULAS DE ADESÃO NA CARCINOGENESE CERVICAL. CONCEIÇÃO MARIA PASSOS DE QUEIROZ.

Introdução. O HPV desempenha papel preponderante no desenvolvimento do câncer cervical uterino, sendo necessários outros co-fatores, como o HIV. O potencial oncogênico do HPV parece refletir a capacidade dos oncogenes virais, E6 e E7 de interferir no ciclo celular, através da degradação da p53 e da inativação funcional da pRb, resultando na redução da ciclina D1 e aumento da expressão da p16^{INK4a} nas NICs. Nas NICs e carcinoma invasivo da cérvix ocorre alterações na expressão das variantes da CD44. O exame histopatológico é considerado o *gold standard* para o diagnóstico destas lesões, entretanto, existe significativa variação intra e inter observadores. **Objetivo.** Avaliar comparativamente a expressão das proteínas do ciclo celular p16^{INK4a}, ciclina D1, p53 e Ki67 e das moléculas de adesão CD44v5 e CD44v6 nas diversas etapas da carcinogênese cervical, correlacionando o padrão de expressão destas proteínas com a infecção pelo HPV. **Casuística e métodos.** Estudo imunoistoquímico com mAb p16^{INK4a}, ciclina D1, p53, Ki67, CD44v5 e CD44v6 em 60 biópsias do colo uterino de pacientes com diagnóstico negativo para neoplasia (11), NIC1 (15), NIC2 (10), NIC3 (15) e carcinoma invasivo (9). Vinte foram HIV positivas e 46 foram HPV positivas. Avaliaram-se intensidades e padrões de expressão destes marcadores. **Resultados.** Existe correlação entre a expressão p16^{INK4a}, Ki67, ciclina D1 e p53 e o diagnóstico histológico, sendo que os dois primeiros marcadores têm associação mais significativa que a ciclina D1 e p53. Observamos redução da expressão de CD44v5 e CD44v6, particularmente nas NIC 3 e carcinoma e alteração da expressão destas moléculas durante a progressão da carcinogênese cervical. Não encontramos diferença na expressão de qualquer marcador nas amostras de pacientes HIV positivas e negativas em relação ao *status* da infecção pelo HPV. Após estudo da expressão destes marcadores, sugerimos um painel constituído de p16^{INK4a}, Ki67 e CD44v6, visando prever a evolução das NICs. **Conclusões.** A reação positiva para Ki67 é importante indicador de lesão de alto grau, mas menos precisa para lesões de baixo grau. A p16^{INK4a} discrimina os casos HPV negativos ou infectados pelo HPV de baixo risco, daqueles infectados pelo HPV de alto risco oncogênico em que já ocorreu transformação, permitindo identificar lesões cervicais de baixo grau com risco aumentado de progredir para lesões pré-cancerosas de alto grau ou câncer invasivo. A CD44v6 é útil como marcador de risco de progressão em lesões intra-epiteliais. Este painel de anticorpos monoclonais poderá ser empregado para melhor caracterização dos exames histopatológicos cervicais. Além de ajudar a reduzir a subjetividade de interpretação dos patologistas, particularmente nas lesões de baixo grau.

Palavras Chaves: Câncer. Neoplasias do Colo Uterino. Imunoistoquímica. HIV. HPV.

SUMMARY

EXPRESSION OF THE PROTEIN CYCLE AND ADHESION MOLECULES IN THE CERVICAL CARCINOGENESIS. **CONCEIÇÃO MARIA PASSOS DE QUEIROZ**. HPV has a central role in cervix cancer. Other co-factors like HIV may also take part. CIN may present spontaneous regression, however there is a lack of markers that can foretell its evolution. Alterations in the expressions of cell cycle proteins, p16^{INK4a}, cyclin D1, p53 and Ki67 and CD44 variants have been described in CIN and cervical cancer. Objectives: Evaluate the meanings of these biological markers in cervical carcinogenesis and its relations with histologic diagnosis, and infection with HPV. Immunohistochemistry assay with mAb, in 60 biopsies of the uterine cervix with negative diagnosis for neoplasia (11), CIN 1 (15), CIN 2 (10), CIN 3 (15) and invasive carcinoma. (9). 47 patients were HPV positive and 13 were HPV negative. Expression patterns and intensity were evaluated for each antibody. **Results:** There is an association between p16^{INK4a}, Ki67, p53 and cyclin D1 expression and histologic diagnosis. The two former markers had a better performance than cyclin D1 and p53. We observed a reduction in the expression of CD44v5 and CD44v6, particularly in CIN 3 and carcinoma, as well as an alteration in the expression pattern of these molecules during cervical carcinogenesis. This was more evident in CIN 2 and CIN 3. We did not find any difference in the expression of any marker in HPV patients positive or negative. After assaying the expression of these markers, we selected a panel composed of p16^{INK4a}, Ki67 and CD44v6, whose expression has a complementary role. **Conclusion:** Positive reaction for Ki67 is an important indicator for high-grade lesions, but less trustworthy for low-grade lesions. p16^{INK4a} differentiates the HPV negative or low-risk HPV infected cases from those infected with high oncogenic-risk HPV in which oncogenesis transformation has already occurred. This allows for the identification of low-grade cervical lesions with increased risk of progressing to high grade pre-cancerous lesions or invasive cancer. CD44v6 is useful as a marker for progressive risk in high-grade intra-epithelial lesions. This monoclonal antibody panel may be used in cervical biopsies. We suggest the use of a table designed from the cases studied using this panel, through the combination of these three markers using binary logistic regression, to estimate the chance of a subject having a certain cervical lesion. Besides that, it may help reduce the interpretation subjectivity of the pathologists, particularly in the initial lesions.

Key words: Cancer. Uterine Cervix. Neoplasia. Immunohistochemistry. HPV.

INTRODUÇÃO

O carcinoma de células escamosas do colo uterino é a segunda causa de morte por câncer em mulheres no mundo (BOSCH et al., 1995), e a primeira em países em desenvolvimento (PARKIN et al., 1993). Apesar desta neoplasia ser prevenível e curável, principalmente nos estágios iniciais, mais de 234.000 mulheres irão morrer desta doença anualmente devido a vários fatores, entre os quais a falha na detecção das lesões pré-malignas, através de programas de *screening* citológico cervical (MILLER et al., 2000; SYRJÄNEN & SYRJÄNEN, 2000) e aos resultados falsos-negativos devido às diferenças de interpretação histológica (ROBERTSON et al., 1989; DE VET et al., 1990).

O câncer cervical de células escamosas se desenvolve a partir de lesões pré-cancerosas bem definidas, com potencial para progredir para doença invasiva se não forem detectadas e tratadas precocemente. Existem evidências epidemiológicas de que a infecção persistente, com alta carga viral por tipos oncogênicos do papiloma vírus humano (HPV) desempenha papel preponderante no desenvolvimento do câncer do colo uterino (HO et al., 1995), sendo este vírus detectado em quase todas as lesões pré-neoplásicas e neoplásicas cervicais (WALBOOMERS et al., 1999).

1.1. CLASSIFICAÇÃO E ESTRUTURA GENÔMICA DO HPV

Os papiloma vírus (PV) são membros da família Papoviridae, que também inclui o vírus polioma. São vírus pequenos não envelopados medindo 45-55nm de diâmetro e com genoma de aproximadamente 7200-8000 pares de base (pb). Possuem capsídeo icosaédrico composto de 72 capsômeros, envolvendo DNA

genômico circular de fita dupla (PFISTER & FUCHS, 1994) (Figura I). São epiteliotrópicos, afetando predominantemente pele e mucosas, produzindo proliferações epiteliais características no sítio de infecção. São espécies, e quase sempre tecido e sítio específicos, sendo cada tipo associado a processos histopatológicos distintos. A dependência da diferenciação e do tecido infectado parece ser mais ditada pela transcrição viral do que pela replicação (DESAINTEs et al., 1997).

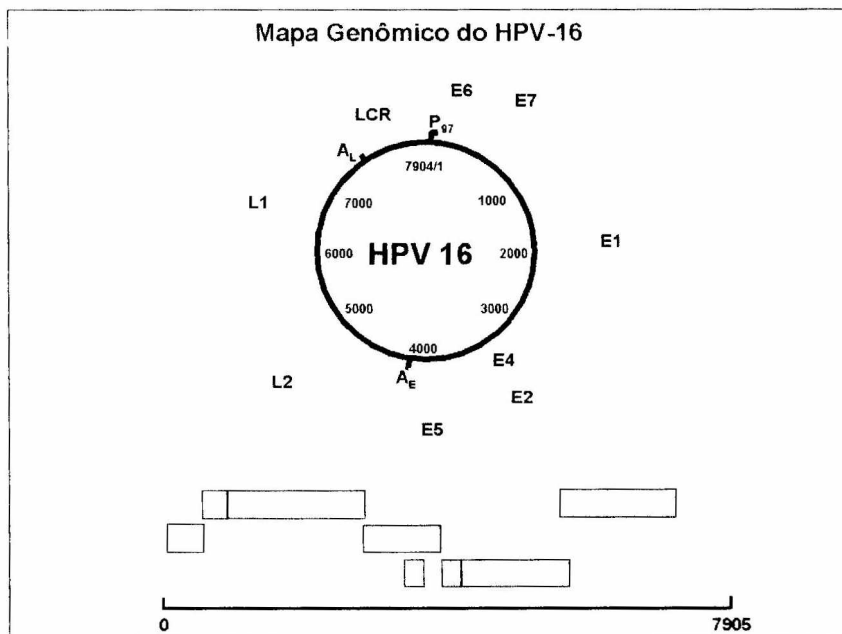


Figura I HPV-16. Mapa genômico (SHAH & HOWLEY,1990) e Organização do genoma (HOWLEY,1990, modificado).

A organização genômica de todos os tipos de HPV já estudados é similar. Têm uma fita única de DNA dividida em segmentos de seqüências gênicas denominadas “open reading frames” (ORFs) (Figura I). Os ORFs são classificados como E (early) e L (late) de acordo com a seqüência que são expressados no ciclo vital do vírus. As seqüências E, E1, E2, E4, E5, E6 e E7, garantem a replicação do maquinário genético do vírus, ou seja têm a função de codificar proteínas responsáveis pela transformação e replicação, enquanto que as L, L1 e L2, codificam proteínas estruturais e sua

expressão é restrita à parte diferenciada do epitélio. Uma outra região, entre L1 e E6, conhecida como região não codificante (NCR), região reguladora *upstream* (URR) ou região longa de controle (LCR) , não codifica proteínas, mas é essencial na regulação da replicação viral e transcrição dos genes, celulares e virais. Existe ainda uma região curta não codificadora (SNR) entre E5 e L2, cuja função biológica é desconhecida (ZUR HAUSEN,1989).

Mais de 100 tipos de HPV já foram identificados (HPV database; <http://hpv-web.lanl.gov/>), sendo que cerca de trinta tipos estão relacionados às infecções anogenitais (SYRJÄNEN & SYRJÄNEN, 2000). Destes, 15 tipos, os 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82, são de alto risco oncogênicos (MUÑOZ, et al., 2003) estando envolvidos em mais de 95% dos cânceres cervicais (WALBOOMERS et al.,1999). Os tipos 6,11, 40, 42,43,44, 54, 61, 70,72 e 81 estão comumente associados à condiloma acuminado e lesões cervicais de baixo grau, condilomas planos ou neoplasia cervical intra-epitelial de baixo grau, com características de infecção pelo papiloma vírus (BOSCH et al., 2002; MUÑOZ, et al., 2003). Há ainda, HPVs de provável alto risco, os tipos 26,53 e 66 (MUÑOZ, et al., 2003). O HPV 16 e o HPV 18 são os mais prevalentes, representam 59,8% e 15% respectivamente, dos tipos virais envolvidos no câncer invasivo (MUÑOZ et al., 2003) . O conceito de risco baixo ou alto de desenvolver câncer invasivo, é apoiado por muitos estudos epidemiológicos de caso-controle, que têm mostrado forte associação entre os tipos oncogênicos e lesões de alto grau e carcinoma (BOSCH et al., 1995; MUÑOZ et al., 2000). Existem diferenças importantes nas interações vírus-hospedeiro entre os HPV de alto e os de baixo risco, sendo que os tipos oncogênicos interferem mais efetivamente com os mecanismos de controle do ciclo celular (DYSON et al., 1989; ZUR HAUSEN et al., 1996b).

1.2. EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO PELO HPV

As maiores taxas de infecção foram observadas em mulheres entre 20 e 30 anos, sendo que mais de 30% destas pacientes estavam infectadas com HPV de alto risco. A prevalência da infecção decresce com o avançar da idade, sugerindo que, na maioria das mulheres, a infecção é limitada e cura-se espontaneamente sem causar lesão importante (KOUTSKY, 1997). Um estudo de coorte feito em São Paulo, Brasil, mostrou que a incidência de lesões cervicais foi 0,73/1000 mulheres /mês (FRANCO et al., 1999).

Nas lesões cervicais os HPVs passam de um indivíduo para outro através do contato direto (CANN et al., 1997), sendo a via sexual o modo de transmissão mais importante (ORIEL et al., 1971), seguida da transmissão vertical da mãe infectada para o recém-nato, pelo canal de parto ou mesmo líquido amniótico (PURANEN et al., 1997). Outras vias têm sido apontadas, como a manipulação instrumental e intervenções terapêuticas (FERENCZY et al., 1989).

Em estudos longitudinais de coorte, observou-se que as infecções por HPV duram aproximadamente, 8-10 meses para HPV de alto risco e 4-5 meses para os tipos de baixo risco (BOSCH et al., 2002). Em estudo feito no Brasil, observou-se a média de 13,5 meses de duração para infecções com HPV de alto risco e 8,2 meses para as de baixo risco (FRANCO et al., 1999). Em poucas destas pacientes a infecção persiste e causa lesões intraepiteliais. Estudos de *follow-up* de mulheres com ou sem anormalidades cervicais têm indicado que a presença contínua do HPV de alto risco é necessária para o desenvolvimento, manutenção e progressão das NIC (HO et al., 1995).

1.3. HPV E CO-FATORES NA CARCINOGENESE CERVICAL

Como a infecção por HPV oncogênicos é necessária, mas não suficiente para causar o câncer cervical (WALBOOMERS et al., 1999), considera-se que outros fatores, em conjunção com o HPV, modulam o risco de transição da infecção cervical para o câncer (Figura II).

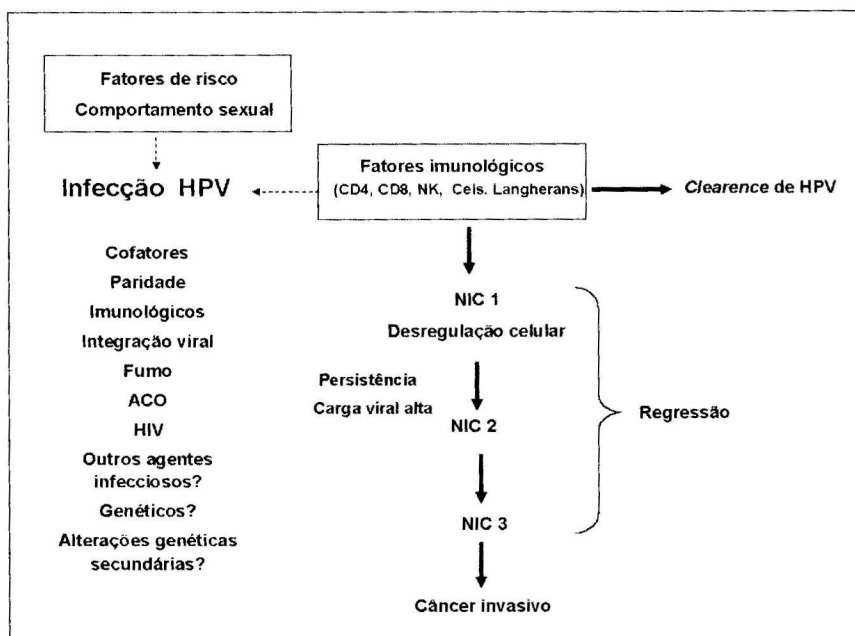


Figura II. HPV, fatores de risco e co-fatores na carcinogênese cervical (modificado de SOUTHERN & HERRIGTON, 1998b)

A exposição ao HPV é facilitada por variáveis relacionadas ao comportamento sexual, entre as quais, o início precoce da vida sexual, vários parceiros e parceiros sexuais promíscuos.

Após a infecção, é possível que em situações onde a resposta imune seja adequada haja *clearance* da infecção. Franco et al (1997) encontraram taxa de *clearance* mensal de 12,2% para HPV de baixo risco e 9,5% para os tipos oncogênicos.

O desfecho da infecção depende do tipo viral, da localização anatômica, da influência de fatores teciduais (JIAN et al., 1998; STOLER, 2000) e da ação de co-fatores (GAFFIKIN et al., 2003). Alguns co-fatores inerentes ao HPV interferem no risco de progressão das NICs e desenvolvimento do câncer cervical. Este risco está relacionado com o genótipo do HPV, variantes, carga viral, persistência e integração do DNA viral no genoma do hospedeiro (HO et al., 1995; JOSEFSSON et al., 2000; VILLA et al., 2000; SCHLECHT et al., 2001; SCHLECHT et al., 2003).

Os co-fatores podem ser classificados em ambientais e não ambientais. Os co-fatores que são correntemente aceitos como ambientais são alta paridade, uso prolongado de anticoncepcionais orais (ACO), (MUÑOZ et al., 2000, SCHIFFMAN, 1993, THOMAS et al., 2001; DEACAN et al., 2000; KJAER et al., 1998), fumo (WINKELSTEIN, 1977; CASTELLSAGUÉ et al., 2002) e DSTs tais como, Herpes vírus tipo 2, *Chlamydia trachomatis* (ANTTILA et al., 2001; SMITH et al., 2002) e em especial a Síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (MAIMAN, 1994; SUN et al., 1995; LEVI et al., 2002). Os co-fatores não ambientais são aqueles relacionados com a genética (STOREY et al., 1998; MACIAG & VILLA, 1999; HILDESHEIM & WANG, 2002) e a resposta imunológica do hospedeiro (KADISH et al., 1997; STELLATO et al., 1997; CLERICI et al., 1997).

A primeira publicação relacionando neoplasia intra-epitelial cervical ao vírus da imunodeficiência humana (HIV) foi feita por BRADBIER (1987). Outras publicações se seguiram, e, baseado nestes trabalhos, em janeiro de 1993, carcinoma de células escamosas invasivo foi adicionado à definição de AIDS pelo CDC (Center for Diseases Control and Prevention) (CDC, 1993). Tem sido demonstrado que mulheres infectadas pelo HIV apresentam alta prevalência de infecção pelo HPV e NIC (MAIMAN, 1994; SUN et al., 1995; PALEFSKY, 1999; LEVI et al., 2002). As

duas infecções apresentam dados epidemiológicos comuns: são consideradas DST, compartilham fatores de risco no comportamento sexual, sendo que mulheres mais jovens e minorias étnicas estão associadas com maior risco.

1.4. PATOGÊNESE DA INFECÇÃO PELO HPV

Os mecanismos de infecção dos papiloma vírus, desde sua adesão à superfície celular, transporte ao núcleo e perda do capsídeo, ainda não são completamente entendidos. Após a adesão às células superficiais do epitélio escamoso, os virions penetram por áreas de abrasão ou de epitélio imaturo presente na junção escamo-colunar (JEC) e na zona de transformação (ZT) da cérvice uterina, região de maior tropismo para HPVs de alto risco. Após a penetração, ocorre perda parcial ou total do capsídeo e exposição do genoma, usualmente na forma de nucleoproteína (TYLER & FIELDS, 1990; CANN, 1997). Ao chegar ao núcleo das células epiteliais basais e parabasais o HPV está pronto para continuar seu ciclo de replicação, executando a transcrição do DNA em RNAm (ZUR HAUSEN, 1999), e através da interação de fatores celulares com a LCR inicia a transcrição de E6 e E7. As proteínas E1 e E2 são as próximas a serem sintetizadas. E2 bloqueia a transcrição precoce de E6 e E7, liberando a ação das proteínas p53 e p105 Rb e o processo de diferenciação epitelial continua (SYRJÄNEN & SYRJÄNEN, 2000). Os genomas virais episossomais permanecem no núcleo das células basais infectadas e são distribuídos para as células filhas durante a mitose. Estas células funcionam como reservatório virais. Esta infecção pelo HPV sem qualquer lesão diagnosticável é dita latente. Os mecanismos que regulam a latência do HPV são pouco entendidos (ZUR HAUSEN, 1996,a,b).

Entre a doença clínica e a infecção latente há a doença sub-clínica, onde ocorrem alterações sutis, que podem ser detectadas pela colposcopia, citologia e biópsia. Estas pacientes desenvolvem infecção além da latência, mas que provavelmente não progredirão para infecção clínica franca, que é pré-requisito para o desenvolvimento das lesões pré-cancerosa e câncer (FRANCO, 1997).

Entre as mulheres com infecção pelo HPV, uma proporção bem menor (1-2%) desenvolve doença clínica, de gravidade variável (SYRJÄNEN, 1996). Nas infecções produtivas ou agudas ocorre a replicação viral nas células permissivas onde o promotor tardio ativa os genes L1 e L2 produzindo um número de cópias muito alto.

As etapas finais do ciclo vital do vírus, encapsidação, maturação e liberação dos virions, ocorrem quase que simultaneamente. A encapsidação do DNA viral ocorre dentro do núcleo, levando à maturação, que é o estágio em que o vírus se torna infeccioso. Esta infecção produtiva é restrita às células diferenciadas nas camadas suprabasais do epitélio. Finalmente, ocorre liberação de milhares de partículas virais maduras no momento em que estas células são esfoliadas da superfície do epitélio escamoso maduro (SYRJÄNEN & SYRJÄNEN, 2000).

As manifestações clínicas clássicas da infecção produtiva são as lesões condilomatosas, nas diversas formas. As células com vírus em replicação mostram coilocitose, resultante do efeito citopático característico de lesões intra-epitelial de baixo grau (LIE-BG), que é a coilocitose (AMBROS & KURMAN, 1990). Em poucas pacientes infectadas com HPV oncogênicos, as LIE-BG progridem para lesões intra-epitelial de alto grau (LIE-AG) e carcinoma invasivo. Em muitas destas lesões, o genoma do HPV se integra no genoma celular, e neste caso, as oncoproteínas virais, E6 e E7 interferem no ciclo celular, resultando na expressão alterada de proteínas que o controlam.

O potencial oncogênico de cada tipo de HPV parece refletir a capacidade dos oncogenes virais, E6 e E7 de interferir no ciclo celular, através da degradação do produto do gene supressor de tumor p53 e da inativação funcional do produto do gene retinoblastoma, pRb, respectivamente (ALANI & MUNGER, 1998).

O ciclo celular é uma seqüência de eventos bem organizados, compreendendo as fases G1 (pré-sintética), S (síntese de DNA), G2 (pré-mitótica) e M (mitótica), que resulta na produção de duas células filhas idênticas. A coordenação entre as diferentes fases é dependente de um sistema de *checkpoints* e controles de *feedback*, que impedem a entrada na próxima fase do ciclo, até que os eventos da fase precedente tenham sido completados (CLARKE & CHETTY, 2001). A progressão ordenada das células através das várias fases do ciclo celular é orquestrada pelas ciclinas, cinases dependentes de ciclinas (CDK) e seus inibidores (CDKIs).

As CDKs comandam o ciclo celular fosforilando proteínas que são necessárias para progressão de uma fase do ciclo para a próxima. A atividade das CDKs é regulada por duas famílias de inibidores de CDK (CDKIs). Uma família de CDKIs, constituída de três proteínas p21, p27 e p57 inibe as CDKs de forma ampla, enquanto a outra família de CDKIs tem efeitos seletivos nos complexos ciclina D/CDK 4 e ciclina D/CDK 6. Os quatro membros desta família, p15, p16, p18 e p19, são chamados proteínas INK4, porque são inibidores de CDK 4 e CDK 6. A p16^{INK4a}, é o produto do gene supressor de tumor CDKN2 (MTSA), localizado na região cromossômica 9p21, sendo esta proteína detectável quando RB é mutante, deletado ou inativado, e está acentuadamente reduzida ou ausente em linhagens celulares que contém RB normal (OKAMOTO & BEACH, 1994).

Evidências bioquímicas indicam que um dos primeiros eventos em G1 é a síntese de ciclinas D, particularmente a D1 (SHERR, 1996). O gene da ciclina D1,

inicialmente identificado como PRAD1, está localizado no cromossomo 11q13 e tem sido amplificado em carcinoma de mama (ZHANG et al., 1994). A ciclina D1 tem importante papel na regulação do crescimento celular e suas alterações podem estar envolvidas em tumorigênese. Esta ciclina interage com as CDK4 e CDK6 resultando no acúmulo destes complexos do início ao meio desta fase. Estas cinases, que fosforilam pRb são necessárias para passagem através da fase G1 do ciclo celular (SHERR, 1994; WEINTRAUB et al., 1995; QIN et al., 1992; DYSON et al., 1989) e suas atividades são reguladas, em parte, por CKIs, entre as quais a p16^{INK4a}. Ligação específica da proteína p16^{INK4a} às CDKs, CDK4 e CDK6, inibe a atividade fosforilativa dos complexos CDK-ciclina D1, através do complexo proteico nuclear RB/E2F (SERRANO et al., 1993). A via ciclina D/CDK4,6/ INK4a/Rb/E2F desempenha papel chave no controle do crescimento celular, pela integração com múltiplos estímulos mitogênicos e não mitogênicos (SHERR, 2001).

A persistência de certos genes virais nas células pode resultar na integração do DNA viral no genoma do hospedeiro (FRANCO et al., 1999). A integração do HPV ocorre regularmente próximo a sítios de fragilidade cromossômica ou à *breakpoints* (DÜST et al., 1995). Durante a integração, o DNA viral frequentemente se rompe na região E1/E2. Esta quebra resulta na perda de função de E2, aumentando a transcrição dos principais genes transformantes, as proteínas E6 e E7 (SHERR, 1996), cuja expressão é pré-requisito essencial para manter o crescimento das células cervicais cancerosas (ZUR HAUSEN, 1999).

O HPV E7 interage e neutraliza as funções da *pocket protein* da pRb, p107 e p130 (DYSON et al., 1989). Esta interação, análoga à fosforilação mediada por CDK, induz a degradação da pRb, resultando na liberação dos E2Fs (Fatores de transcrição de crescimento epitelial E2) (GIARRÈ et al., 2001). De acordo com esta hipótese,

altos níveis de p16^{INK4a} são detectados em linhagens celulares HPV-transformadas, bem como em lesões pré-cancerosas e cânceres (NAKAO et al., 1997, SANO et al., 1998b; KLAES et al., 2002; KEATING et al., 2001).

Apesar das transições do ciclo celular depender da atividade das CDKs, outros controles de *checkpoints*, como o gene p53, ajudam a garantir a parada em G1, para que o DNA danificado seja corrigido antes de replicar. O gene supressor de câncer, p53, está localizado no cromossomo 17q13. O seu produto é uma fosfoproteína nuclear de 53kD.

A proteína p53 funciona como fator de transcrição, induzindo a expressão das proteínas MDM2 e p21^{CIP1}. A MDM2 cataliza a destruição e inibe transcrição da p53 (HENGSTERMANN et al., 2001). O acúmulo de p21^{CIP1} inibe as CDKs necessárias para o início da síntese de DNA (EL-DEIRY et al., 1994). Portanto, as vias de controle de crescimento comandadas por pRB (ciclina D/CDK4,6/ INK4a/Rb/E2F) e p53 (p53/MDM2/p21^{CIP1}) não são separadas, mas interligadas.

1.5. DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO PELO HPV

As formas de infecção pelo HPV podem ser latentes, subclínicas e clínicas, estando incluídas nesta categoria as neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC) graus 1, 2, 3 e carcinoma invasivo.

As infecções cervicais latentes causadas pelo HPV permanecem assintomáticas e só podem ser detectadas por técnicas de biologia molecular. Apesar da maioria das infecções sub-clínicas e clínicas não produzirem sintomas, podem ser diagnosticadas rotineiramente através de exames que detectam alterações epiteliais induzidas pelo vírus, como a colposcopia, citologia, e histopatologia. É importante ter em mente que estes três métodos são complementares.

A aplicação destes métodos na rotina clínica é capaz de diagnosticar a maioria das lesões cervicais, entretanto, cada um deles tem desvantagens que podem resultar em falsos diagnósticos. A colposcopia tem especificidade baixa para diferenciar áreas de metaplasia imatura, principalmente nos casos de metaplasia persistente (“metaplasia estagnada”) e NICs (BARRASO, 1997). O exame citológico tem conseguido reduzir substancialmente a incidência de câncer cervical, em locais onde existem programas de triagem apropriados, entretanto, mesmo nestas populações, não há evidência que o teste de Papanicolaou tenha conseguido erradicar esta doença teoricamente prevenível, devido a existência de resultados falsos-negativos (KOSS, 1989).

Apesar de critérios anátomo-patológicos para lesões cervicais serem bem estabelecidos (REAGAN & PATTEN 1962; RICHART, 1967; CRUM, et al., 1997; CRUM, 2003), existe variação significativa intra e inter observadores, em especial em relação às lesões iniciais (ROBERTSON et al., 1989; DE VET et al., 1990; GRENKO et al., 2000). Além de que, baseado nos aspectos morfológicos das NIC, não é possível diferenciar aquelas lesões que irão regredir ou persistir sem evolução, daquelas que progredirão para o câncer invasivo.

A imunoistoquímica para detecção das partículas virais (antígenos virais) em biópsias, usando anticorpos mono e policlonais, tem baixa sensibilidade, com cerca 50% de positividade nos casos morfológicamente compatíveis com infecção por HPV (ANDRADE et al., 1991).

Nos últimos anos, vários testes de biologia molecular para detecção de HPV, têm sido desenvolvidos. A hibridização molecular de ácidos nucléicos, em especial a captura híbrida, é um método confiável e tem sido usada para o diagnóstico da infecção por HPV, permitindo a genotipagem viral (COX et al., 1995; MANOS et

al.,1999; SHERMAN et al.,2003; BURD, 2003). A reação em cadeia da polimerase, também empregada, é ainda mais sensível e a especificidade da detecção do DNA-HPV pode ser aumentada por hibridização com sondas específicas. A introdução da tecnologia da PCR aumentou esta taxa para 70-90%, e com desenvolvimento da sonda e condições técnicas esta proporção tem alcançado 100% dos casos (BOSCH et al, 2002). A sensibilidade elevada deste testes, permite detectar o HPV em mulheres sem lesão, o que gera grande ansiedade, além do que a simples presença do vírus, mesmo os de alto risco oncogênico, não implica em um curso previsível da infecção.

1.6. JUSTIFICATIVAS

Com base na revisão bibliográfica realizada, conclui-se que a carcinogênese do colo uterino tem como agente causal tipos oncogênicos do papiloma vírus humano. Estes vírus exercem seu papel através da interação das oncoproteínas E6 e E7 com proteínas do ciclo celular, levando a distúrbios do mecanismo do ciclo, e conseqüente alteração da expressão de algumas proteínas, entre as quais p16^{INK4a}, ciclina D1, p53 e Ki67, bem como das moléculas de adesão CD44v5 e Cd44v6.

As discrepâncias e insuficiência dos exames morfológicos, aliadas às desvantagens dos outros métodos diagnósticos, abrem espaço para novos estudos visando identificar marcadores adicionais que auxiliem no diagnóstico, procurando identificar instabilidade cromossômica (DUENSING & MUNGER, 2001) e o nível de expressão e atividade funcional dos oncogenes virais (SANO et al.,1998b; KLAES et al., 2001).

Neste trabalho investigaram-se alterações da expressão das proteínas do ciclo celular, p16^{INK4a}, ciclina D1, p53 e Ki67 e das moléculas de adesão CD44v5 e

CD44v6 nas várias etapas da carcinogênese cervical. Para isto foi feito estudo imunoistoquímico em biópsias do colo uterino, com resultados negativos para neoplasia, neoplasias intra-epiteliais de graus variados e carcinoma. Foram estudados os padrões de expressão destes marcadores, correlacionando-os com o diagnóstico histopatológico, em particular com o grau de gravidade da lesão e com a infecção pelo HPV. Desta forma, buscamos imunomarcadores que identifiquem lesões com maior risco de progressão para o câncer invasivo e que possam ser úteis na prática clínica, separando as pacientes que possam ter abordagem mais conservadora daquelas que necessitam de tratamento mais agressivo.

Alterações na expressão da proteína p16^{INK4a} têm sido descritas em muitos cânceres, (CAIRNS et al.,1995), relacionadas com mutação, deleção homozigota e hipermetilação gênica (HERMAN et al., 1995). Vários estudos recentes têm avaliado o papel da p16^{INK4a} na neoplasia cervical (KHLEIF et al.,1996; NAKAO et al.,1997; SANO et al.,1998a; SANO et al.,1998b; NAKASHIMA et al.,1999; KLAES et al.,2001; KEATING et al.,2001; GIARRÈ et al., 2001; KLAES et al., 2002; VON KNEBEL DOEBERITZ, 2002). Entretanto, esta questão ainda é controversa, com alguns autores relatando redução da expressão da p16^{INK4a} em câncer cervical (HIRAMA et al., 1996; KIM et al., 1998; NAKASHIMA et al., et al., 1999; NUOVO et al.,1999), e outros observando aumento da expressão da p16^{INK4a} em células HPV-transformadas, câncer cervical e lesões pré-neoplásicas (NAKAO et al., 1997; SANO et al., 1998^a; SANO et al., 1998b; KLAES et al., 2002; KEATING et al., 2001).

Os resultados da expressão do RNAm e da proteína ciclina D1 são conflitantes (KURZROCK et al, 1995; NICHOLS et al, 1996). Existem poucos trabalhos estudando a expressão desta proteína e sua correlação com prognóstico (SKOMEDAL et al 1999; BAE et al 2001), observando-se níveis reduzidos de ciclina D1 em NIC e

carcinoma, quando comparado com epitélio normal (CHO et al., 1997; BAE et al., 2001).

A proteína p53 selvagem tem meia-vida curta (6-20min), não se acumulando em quantidade suficiente para ser detectada pela IMQ (LEVINE et al, 1991). Entretanto, a forma mutada ou conformacional alterada tem meia-vida mais longa (maior que 6h) possibilitando sua detecção (LEVINE et al 1991; MILNER, 1991). Vários estudos têm demonstrado associação entre acúmulo da proteína p53 e comportamento agressivo das neoplasias incluindo a maior propensão à metástase e menor sobrevivência dos pacientes (GOH et al., 1994). Em células infectadas com HPV de alto risco, a expressão de E6, leva a inativação da p53, que acumulada é detectável pela IMQ, em lesões cervicais pré-cancerosas e em carcinoma invasivo (CHANG et al., 1993).

O anticorpo monoclonal Ki67 foi descrito em 1983 por Gerdes et al. (1983). O antígeno reconhecido por Ki67 é um complexo protéico não histona, de peso molecular de 345 e 395 KD (GERDES et al., 1991), produto do gene localizado no cromossomo 10q25, expresso durante todas as fases do ciclo celular, G1, S, G2 e M, de células proliferantes, mas ausente nas células quiescentes (G0). É, portanto, um marcador de proliferação celular, que pode ser detectado por anticorpo monoclonal (GERDES, 1983; GERDES, 1991). Alguns pesquisadores têm indicado que o Ki67 é um marcador de prognóstico relevante no estudo dos tumores humanos (BROWN & GATTER, 1990). No colo uterino, a imunopositividade para a Ki67 reflete a relação entre atividade proliferativa, grau do NIC e expressão do HPV (KONISHI et al., 1991; DEVICTOR et al., 1993; RESNICK et al., 1996).

Os queratinócitos expressam moléculas de adesão como integrinas, caderinas, ICAM-1 e CD44. A CD44 é uma família de glicoproteína da superfície celular codificada por um único gene situado no braço curto do cromossoma 11

(GOODFELLOW et al., 1982). Vinte exons estão envolvidos na organização genômica desta molécula, sendo os cinco primeiros e os cinco últimos constantes e os demais sofrem *splicing* alternativo resultando na geração da região variável que produzirá diversas isoformas de tamanhos diferentes (85-230Kda). A menor molécula (85-95KDa), que não tem região variável, é a CD44 *standard* (CD44s) (SCREATON, 1992). A CD44s tem sido implicada em várias funções celulares, incluindo ativação de linfócitos, adesão celular homo e heterotípica, adesão à matriz extra-celular, apresentação de quimiocinas e fatores de crescimento às células em trânsito, além de transmissão de sinais de crescimento (UNDERHILL et al., 1992). A função normal das variantes é desconhecida. Estas isoformas são expressas nos epitélios, de maneira diferencial, sendo esta expressão mais intensa nas células germinativas, como as células basais do epitélio escamoso (MACKAY et al, 1994). Uma destas variantes, a CD44v6 confere potencial metastático à células de carcinoma de pâncreas em ratos (GÜNTHERT et al., 1991). Variantes da CD44 têm sido implicadas na transformação maligna e disseminação de metástase de vários cânceres, (GÜNTHERT et al., 1991; MATSUMURA & TARIN 1992; SALMI et al., 1993). Em certos tumores humanos as células parecem expressar perfil anormal de CD44v , como v6 em carcinoma de cólon, mama (MATSUMURA & TARIN, 1992), gástrico (HARN et al., 1995), endométrio (AYHAN et al., 2001) e CD44v5 em adenocarcinoma endocervical (IBRAHIM et al., 1999).

Em neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC) e carcinomas invasivos da cérvix uterina, têm sido descritas alterações na expressão das CD44v e correlacionadas com o grau histopatológico, invasão local e prognóstico, não havendo ainda consenso sobre sua aplicabilidade clínica. Alguns estudos têm sugerido que a expressão de determinadas variantes da CD44 no colo uterino está relacionada com

pior prognóstico (KAINZ et al., 1995; SPEISER et al., 1997), enquanto outros mostram redução destas moléculas durante a progressão das lesões pré-malignas (SAEGUSA et al., 1999; CALLAGY et al., 2000).

Nossa hipótese é que nas lesões do colo uterino, relacionadas com infecção pelo HPV, há um perfil de expressão de moléculas do ciclo celular e de cito-adesão que se correlacionam com o risco de progressão para neoplasia invasiva, e que podem ser utilizadas para predizê-las.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

- Avaliar os significados de potenciais marcadores biológicos da carcinogênese cervical e suas relações com diagnóstico histológico e infecção pelo HPV.

2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar comparativamente a expressão das proteínas do ciclo celular p16^{INK4a}, ciclina D1, p53 e Ki67 e das moléculas de adesão CD44v5 e CD44v6 no epitélio de pacientes com colo normal e nas diversas etapas da carcinogênese cervical
- Correlacionar o padrão de expressão da p16^{INK4a}, ciclina D1, p53 e Ki67, CD44v5 e CD44v6 com a infecção pelo HPV e HIV

3 CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS

Foram selecionadas 60 pacientes que apresentaram zona de transformação anormal (ZTA) e citologia atípica ou citologia negativa com ZTA persistente (6 meses ou mais), entre outubro de 1999 e março de 2001, em diversos Ambulatórios de Patologia Cervical na cidade de Salvador, Bahia, incluindo o Centro Estadual de Oncologia-CICAN (SESAB), o Ambulatório de Ginecologia da Unidade Docente e Assistencial de Infectologia do Hospital Universitário Prof. Edgar Santos da Universidade Federal da Bahia (UDAI-HUPES-UFBA) e consultório em clínica privada (CQ).

As pacientes deram consentimento por escrito para participar do estudo (ver Anexo I) e responderam questionário com informações sócio-demográficas e clínicas (ver Anexo II). Cinquenta e cinco pacientes realizaram teste para HIV (Elisa/WB), no Laboratório de Retrovírus do HUPES ou no CICAN e todas fizeram colposcopia e citologia (ver classificações utilizadas nos anexos III e IV). As biópsias foram realizadas sob visão colposcópica, com pinça de Gaylor-Medina ou por cirurgia com alça de alta frequência (CAF), a depender da extensão da ZTA. São mostrados quatro casos deste estudo, considerando os diagnósticos colposcópicos, citológicos, histopatológicos, sorologia para HIV e PCR DNA-HPV (ver Anexo V).

3.1 PERFIL SÓCIO-DEMOGRÁFICO E CLÍNICO

3.1.1 CARACTERÍSTICAS SÓCIO-DEMOGRÁFICAS

A média da idade das pacientes da amostra foi 37 anos, variando entre 19 anos e 82 anos. As demais características estão na Tabela 1.

Tabela 1. Características Sócio-demográficas.

| Variáveis | Mulheres (N = 60) | |
|-----------------------------|-------------------|------|
| | n | % |
| Cor | | |
| Branca | 9 | 15,0 |
| Negra | 12 | 20,0 |
| Parda | 38 | 63,3 |
| Não declarada | 1 | 1,7 |
| Estado Civil | | |
| Solteira | 30 | 50,0 |
| Casada | 22 | 36,7 |
| Divorciada | 2 | 3,3 |
| Viúva | 6 | 10,0 |
| Naturalidade | | |
| Capital | 25 | 41,7 |
| Interior | 27 | 45,0 |
| Outros estados | 7 | 11,6 |
| Não declarada | 1 | 1,7 |
| Grau de escolaridade | | |
| Analfabeta | 7 | 11,7 |
| Até o 1º grau | 33 | 55,0 |
| Até o 2º grau | 15 | 25,0 |
| Até o 3º grau | 5 | 8,3 |
| Dona do lar | | |
| Sim | 18 | 30,0 |
| Não | 42 | 70,0 |

3.1.2. HISTÓRIA GINECOLÓGICA E OBSTÉTRICA

A Tabela 2 mostra os dados da história ginecológica e obstétrica.

Tabela 2. Características Ginecológicas e Obstétricas

| Variáveis | Mulheres (N = 60) | |
|-------------------------|---------------------|------|
| | n | % |
| Queixa | | |
| Sim | 32 | 53,3 |
| Não | 22 | 36,7 |
| Não declarada | 6 | 10,0 |
| Número de parceiros | | |
| Um parceiro | 17 | 28,3 |
| De 2 a 5 parceiros | 35 | 58,3 |
| De 6 a 10 parceiros | 5 | 8,3 |
| Mais de 10 parceiros | 3 | 5,1 |
| Uso de anticoncepcional | | |
| ACO | 16 | 26,7 |
| ACI | 5 | 8,3 |
| Preservativo | 8 | 13,3 |
| LT | 10 | 16,7 |
| Outros | 2 | 3,3 |
| Nenhum | 3 | 5,0 |
| Não declarado | 16 | 26,7 |
| Paridade | | |
| Nenhum parto | 10 | 16,7 |
| De 1 a 3 partos | 26 | 43,3 |
| De 4 a 6 partos | 10 | 16,7 |
| Mais de 6 partos | 10 | 16,7 |
| Não declarado | 4 | 6,6 |

3.2. AMPLIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DO DNA-HPV ATRAVÉS DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).

Antes da realização da colposcopia, foi feito raspado da ecto e endocérvice com escova estéril, dispersão das células em TE (Tris 10mM, EDTA 1mM, pH7.4),

congelamento a -20°C . O material foi encaminhado para o Instituto Ludwig de Pesquisa contra o Câncer (São Paulo), para realização das PCR utilizando os *primers* MY09/11. Em sete casos de carcinoma invasivo a PCR foi feita em secções de material parafinado, usando os *primers* GP5+/ GP6+ (ver protocolos no ANEXO VI).

3.3. EXAME HISTOPATOLÓGICO DO COLO UTERINO

Os fragmentos do colo uterino foram fixados em formol a 4% tamponado, por 6 a 12 horas e após emblocagem em parafina, foram feitas secções com $4\mu\text{m}$ de espessura, coloração por Hematoxilina-Eosina (HE) e secções para imunohistoquímica. O diagnóstico histológico foi feito por dois patologistas, e quando houve discordância, um terceiro patologista era consultado. Para o resultado histológico, foi usada a Classificação de Richart (RICHART, 1973), considerando-se a infecção pelo HPV como NIC I (Ver ANEXO VII).

3.4. IMUNOISTOQUÍMICA

O estudo imunohistoquímico foi feito em secções de tecido emblocado em parafina. Foram utilizados cortes com 4μ de espessura, montados em lâminas passadas previamente em solução adesiva (poli-lisina, 1:20). A técnica utilizada foi a Streptoavidina-biotina e está descrita no ANEXO. Foram empregados anticorpos monoclonais, listados no Quadro 1.

Quadro 1. Anticorpos utilizados na imunohistoquímica

| Anticorpo | Clone / Produtor | Especificidade | Diluição |
|---------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|----------|
| Anti-human p16 ^{INK4a} /MTS1 | MTM Laboratories, Clone E6H | Proteína p16 ^{INK4a} | 1:200 |
| Anti-human Cyclin D1 | DAKO, Clone DCS-6 | Proteína Ciclina D1 | 1:100 |
| Ki67 | DAKO, Clone Ki-S5 | Antígeno Ki67 | 1:200 |
| Anti-human p53 protein | DAKO, Clone DO-7 | Proteínas p53, selvagem e mutante | 1:50 |
| Anti-human CD44v5 | Serotec, Clone VFF-8 | Variante v5 da CD44 | 1:800 |
| Anti-human CD44v6 | Serotec, Clone VFF-7 | Variante v6 da CD44 | 1:800 |

3.5. POSITIVIDADE PARA OS ANTICORPOS MONOCLONAIS

3.5.1. REAÇÃO PARA P16^{INK4a}

A reação foi considerada positiva quando se observou coloração castanho-amarelada no núcleo e citoplasma (Ver protocolo da reação no Anexo VIII). A frequência de células positivas foi graduada de acordo com o controle positivo (carcinoma de células escamosas invasivo do colo uterino), conforme Quadro 2 e mostrada na Figura 1. A reação foi analisada na área de maior gravidade da lesão.

Quadro 2. Frequência de células positivas para p16^{INK4a}

| Escores | Descrição |
|---------|---|
| 0. | Negativo |
| 1. | Menos de 50% de células positivas do epitélio |
| 2. | Entre 50% e 80% células positivas |
| 3. | Mais de 80% de células positivas |

A intensidade da reação foi considerada tomando como padrão o caso do controle positivo, conforme o Quadro 3.

Quadro 3. Intensidade da reação para p16^{INK4a}

| Escores | Descrição |
|---------|---------------------------|
| 0. | Sem reação |
| 1. | Fraca |
| 2. | Moderada |
| 3. | Forte (igual ao controle) |

O padrão de reação celular levou em consideração o tipo de reação em cada célula, isoladamente, conforme a Quadro 4.

Quadro 4. Padrão de reação celular para p16^{INK4a}

| Escores | Descrição |
|---------|---|
| 0. | Sem reação |
| 1. | Reação nuclear e citoplasma fracamente corado |
| 2. | Reação nuclear e citoplasmática forte |

Em relação à média entre os parâmetros frequência de células positivas para p16^{INK4a}, intensidade e padrão de reação celular:

Quadro 5. Escores das médias dos parâmetros para p^{16INK4a}

| Escore | média |
|--------|--------------------|
| 0. | Média 0 a 0,49 |
| 1. | Média 0,5 a 1,49 |
| 2. | Média 1,5 a 2,49 |
| 3. | Média acima de 2,5 |

Em relação à positividade do epitélio escamoso e glandular normais presentes na amostra, observou-se se houve reação, de acordo com a quadro 6.

Quadro 6. Positividade para p16^{INK4a} no epitélio escamoso e glandular presente na amostra

| Escores | Descrição |
|---------|---------------------------|
| 0. | Sem reação |
| 1. | Fraca |
| 2. | Moderada |
| 3. | Forte (igual ao controle) |

3.5.2. REAÇÃO PARA CICLINA D1

Considerou-se a positividade do núcleo e o padrão de reação (Ver protocolo da reação no Anexo IX). A reação foi considerada positiva ou negativa de acordo com o controle positivo (carcinoma lobular da mama) (Figura 2).

Quadro 7. Padrão de reação para Ciclina D1

| Escores | Descrição |
|---------|---|
| 0. | Sem reação |
| 1. | Positividade na camada basal. |
| 2. | Reação de algumas células acima da camada basal |

3.5.3. REAÇÃO PARA P53

A reação foi considerada positiva quando marcou o núcleo (Ver protocolo da reação no Anexo X). (Figura 3).

Quadro 8. Reação para p53

| Escores | Descrição |
|---------|--|
| 0. | Sem reação |
| 1. | Positividade nuclear de até 10% das células |
| 2. | Positividade nuclear entre 10% a 50% das células |
| 3. | Positividade nuclear de acima de 50% das células |

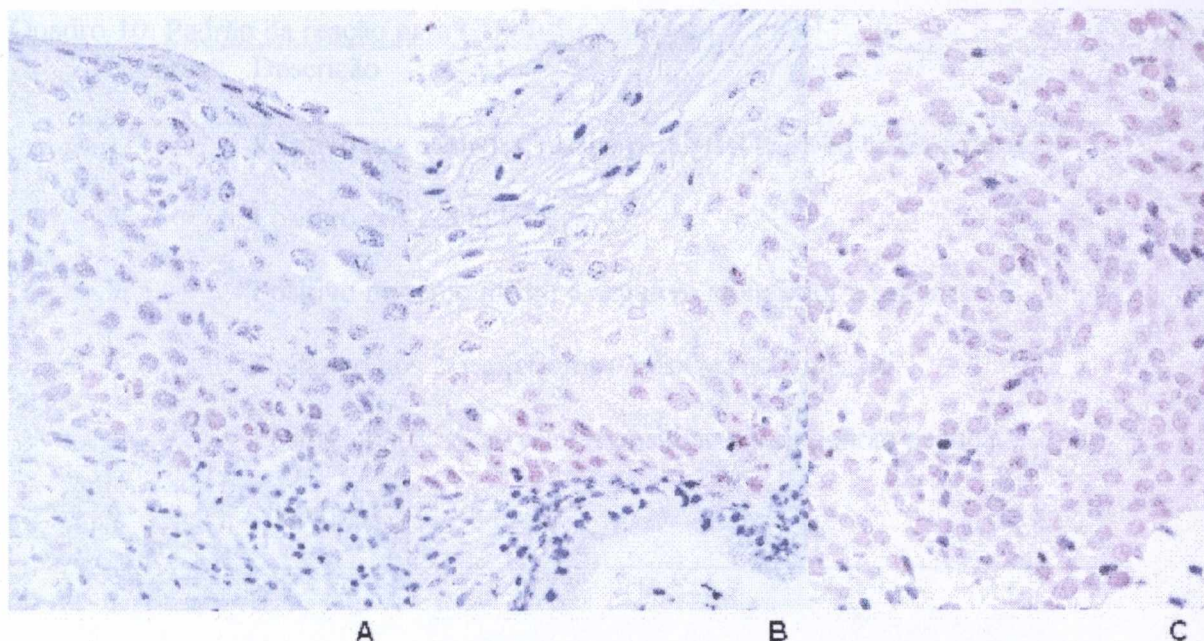


Figura 1. Expressão da proteína p16^{INK4a} : A. menos de 50% de células positivas do epitélio B. entre 50 e 80% de células positivas. C. mais de 80% de células positivas.

Em A e B a coloração do citoplasma é fraca. (Aumento 400x).

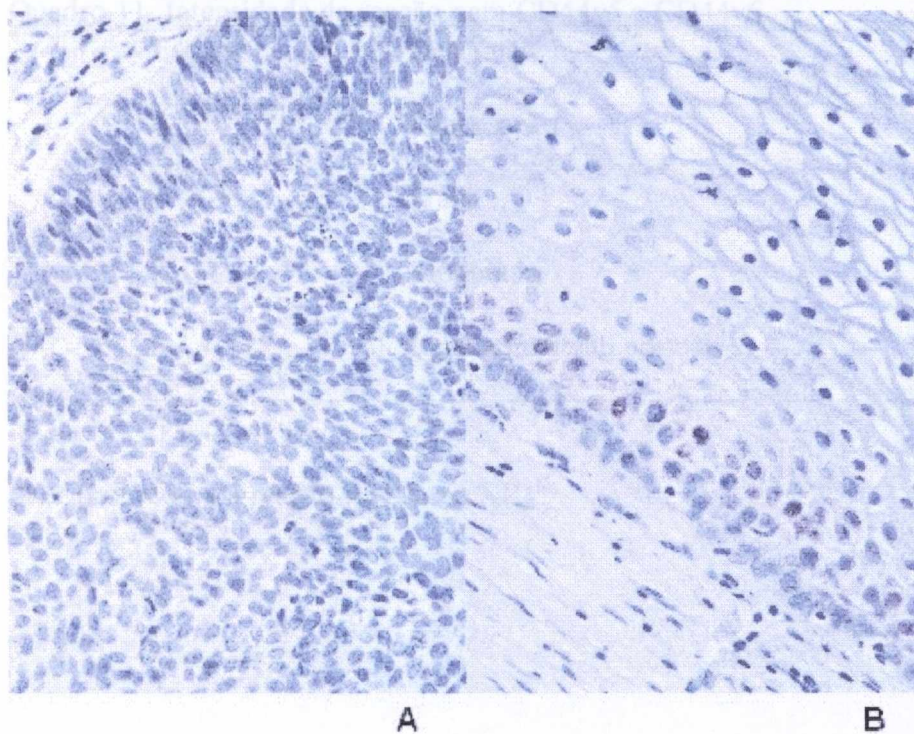


Figura 2. Reação para ciclina D1: A. negativa B. reação de algumas células acima da camada basal (Aumento 400x).

Quadro 10. Padrão da reação para CD44v5 e CD44v6

| Escores | Descrição |
|---------|---|
| 1. | Positivo nas camadas basal e parabasal (padrão epitélio normal) |
| 2. | Positivo nos 2/3 inferiores |
| 3. | Positivo no terço médio e negativo no inferior e superior |
| 4. | Negativo nos 2/3 inferiores e positivo no superior |
| 5. | Positivo (> 25% de células positivas), sem padrão peculiar |
| 6. | Negativo |

A graduação da intensidade foi feita tomando como padrão positivo o epitélio escamoso normal, de acordo com o Quadro 11.

Quadro 11. Intensidade da reação para CD44v5 e CD44v6

| Escores | Descrição |
|---------|--------------------------|
| 0. | Sem reação |
| 1. | Fraca |
| 2. | Moderada |
| 3. | Igual ao epitélio normal |

(Ver protocolo da reação no Anexo XII).

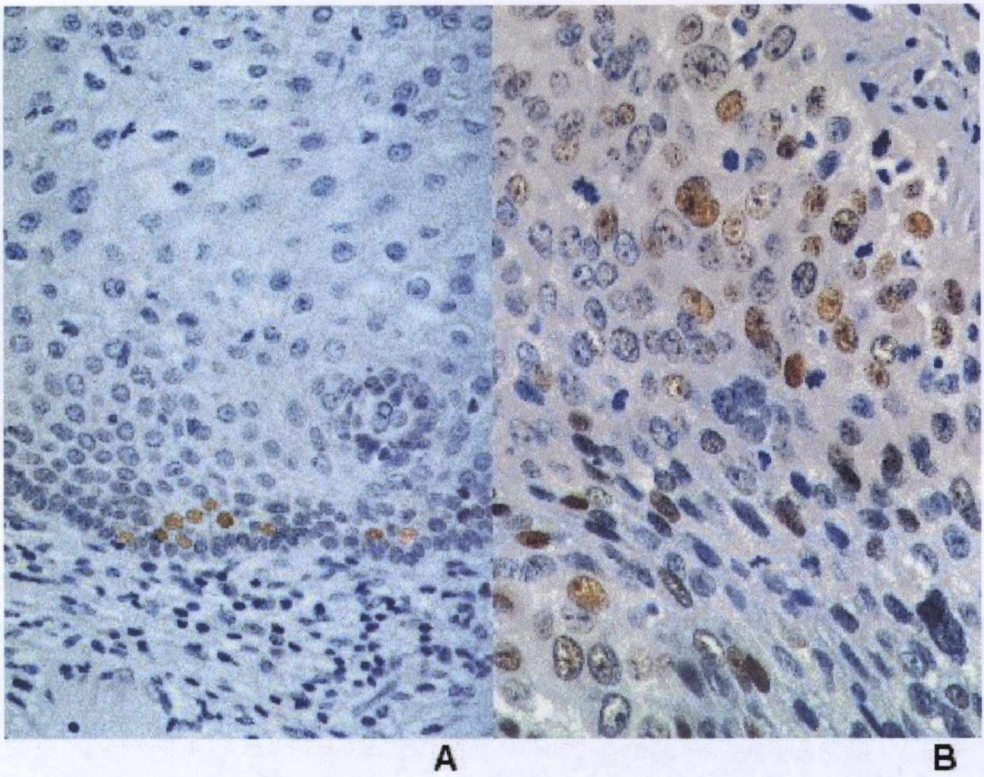


Figura 3. Reação para p53. A. positividade nuclear de até 10% das células B. positividade nuclear de acima de 50% das células (Aumento 400x)

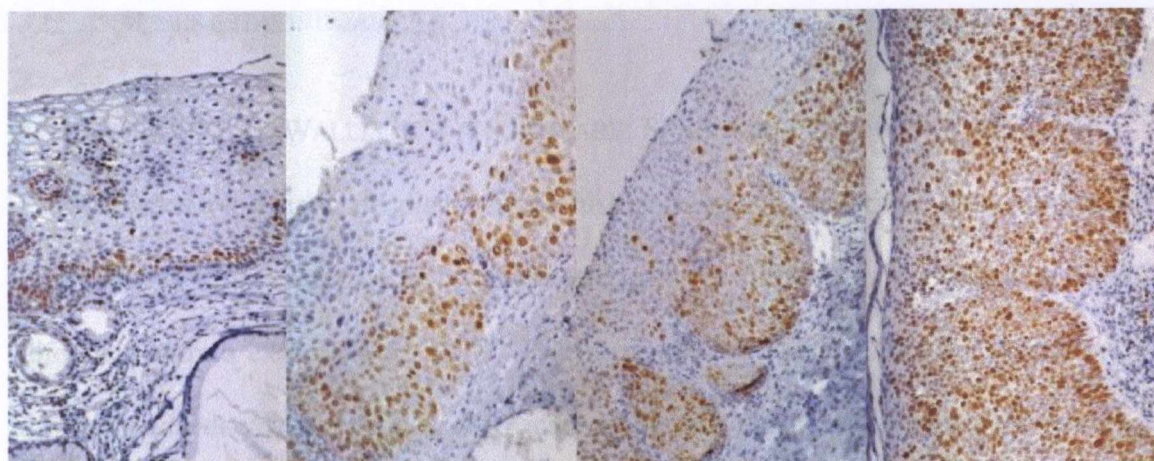


Figura 4. Reação para Ki67: A. negativa (apenas positiva nas camadas basal e parabasal) B. até 20% C. entre 20 e 40% e D. acima de 40% (Aumento 250x).

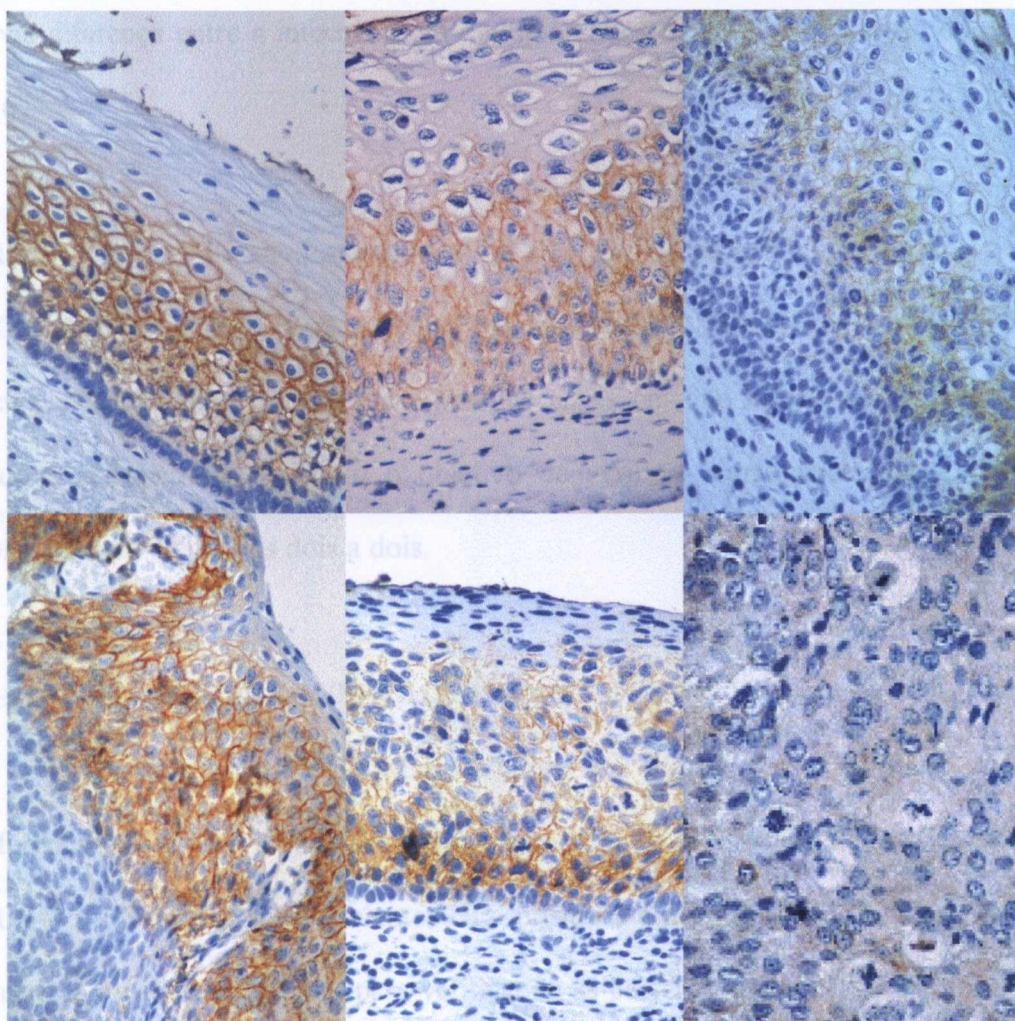


Figura 5. padrão de reação para cd44v5 e cd44v6 (Ver descrição na contra-folha).

3.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

TESTE DE KRUSKAL-WALLIS (KW) (SOFTWARE: SPSS FOR WINDOWS – VERSÃO 11.0):
 Considerados os grupos de diagnósticos histopatológicos, negativos para neoplasia, NIC1, NIC2, NIC3 e carcinoma invasivo, este teste foi utilizado para verificar se havia diferença entre a expressão da p16^{INK4a} (em relação à frequência de células positivas, à intensidade da reação, padrão de reação celular e a média entre estes parâmetros), demais proteínas do ciclo celular ciclina D1, Ki67 e p53 e as moléculas de adesão CD44v5 e CD44v6, nestes grupos. Este teste foi também aplicado para verificar se havia diferença entre a infecção com múltiplos tipos de HPV e expressão da proteína p16^{INK4a}

PROCEDIMENTOS NÃO-PARAMÉTRICOS DE DUNN E DE HOLMES PARA COMPARAÇÕES MÚLTIPLAS (*PROC IML DO SOFTWARE: THE SAS SYSTEM FOR WINDOWS – VERSÃO 8.02*):
 Estes procedimentos foram realizados nos casos em que houve diferenças entre os grupos histopatológicos, com o objetivo de verificar significância desta diferença, considerando os grupos dois a dois.

TESTE DE MANN-WHITNEY (MW) (SOFTWARE: SPSS FOR WINDOWS – VERSÃO 11.0):

O Teste Estatístico de Mann-Whitney foi utilizado para verificar se existe diferença estatística significativa entre o padrão e a intensidade de reação para CD44v5 e CD44v6, entre pacientes HIV positivas e negativas, e entre pacientes HPV positivas e negativas. Ainda, para verificar se as pacientes HPV positivas, em especial do tipo 16 e HIV positivas diferem quanto à positividade para p16^{INK4a}

TESTE DE WILCOXON (TW) (SOFTWARE: SPSS FOR WINDOWS – VERSÃO 11.0)

Para cada caso, foi utilizado para comparar o padrão e a intensidade das reações de CD44v5 e CD44v6.

Para todos os testes estatísticos foi considerado o nível de significância de 5%.

COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO DE SPEARMAN (*Software: SPSS for Windows Versão 11.0*)

Para avaliar o grau de correlação entre os marcadores Ki67, p53, CiD1 e p16^{INK4a} e entre os métodos diagnósticos: histologia, citologia e colposcopia.

ANÁLISE DE CORRESPONDÊNCIA (SOFTWARE: SPAD – SYSTEME PORTABLE POUR L'ANALYSE DES DONNEES – VERSÃO 3.5) :

A utilização desta técnica multivariada tem por objetivo avaliar interrelações existentes entre as expressões dos imunomarcadores p16^{INK4a}, Ki67, Ciclina D1 e o p53 e entre estas e os diversos graus histológicos e a positividade de HIV. Esta técnica servirá para identificar os marcadores mais relacionados com o grau histológico e com a positividade de HIV.

REGRESSÃO LOGÍSTICA BINÁRIA (SOFTWARE: SPSS FOR WINDOWS – VERSÃO 11.0):

Utilizou-se esta modelagem estatística para comparar a eficácia de cada marcador e avaliar o poder preditivo de cada um deles (KIRKWOOD, 1989).

3.7. COMITÊ DE ÉTICA

ESTE ESTUDO FOI APROVADO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISAS DO CPQGM/FIOCRUZ.

4 RESULTADOS

4.1. EXAME HISTOPATOLÓGICO

Os 60 casos foram classificados em: 11 negativos para neoplasia: cervicite crônica + metaplasia escamosa (CC+ME), 15 casos de neoplasia escamosa intraepitelial grau 1 (NIC 1), 10 casos de neoplasia escamosa intraepitelial grau 2 (NIC2), 15 casos de neoplasia escamosa intraepitelial grau 3 (NIC 3) e 9 casos de carcinoma de células escamosas invasivo. A Tabela 3 mostra os resultados histológicos, DNA-HPV e teste para HIV, das 60 pacientes.

4.2. PCR PARA HPV

Entre as sessenta pacientes estudadas, 46 foram positivas, por PCR, para DNA-HPV. Os casos negativos para HPV corresponderam a 6 pacientes com biópsia negativa para neoplasia, 2 das NIC1, 2 casos de NIC3 e 4 casos de carcinoma. Dos casos positivos, foram identificados dois tipos de HPV de baixo risco, 6 e 54, catorze tipos de alto risco oncogênico, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, e 73 e um tipo de provável alto risco oncogênico, o tipo 53.

Tabela 3. Distribuição dos casos de acordo com os resultado histológico, HIV e HPV

| Biópsia | n | HIV + | HIV - | HPV + | HPV - |
|----------------|-----------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| CC+ME | 11 | 4 | 7 | 5 | 6 |
| NIC1 | 15 | 7 | 8 | 13 | 2 |
| NIC2 | 10 | 6 | 4 | 10 | 0 |
| NIC3 | 15 | 3 | 12 | 13 | 2 |
| Ca. Inv* | 9 | 0 | 4 | 5 | 4 |
| TOTAL | 60 | 20 | 35 | 46 | 14 |

(*) Cinco pacientes com carcinoma invasivo não fizeram teste para HIV.

- HPV/HIV: Das 55 pacientes que fizeram o teste para HIV, 20 foram HIV positivas, sendo que destas, todas foram DNA-HPV positivas, com até 5 tipos virais diferentes. Entre as 35 pacientes HIV negativas, observamos infecção com um ou dois tipos de HPV (Tabela 4). Dentre as 20 pacientes HIV positivas, apenas uma paciente declarou ter sido contaminada por uso de drogas intravenosas. As demais (95%), foram contaminadas através das relações sexuais.

Tabela 4. Distribuição do número de tipos de HPV entre pacientes HIV positivas e negativas de acordo com o diagnóstico histológico.

| Número de tipos de HPV | Negativo | | NIC1 | | NIC2 | | NIC3 | | Ca | |
|------------------------|------------|----|------|----|------|----|------|----|----|----|
| | HIV | | | | | | | | | |
| | + | - | + | - | + | - | + | - | + | - |
| Um tipo | 01 | 03 | 04 | 01 | 03 | 03 | 07 | 03 | | 02 |
| Dois tipos | | | 02 | 01 | 01 | 03 | 02 | | | |
| Três tipos | | 01 | | 01 | | | | | | |
| Cinco tipos | | | | 02 | | | | | | |

Tipos presentes: 6*, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53**, 54*, 56, 58, 59, 68, e 73.

(*HPV de baixo risco **HPV de provável alto risco)

4.3. AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA

4.3.1. RESULTADO DA IMUNOISTOQUÍMICA p16^{INK4a}

Observou-se diferença significativa entre os diagnósticos histológicos quanto à frequência de células positivas, à intensidade de reação e o padrão de reação celular (KW, $p < 0,005$).

4.3.1.1. Frequência de células positivas para p16^{INK4a}

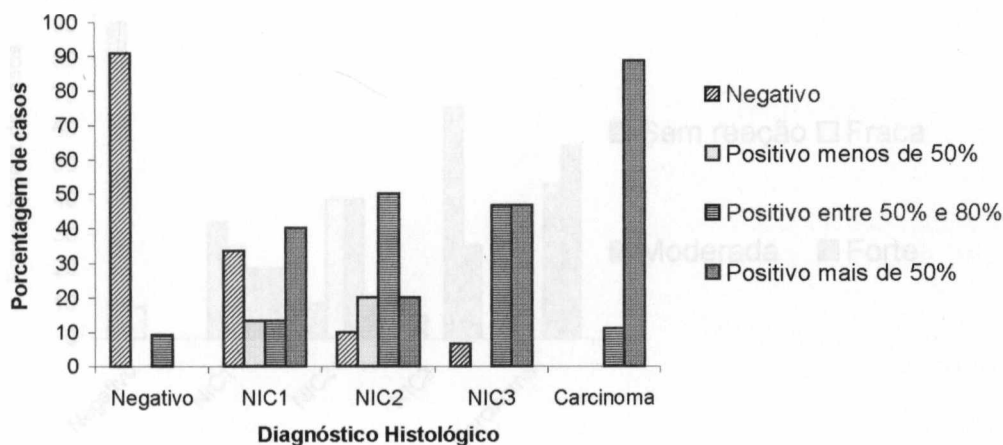
A Tabela 5 mostra que a frequência das células positivas aumentou dos casos negativos para neoplasia, para neoplasia invasiva, com um caso positivo no primeiro grupo e 100% dos casos positivos no grupo dos carcinomas invasivos.

Tabela 5. Distribuição das pacientes quanto ao diagnóstico histológico e frequência de células positivas para p16^{INK4a}.

| Diagnóstico Histológico | Frequência de células positivas para p16 ^{INK4a} | | | | | | | | | |
|-------------------------|---|------|---|------|---|------|---|------|---|---|
| | 0 | | 1 | | 2 | | 3 | | | |
| | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % |
| Negativo | 10 | 90,9 | 0 | - | 1 | 9,1 | 0 | - | | |
| NIC1 | 5 | 33,4 | 2 | 13,3 | 2 | 13,3 | 6 | 40,0 | | |
| NIC2 | 1 | 10,0 | 2 | 20,0 | 5 | 50,0 | 2 | 20,0 | | |
| NIC3 | 1 | 6,6 | 0 | - | 7 | 46,7 | 7 | 46,7 | | |
| Carcinoma | 0 | - | 0 | - | 1 | 11,1 | 8 | 88,9 | | |

No Gráfico 1 são apresentados os resultados da frequência de células positivas para p16^{INK4a} nos diferentes grupos histológicos.

Gráfico 1. Frequência de células positivas para p16^{INK4a} segundo diagnóstico histológico.



4.3.1.2. Intensidade da reação imunoistoquímica para p16^{INK4a}

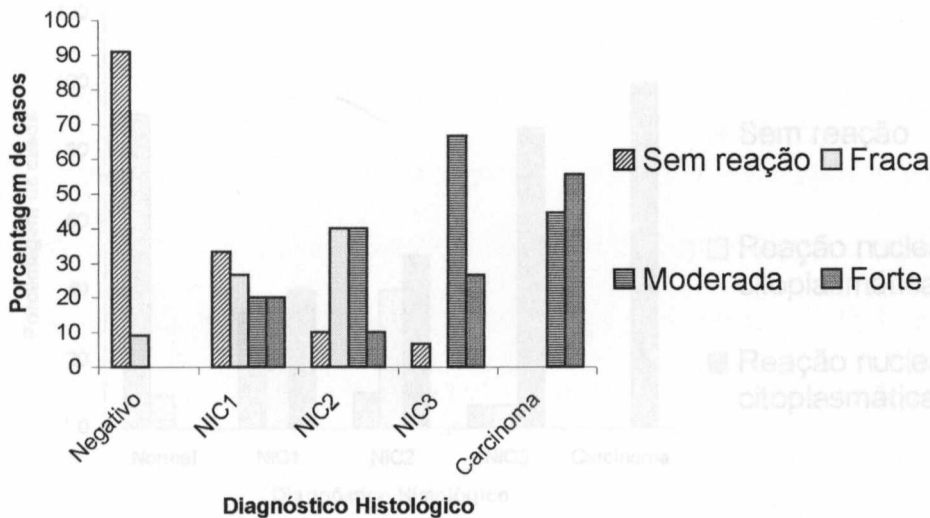
A Tabela 6 mostra intensidade de reação crescente a partir dos casos negativos para neoplasia, em que apenas um caso foi fracamente positivo, para carcinoma invasivo, em que observou-se intensidade moderada e forte.

Tabela 6. Distribuição das pacientes quanto ao grupo histológico e intensidade da reação para moléculas p16^{INK4a}.

| Diagnóstico Histológico | Intensidade da reação (p16) | | | | | | | |
|-------------------------|-----------------------------|------|---|------|----|------|---|------|
| | 0 | | 1 | | 2 | | 3 | |
| | n | % | n | % | n | % | n | % |
| Negativo | 10 | 90,9 | 1 | 9,1 | 0 | - | 0 | - |
| NIC1 | 5 | 33,3 | 4 | 26,7 | 3 | 20,0 | 3 | 20,0 |
| NIC2 | 1 | 10,0 | 4 | 40,0 | 4 | 40,0 | 1 | 10,0 |
| NIC3 | 1 | 6,6 | 0 | - | 10 | 66,7 | 4 | 26,7 |
| Carcinoma | 0 | - | 0 | - | 4 | 44,4 | 5 | 55,6 |

O Gráfico 2 apresenta os resultados da distribuição da intensidade da reação nos diferentes grupos histológicos.

Gráfico 2. Distribuição da intensidade da reação de p16^{INK4a} segundo diagnóstico histológico.



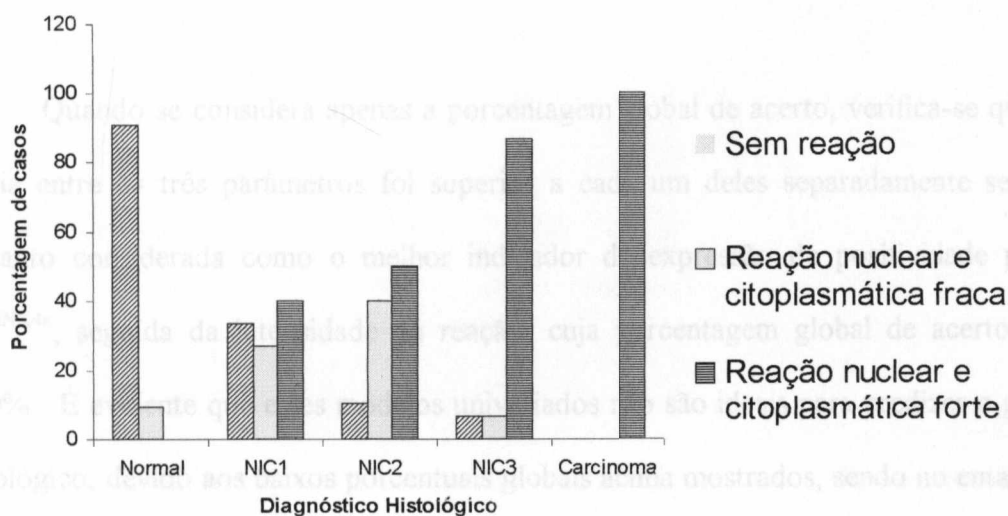
A Tabela 7 mostra que o padrão da reação celular aumenta a intensidade da reação do citoplasma a partir dos casos negativos para neoplasia, em que apenas um caso foi fracamente positivo, para carcinoma invasivo, em que observou-se intensidade citoplasmática moderada a forte. A imunoreação nuclear revela pequena variação.

Tabela 7. Distribuição das pacientes quanto ao grupo histológico e padrão de reação celular para moléculas p16^{INK4a}.

| Diagnóstico Histológico | Padrão da reação celular p16 ^{INK4a} | | | | | |
|-------------------------|---|------|---|------|----|-------|
| | 0 | | 1 | | 2 | |
| | n | % | n | % | n | % |
| Normal | 10 | 90,9 | 1 | 9,1 | 0 | - |
| NIC1 | 5 | 33,3 | 4 | 26,7 | 6 | 40,0 |
| NIC2 | 1 | 10,0 | 4 | 40,0 | 5 | 50,0 |
| NIC3 | 1 | 6,6 | 1 | 6,6 | 13 | 86,8 |
| Carcinoma | 0 | - | 0 | - | 9 | 100,0 |

O Gráfico 3 mostra a distribuição das pacientes quanto ao grupo histológico e padrão de reação celular para moléculas p16^{INK4a}.

Gráfico 3. Distribuição do padrão da reação celular de p16^{INK4a} segundo diagnóstico histológico.



4.3.1.4. Média dos parâmetros de reação para p16^{INK4a}

Para comparar a positividade para p^{16INK4a} em relação a outros marcadores, foi considerada a média entre os parâmetros, frequência de células positivas, intensidade da reação e padrão da reação celular.

Para avaliar a porcentagem de acerto dos parâmetros de expressão da p16^{INK4a}, utilizamos a Regressão Logística Univariada, comparando a frequência de células positivas, a intensidade de reação e o padrão de reação celular para p16^{INK4a} com a média obtida entre estes três parâmetros, que é mostrada na Tabela 8.

Tabela 8. Porcentagem de acerto dos parâmetros, frequência de células positivas, intensidade da reação e padrão de reação para p16^{INK4a} e a média entre eles, segundo o grau histológico.

| Diagnóstico histológico | Porcentagem por parâmetros de expressão de p16^{INK4a} | | | |
|--------------------------------|---|--------------------|---------------|--------------|
| | Frequência | Intensidade | Padrão | Média |
| Negativo | 90,9% | 90,9% | 90,9% | 90,9% |
| NIC1 | 26,7% | 33,3% | 20,0% | 26,7% |
| NIC2 | 0,0% | 0,0% | 0,0% | 0,0% |
| NIC3 | 86,7% | 66,7% | 46,7% | 80,0% |
| Ca. inv. | 00,0% | 55,6% | 88,9% | 55,6% |
| Porcentagem global | 45,0% | 50,0% | 46,7% | 51,7% |

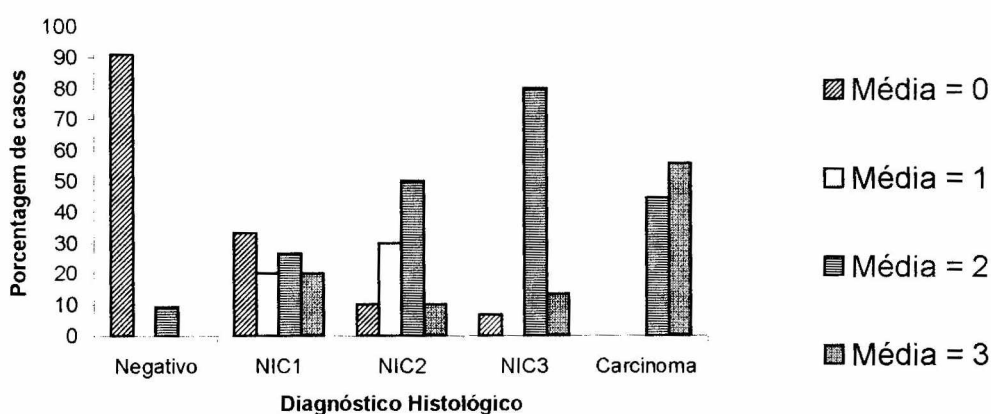
Quando se considera apenas a porcentagem global de acerto, verifica-se que a média entre os três parâmetros foi superior a cada um deles separadamente sendo portanto considerada como o melhor indicador da expressão de positividade para p16^{INK4a}, seguida da intensidade da reação, cuja porcentagem global de acerto foi 50,0%. É evidente que estes modelos univariados não são ideais para predizer o grau histológico, devido aos baixos percentuais globais acima mostrados, sendo no entanto, adotados para avaliar o poder preditivo de cada um destes parâmetros.

A partir deste resultado, utilizou-se a média entre a frequência de células positivas, a intensidade de reação e o padrão de reação celular para considerar a positividade de p16^{INK4a} em relação ao diagnóstico histológico, como é mostrada na Tabela 9 e no Gráfico 4, e para comparação com outros marcadores estudados neste trabalho. Existe diferença entre os diagnósticos histológicos quanto à média de positividade para p16^{INK4a} (KW, $p < 0,005$).

Tabela 9. Distribuição das pacientes quanto ao grupo histológico e a positividade para p16^{INK4a}.

| Diagnóstico Histológico | Positividade (Escores médios) para p16 ^{INK4a} | | | | | | | |
|-------------------------|---|------|---|------|----|------|---|------|
| | 0 | | 1 | | 2 | | 3 | |
| | n | % | n | % | n | % | n | % |
| Negativo | 10 | 90,9 | 0 | - | 1 | 9,1 | 0 | - |
| NIC1 | 5 | 33,3 | 3 | 20,0 | 4 | 26,7 | 3 | 20,0 |
| NIC2 | 1 | 10,0 | 3 | 30,0 | 5 | 50,0 | 1 | 10,0 |
| NIC3 | 1 | 6,7 | 0 | - | 12 | 80,0 | 2 | 13,3 |
| Carcinoma | 0 | - | 0 | - | 4 | 44,4 | 5 | 55,6 |

Gráfico 4. Distribuição de p16^{INK4a} (média) segundo diagnóstico histológico.



Quando se considera os parâmetros de reação para p16^{INK4a}, frequência das células positivas, intensidade de reação e padrão de reação celular para p16^{INK4a}, utilizou-se ainda procedimentos não-paramétricos de Dunn e de Holms para verificar

a igualdade entre os pares de grupos. Comparando os pares, constatamos que são significativamente diferentes os grupos negativo/NIC1 e NIC1/NIC2. Não se observou diferença entre NIC2/NIC3 e NIC3/carcinoma.

A Tabela 10 mostra que a infecção por quantidade diferentes de tipos de HPV, não difere em relação à positividade para p16^{INK4a} ($p = 0,1770$).

Tabela 10. Distribuição das pacientes quanto ao número de tipos de HPV e positividade para p16^{INK4a}

| Número de tipos de HPV | Positividade p16 ^{INK4a} | | | | | | | |
|------------------------|-----------------------------------|------|---|------|---|------|----|-------|
| | 0 | | 1 | | 2 | | 3 | |
| | n | % | n | % | n | % | n | % |
| Um tipo | 6 | 20,7 | 3 | 10,4 | 9 | 31,0 | 11 | 37,9 |
| Dois tipos | 1 | 10,0 | 1 | 10,0 | 5 | 50,0 | 3 | 30,0 |
| Três tipos | 0 | - | 0 | - | 0 | - | 2 | 100,0 |
| Cinco tipos | 0 | - | 0 | - | 0 | - | 2 | 100,0 |

Observação: Em três pacientes HPV positivas não foi detectado o tipo de vírus.

Empregando este teste os dados não proporcionam evidência de diferença de positividade para p16^{INK4a}, no que tange à presença ou não de HIV ($p=0,4629$).

Os epitélios escamosos e glandulares normais presentes nas amostras, adjacentes à lesão ou área escolhida para estudo (nos casos negativos) não expressaram p16^{INK4a}.

4.3.2 CICLINA D1

Observou-se diferença entre os grupos histológicos quanto à expressão de ciclina D1 (KW, $p<0,005$).

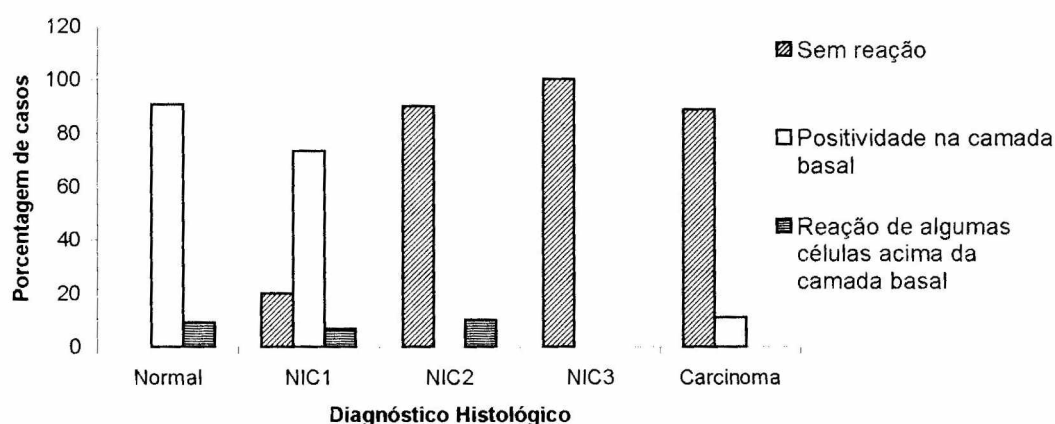
A Tabela 11 e o Gráfico 5 mostram relação inversa entre positividade para ciclina D1 e a progressão da carcinogênese, sendo todos os casos normais e a maioria

das NIC1 positiva para esta proteína, enquanto a maior parte das NIC2, todas NIC3 e carcinoma negativas para esta proteína.

Tabela 11. Distribuição das pacientes quanto ao diagnóstico histológico e padrão de expressão de ciclina D1.

| Diagnóstico Histológico | Padrão de expressão de ciclina D1 | | | | | |
|-------------------------|-----------------------------------|-------|----|------|---|------|
| | 0 | | 1 | | 2 | |
| | n | % | n | % | n | % |
| Normal | 0 | - | 10 | 90,9 | 1 | 9,1 |
| NIC1 | 3 | 20,0 | 11 | 73,3 | 1 | 6,7 |
| NIC2 | 9 | 90,0 | 0 | - | 1 | 10,0 |
| NIC3 | 15 | 100,0 | 0 | - | 0 | - |
| Carcinoma | 8 | 88,9 | 1 | 11,1 | 0 | - |

Gráfico 5. Distribuição de Ciclina D1 segundo diagnóstico histológico.



4.3.3.P53

Existe diferença entre os diagnósticos histológicos quanto à positividade de p53 (KW, $p < 0,005$).

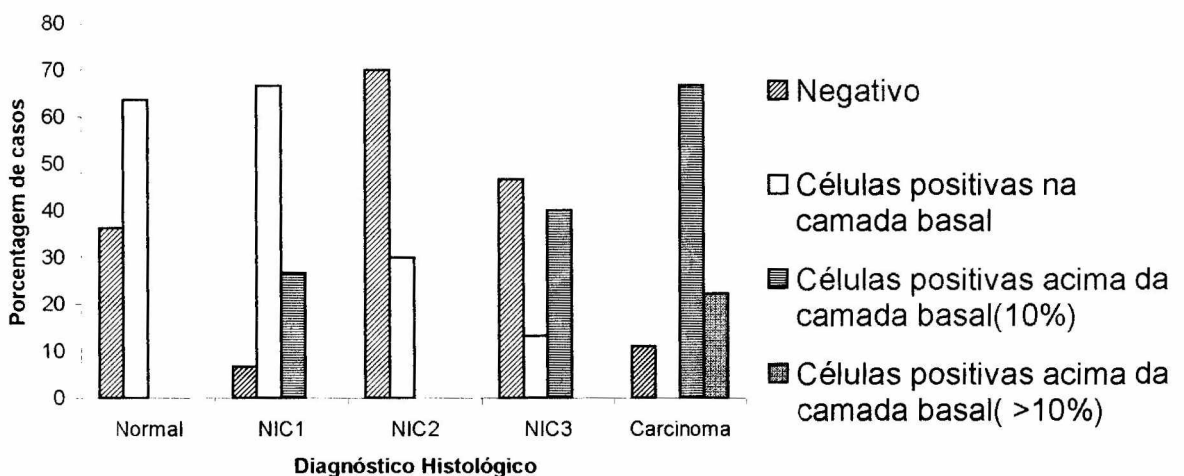
A Tabela 12 e o Gráfico 6 mostram que 63% dos casos normais mostraram positividade nuclear nas camadas basal e parabasal. Cerca de 90% dos casos de NIC1

foram positivos. Entre os casos de NIC2, 30% foram positivos para p53 no terço inferior do epitélio. Entre as NIC3, 53,3% foram positivos entre 10 e 50%.

Tabela 12. Distribuição das pacientes quanto ao diagnóstico histológico e expressão da p53.

| Diagnóstico Histológico | Expressão da p53 | | | | | | | |
|-------------------------|------------------|------|----|------|---|------|---|------|
| | 0 | | 1 | | 2 | | 3 | |
| | n | % | n | % | n | % | n | % |
| Normal | 4 | 36,4 | 7 | 63,6 | 0 | - | 0 | - |
| NIC1 | 1 | 6,7 | 10 | 66,6 | 4 | 26,7 | 0 | - |
| NIC2 | 7 | 70,0 | 3 | 30,0 | 0 | - | 0 | - |
| NIC3 | 7 | 46,7 | 2 | 13,3 | 6 | 40,0 | 0 | - |
| Carcinoma | 1 | 11,1 | 0 | - | 6 | 66,7 | 2 | 22,2 |

Gráfico 6. Distribuição de p53 segundo diagnóstico histológico.



4.3.4. Ki67

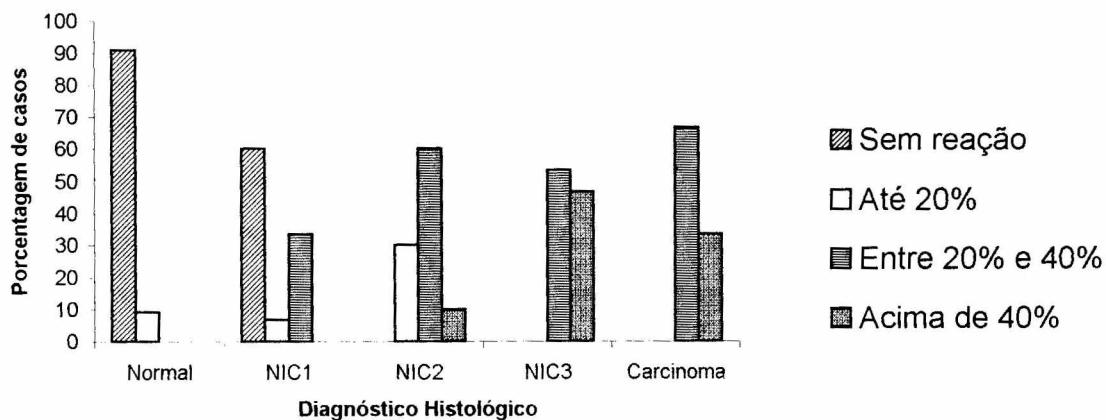
Observou-se diferença entre os diagnósticos histológicos quanto à positividade de Ki67 (KW, $p < 0,005$)

Como observa-se na Tabela 13 e no Gráfico 7, todos os casos mostraram reação para este anticorpo, no entanto, só sendo considerados positivos os casos com coloração nuclear nos dois terços superiores do epitélio. O índice de proliferação teve aumento diretamente proporcional à progressão da gravidade das lesões.

Tabela 13. Distribuição das pacientes quanto ao grupo histológico e Ki67.

| Diagnóstico Histológico | Ki67 | | | | | | | |
|-------------------------|------|------|---|------|---|------|---|------|
| | 0 | | 1 | | 2 | | 3 | |
| | n | % | n | % | n | % | n | % |
| Normal | 10 | 90,9 | 1 | 9,1 | 0 | - | 0 | - |
| NIC1 | 9 | 60,0 | 1 | 6,7 | 5 | 33,3 | 0 | - |
| NIC2 | 0 | - | 3 | 30,0 | 6 | 60,0 | 1 | 10,0 |
| NIC3 | 0 | - | 0 | - | 8 | 53,3 | 7 | 46,7 |
| Carcinoma | 0 | - | 0 | - | 6 | 66,7 | 3 | 33,3 |

Gráfico 7. Distribuição de Ki67 segundo diagnóstico histológico.



4.3.5. COMPARAÇÃO ENTRE P16^{INK4a}, CICLINA D1, P53 E KI67

Após análise da expressão individual das proteínas do ciclo celular p16^{INK4a}, ciclina D1, p53 e Ki67, utilizamos testes estatísticos com o objetivo de avaliá-las comparativamente. A Tabela 14 mostra a distribuição da positividade destes marcadores em relação ao diagnóstico histológico.

Tabela 14. Positividade para marcadores p16^{INK4a}, ciclina D1, p53 e Ki67

| | p16 ^{INK4a} | ciclina D1 | p53 | Ki 67 |
|-----------|----------------------|------------|-------|--------|
| Negativo | 9,1% | 100,0% | 63,6% | 9,1 % |
| NIC1 | 66,6% | 80,0% | 93,3% | 40,0% |
| NIC2 | 90,0% | 10,0% | 30,0% | 100,0% |
| NIC3 | 93,3% | 0,0% | 53,3% | 100,0% |
| Carcinoma | 100,0% | 11,1% | 88,9% | 100,0% |

Gráfico 8. Distribuição da positividade para os marcadores.

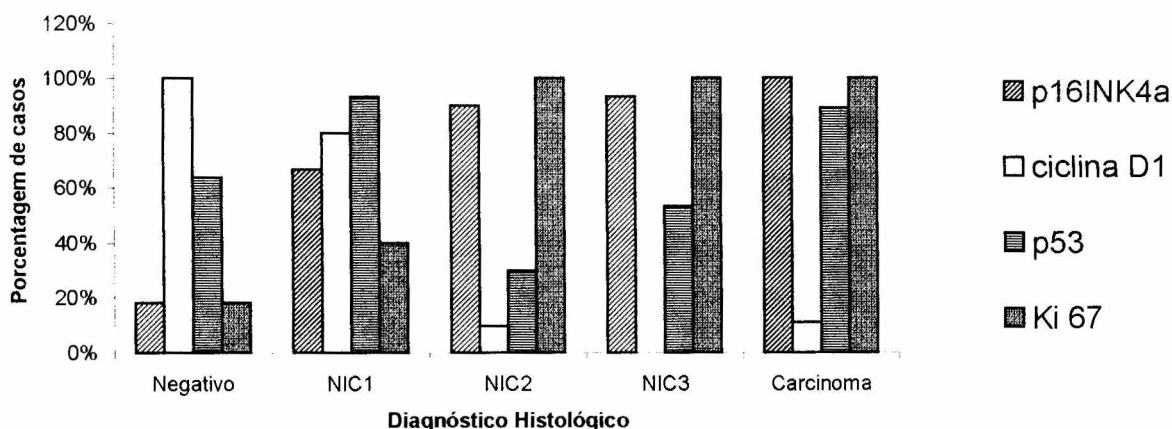


Figura 6. A. Caso 7, paciente HIV positiva e HPV positiva, tipos 68, 73 e 84.

A1. Epitélio normal HE; A2. p16^{INK4a} positivo (escore 2); A3. ciclina D1 positiva (escore 1); A4. p53. negativa a5. Ki67 negativo(escore 1).

B. Caso 51, paciente HIV positiva e HPV positiva, tipos 35, 45, 52, 53 e 54.

B1. NIC1, HE; B2. p16^{INK4a} positivo (3); B3. ciclina D1 positiva (1); B4. p53. positivo (1) B5. Ki67 positivo (2).

C.Caso 28, paciente HIV negativa e HPV positiva, tipo 35. C1.NIC2, HE; C2.

p16^{INK4a} positivo(2); C3. ciclina D1 negativa; C4. p53. positivo (1) C5. Ki67 positivo(2).

D.Caso59, paciente HIV negativa e HPV positiva. D1. carcinoma de células

escamosas invasivo, HE; D2. p16^{INK4a} positivo(3); D3. ciclina D1 negativa; D4. p53. positivo (3) D5. Ki67 positivo(3).

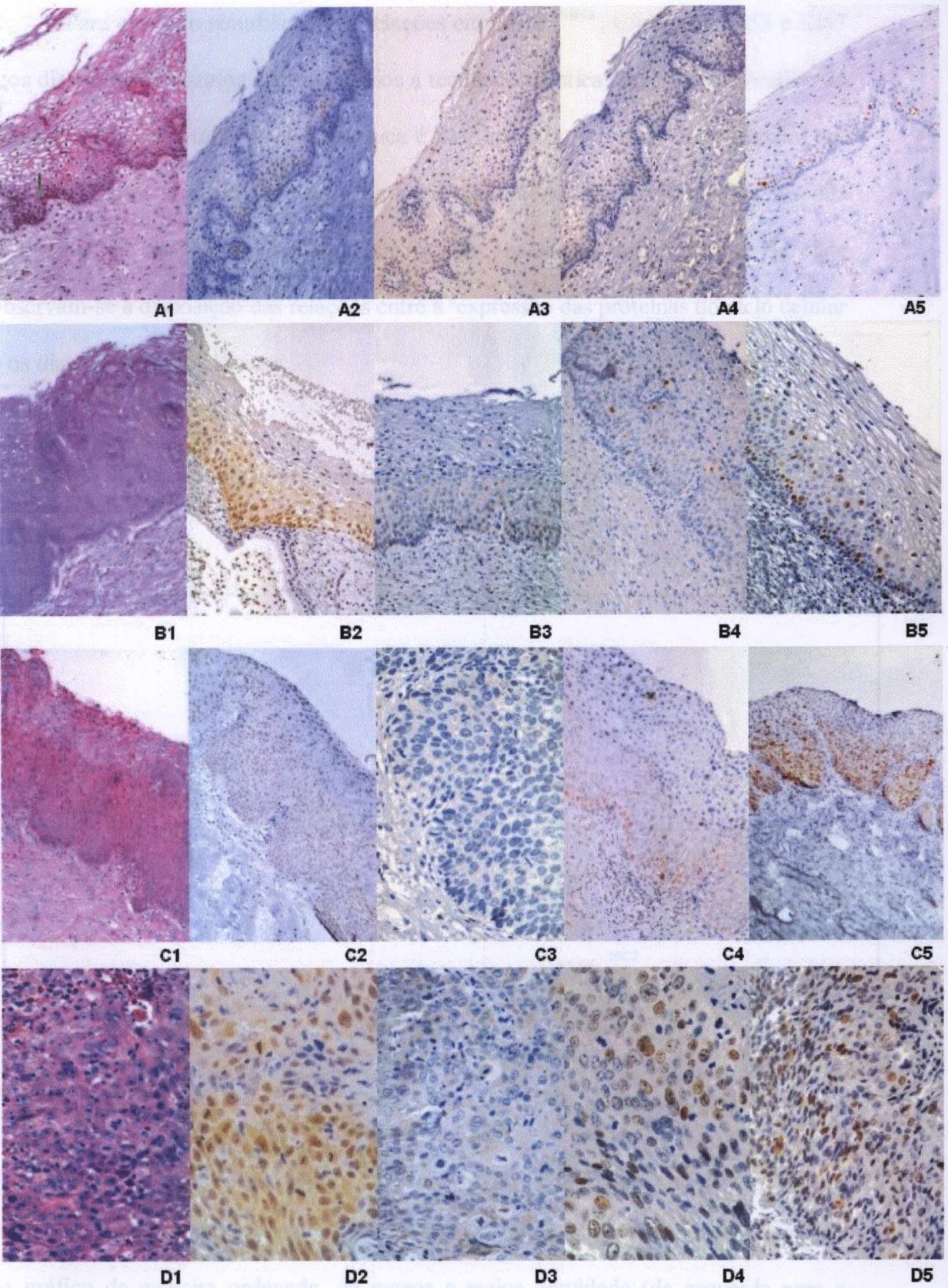
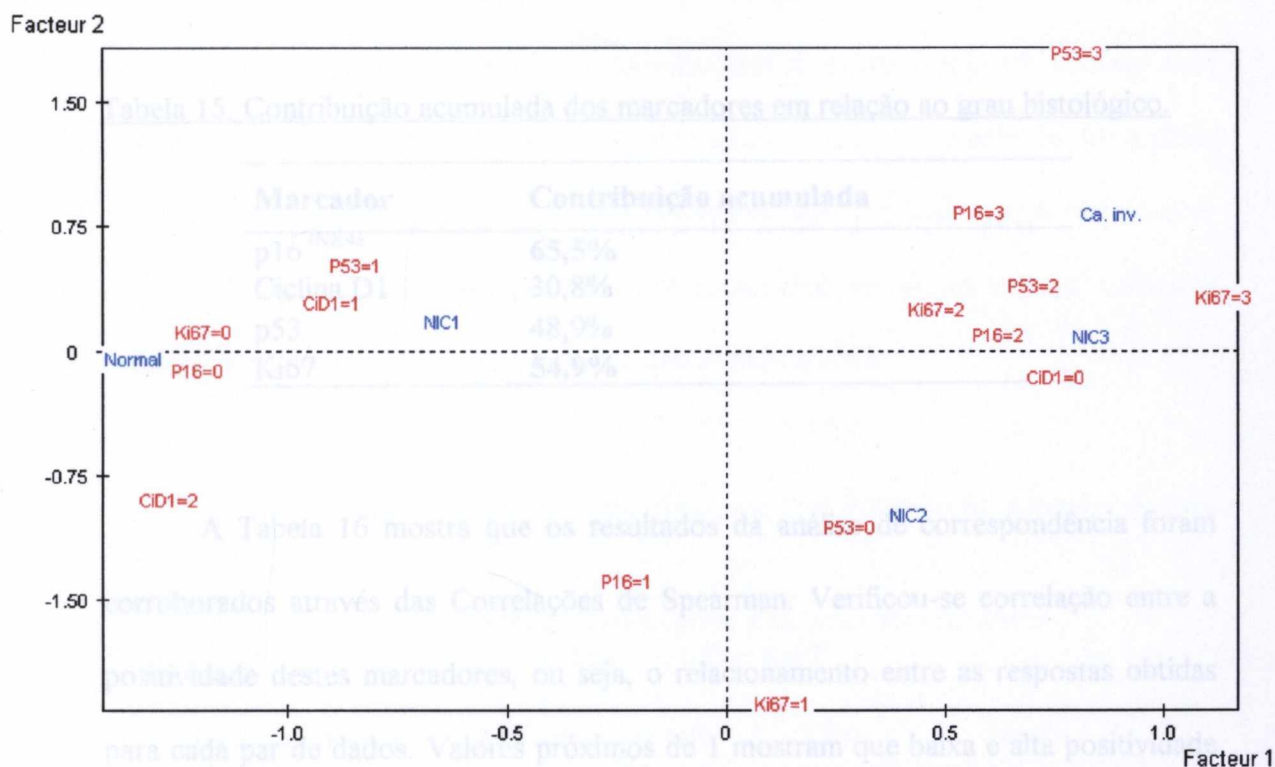


Figura 6 Expressão das proteínas do ciclo celular (ver descrições na página contra-lateral).

Para o estudo simultâneo das relações entre p16^{INK4a}, Ciclina D1, p53 e Ki67 e os diagnósticos histológicos, utilizamos a técnica estatística descritiva da Análise de Correspondências Múltiplas. Esta técnica é indicada para o estudo das inter-relações existentes entre as diversas categorias num conjunto de variáveis qualitativas. Os resultados da análise de correspondência são apresentados no Gráfico 9, onde observam-se a disposição das relações entre a expressão das proteínas do ciclo celular e os diagnósticos histológicos.

Gráfico 9. Relação entre o grau histológico e a imunopositividades para p16^{INK4a}, Ciclina D1, p53 e Ki67.



O primeiro eixo fatorial é definido pelo diagnóstico histológico, que aparece no gráfico de maneira ordenada, da menor a maior gravidade (da esquerda para a direita).

A proximidade, no primeiro eixo fatorial de dois marcadores, traduz graficamente uma forte associação, denotando que existe semelhança entre eles. A expressão de p16^{INK4a} e Ki67 encontra-se disposta seguindo o mesmo sentido do grau histológico. Já a ciclina D1 apresenta-se no sentido oposto à gravidade do grau histológico para este primeiro eixo.

Nesta análise pode-se utilizar a contribuição acumulada nos dois primeiros eixos como uma medida de associação entre a positividade para estas moléculas e a gravidade do diagnóstico histológico. Desta forma, observa-se na Tabela 15, que o p16^{INK4a} e o Ki67 são as que apresentam maior associação com o diagnóstico histológico, com contribuições acumuladas de 65,5% e 54,9%, respectivamente.

Tabela 15. Contribuição acumulada dos marcadores em relação ao grau histológico.

| Marcador | Contribuição acumulada |
|----------------------|-------------------------------|
| p16 ^{INK4a} | 65,5% |
| Ciclina D1 | 30,8% |
| p53 | 48,9% |
| Ki67 | 54,9% |

A Tabela 16 mostra que os resultados da análise de correspondência foram corroborados através das Correlações de Spearman. Verificou-se correlação entre a positividade destes marcadores, ou seja, o relacionamento entre as respostas obtidas para cada par de dados. Valores próximos de 1 mostram que baixa e alta positividade de ambos marcadores crescem no mesmo sentido, o que ficou melhor evidenciado entre p16^{INK4a} e Ki67 = 0,623. Valores próximos a -1 indicam que baixa positividade de um marcador aponta para uma alta positividade do outro, o que foi constatado neste estudo entre p16^{INK4a} e ciclina D1 = -0,448.

Tabela 16. Correlações de Spearman entre os marcadores p16^{INK4a}, Ciclina D1, p53 e Ki67

| | p16^{INK4a} | CiclinaD1 | P53 | Ki67 |
|----------------------------|----------------------------|------------------|------------|--------------|
| P16^{INK4a} | 1,000 | -0,448 | 0,186 | 0,623 |
| CiD1 | -0,448 | 1,000 | -0,006 | -0,661 |
| p53 | 0,186 | -0,006 | 1,000 | 0,134 |
| Ki67 | 0,623 | -0,661 | 0,134 | 1,000 |

A Tabela 17 mostra, através dos modelos de regressão logística univariados, ajustados com cada um dos quatro marcadores separadamente, por meio das porcentagens globais de acerto, que os graus histológicos prognosticados pelo modelo, utilizando a variável p16^{INK4a}, foram os que mais corresponderam com os diagnósticos observados nesta amostra. Ainda neste contexto, a segunda variável com melhor poder preditivo foi o Ki67, confirmando o que foi mostrado na análise anterior. Estes modelos univariados não são ideais para prever o grau histológico, devido aos baixos percentuais globais acima mostrados, sendo, no entanto, adotados para avaliar o poder preditivo de cada um destes marcadores.

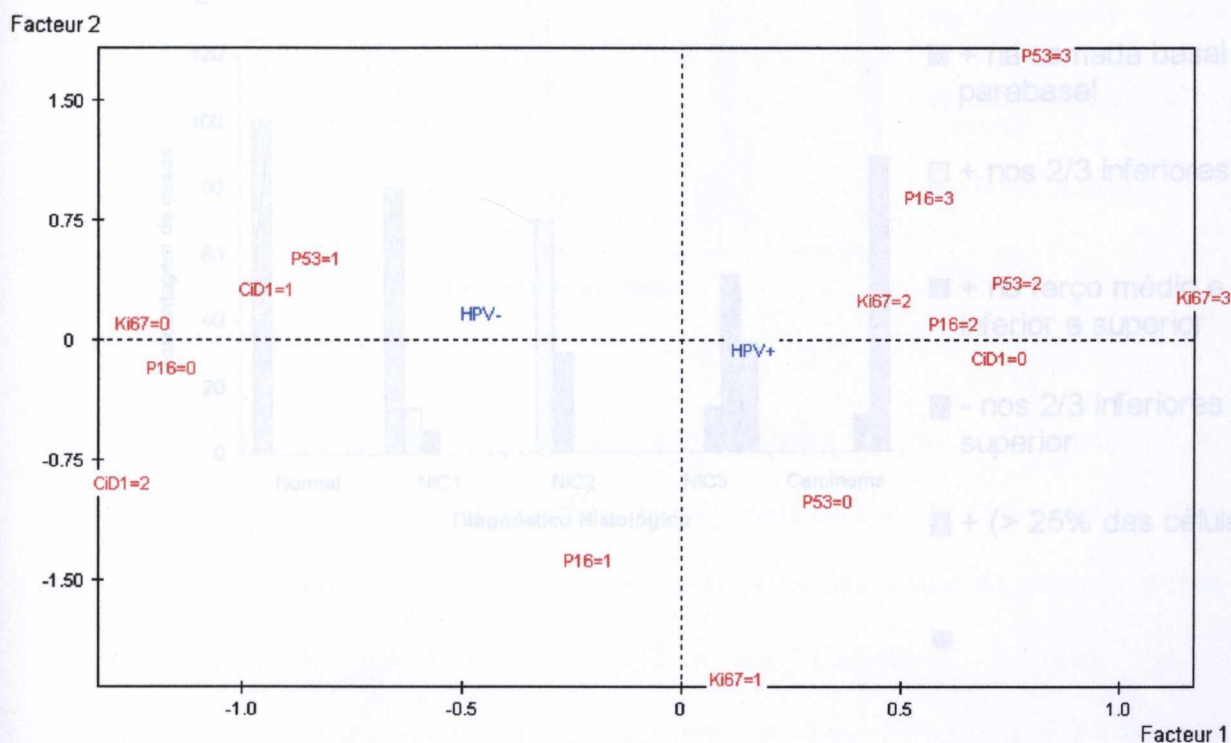
Tabela 17. Poder preditivo positivo de cada um dos marcadores segundo o grau histológico

| | porcentagem de acertos dos imunomarcadores p16^{INK4a}, Ciclina D1, p53 e Ki67 | | | |
|---------------------------|---|--------------|------------|-------------|
| Grau histológico | Média (P16) | Ci D1 | P53 | Ki67 |
| Normal | 90,9% | 9,1% | 0,0% | 90,9% |
| NIC1 | 26,7% | 73,3% | 66,7% | 0,0% |
| NIC2 | 0,0% | 0,0% | 70,0% | 30,0% |
| NIC3 | 80,0% | 100,0% | 0,0% | 100,0% |
| Ca. inv. | 55,6% | 0,0% | 88,9% | 0,0% |
| Porcentagem global | 51,7% | 45,0% | 41,7% | 46,7% |

Tanto na análise de correspondência como nos modelos de regressão logística, o anticorpo monoclonal p16^{INK4a}, seguido do Ki67 mostraram melhores resultados que o p53 e ciclina D1 em relação ao diagnóstico histológico, sendo pois selecionados para compor um painel de imunomarcção para lesões cervicais, que será abordado adiante.

Utilizando a Análise de Correspondência observou-se que a presença de HPV não se mostrou correlacionada com nenhum dos dois eixos (Gráfico10). Porém, observa-se diferença entre pacientes HPV positivas e negativas, sendo possível demonstrar associação entre baixa positividade dos marcadores p16^{INK4a}, Ki67 e p53 e negatividade para HPV. Por outro lado, a expressão mais elevada destes marcadores está associada à positividade para HPV. Exceção à ciclina D1, cuja expressão é o inverso dos demais marcadores.

Gráfico 10. Relação entre a positividade HPV e expressão de p16^{INK4a}, ciclina D1, p53 e Ki67.



Com a Análise de Correspondência não é possível fazer interpretações referentes ao *status* do HIV destas pacientes.

4.3.6.MOLÉCULAS DE ADESÃO

Verificou-se que existe diferença quanto ao padrão e a intensidade de reação para CD44v5 e CD44v6 entre os grupos histológicos (KW, $p<0,005$).

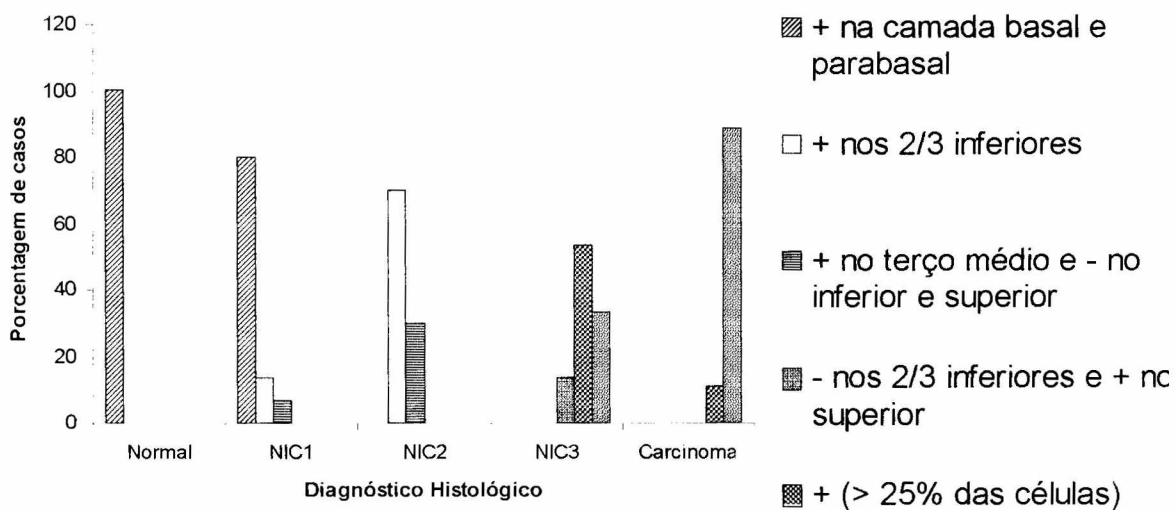
4.3.6.1.Padrão de reação de CD44v5

A Tabela 18 e o Gráfico 11 mostram alteração da expressão da CD44v5 durante a progressão da carcinogênese.

Tabela 18. Padrão de reação para CD44v5 em relação ao diagnóstico histológico

| Diagnóstico Histológico | Padrão de reação para CD44v5 | | | | | | | | | | | |
|-------------------------|------------------------------|------|---|------|---|------|---|------|---|------|---|------|
| | 1 | | 2 | | 3 | | 4 | | 5 | | 6 | |
| | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % |
| Normal | 11 | 100 | 0 | - | 0 | - | 0 | - | 0 | - | 0 | - |
| NIC1 | 12 | 80,0 | 2 | 13,3 | 1 | 6,7 | 0 | - | 0 | - | 0 | - |
| NIC2 | 0 | - | 7 | 70,0 | 3 | 30,0 | 0 | - | 0 | - | 0 | - |
| NIC3 | 0 | - | 0 | - | 0 | - | 2 | 13,3 | 8 | 53,4 | 5 | 33,3 |
| Carcinoma | 0 | - | 0 | - | 0 | - | 0 | - | 1 | 11,1 | 8 | 88,9 |

Gráfico 11. Distribuição do padrão de reação de CD44v5 segundo diagnóstico histológico.



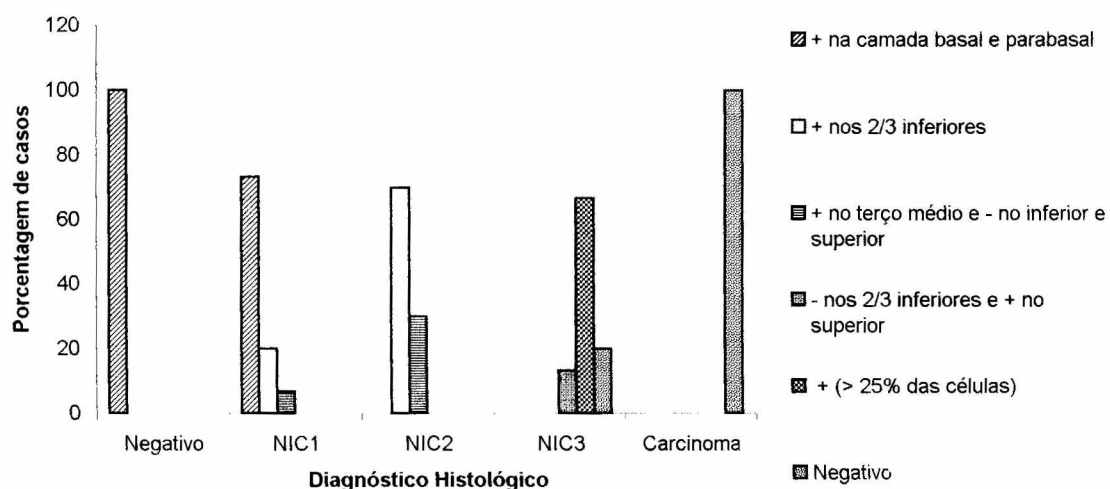
4.3.6.2. Padrão de reação de CD44v6

A Tabela 19 e o Gráfico 12 (ver também Figura 5) mostram alteração da expressão da CD44v6 durante o aumento da gravidade das lesões cervicais.

Tabela 19. Padrão de reação para CD44v6 em relação ao diagnóstico histológico.

| Diagnóstico Histológico | Padrão de reação para CD44v6 | | | | | | | | | | | |
|-------------------------|------------------------------|------|---|------|---|------|---|------|----|------|---|------|
| | 1 | | 2 | | 3 | | 4 | | 5 | | 6 | |
| | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % |
| Negativo | 11 | 100 | 0 | - | 0 | - | 0 | - | 0 | - | 0 | - |
| NIC1 | 11 | 73,3 | 3 | 20,0 | 1 | 6,7 | 0 | - | 0 | - | 0 | - |
| NIC2 | 0 | - | 7 | 70,0 | 3 | 30,0 | 0 | - | 0 | - | 0 | - |
| NIC3 | 0 | - | 0 | - | 0 | - | 2 | 13,3 | 10 | 66,7 | 3 | 20,0 |
| Carcinoma | 0 | - | 0 | - | 0 | - | 0 | - | 0 | - | 9 | 100 |

Gráfico 12. Distribuição do padrão de reação de CD44v6 segundo diagnóstico histológico.



Como os grupos histológicos diferiram quanto ao padrão de expressão de CD44v5 e CD44v6, testou-se quais grupos histológicos diferem entre si. Nas comparações dois a dois, o procedimento de Dunn indicou igualdade entre os grupos histológicos: Normal/NIC1; NIC1/NIC2 e NIC3/Carcinoma, enquanto que o procedimento de Holms mostrou igualdade entre os grupos Normal/NIC1. Levando-se

em consideração os dois testes, depreende-se que existe um “ ponto de corte” entre NIC2 e NIC3 (Dunn), e NIC1 e NIC2 (Holmes).

Comparando o padrão de reação de CD44v5 e CD44v6 não houve diferença com significância estatística (TW, $p= 0,450$).

Quando se observa o padrão de reação das CD44v5 e CD44v6, nos casos negativos para neoplasia e nas NICs, nota-se que a imunomarcção das células parabasais é constante, variando a intensidade, enquanto que as células basais podem mostrar expressão focal, positividade difusa ou serem negativas.

Quarenta e um casos tiveram tecido endocervical, representado por glândulas bem preservadas. Nenhum mostrou positividade glandular para CD44v6, porém, 29,3% dos casos foram positivos para CD44v5.

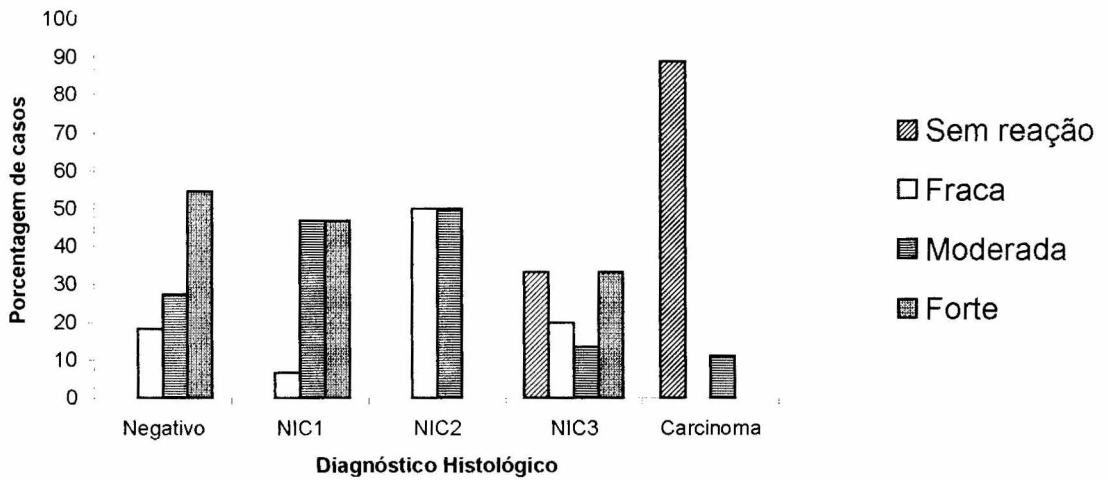
4.3.6.3. Intensidade da reação de CD44v5

A Tabela 20 e o Gráfico 13 mostram que a intensidade da reação de CD44v5 decresce com a progressão da gravidade das lesões.

Tabela 20. Intensidade da reação para CD44v5 em relação ao diagnóstico histológico

| Diagnóstico Histológico | Intensidade da reação para CD44v5 | | | | | | | |
|----------------------------|-----------------------------------|------|---|------|---|------|---|------|
| | 0 | | 1 | | 2 | | 3 | |
| | n | % | n | % | n | % | n | % |
| Negativo | 0 | - | 2 | 18,2 | 3 | 27,3 | 6 | 54,5 |
| NIC1 | 0 | - | 1 | 6,6 | 7 | 46,7 | 7 | 46,7 |
| NIC2 | 0 | - | 5 | 50,0 | 5 | 50,0 | 0 | - |
| NIC3 | 5 | 33,3 | 3 | 20,0 | 2 | 13,4 | 5 | 33,3 |
| Carcinoma | 8 | 88,9 | 0 | - | 1 | 11,1 | 0 | - |

Gráfico 13. Distribuição da intensidade da reação de CD44v5 segundo diagnóstico histológico.



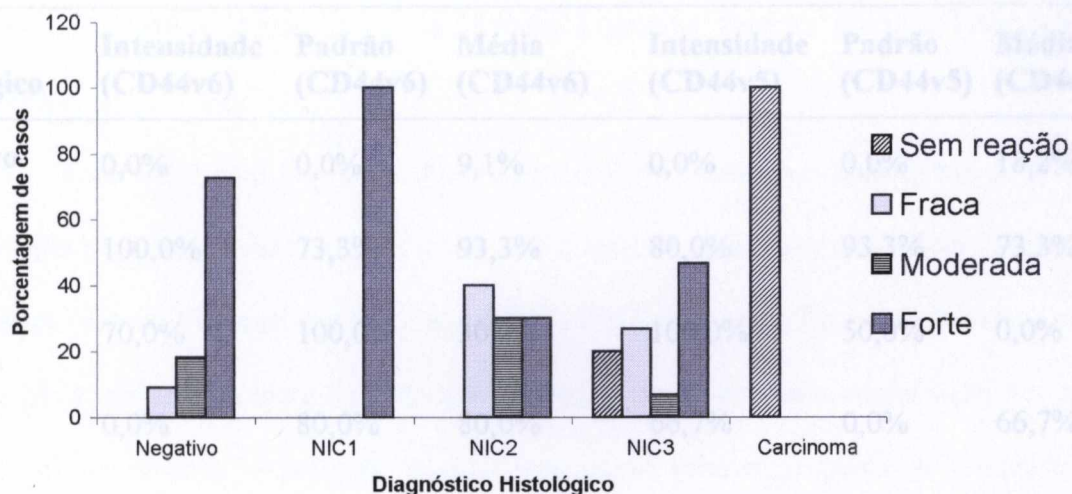
4.3.6.4. Intensidade da reação de CD44v6

A Tabela 21 e o Gráfico 14 mostram a intensidade da reação de CD44v6 decresce com a progressão da gravidade das lesões.

Tabela 21. Intensidade da reação para CD44v6 em relação ao diagnóstico histológico

| Diagnóstico Histológico | Intensidade da reação para CD44v6 | | | | | | | |
|-------------------------|-----------------------------------|-------|---|------|---|------|----|------|
| | 0 | | 1 | | 2 | | 3 | |
| | n | % | n | % | n | % | n | % |
| Negativo | 0 | - | 1 | 9,1 | 2 | 18,2 | 8 | 72,7 |
| NIC1 | 0 | - | 0 | - | 0 | - | 15 | 100 |
| NIC2 | 0 | - | 4 | 40,0 | 3 | 30,0 | 3 | 30,0 |
| NIC3 | 3 | 20,0 | 4 | 26,7 | 1 | 6,6 | 7 | 46,7 |
| Carcinoma | 9 | 100,0 | 0 | - | 0 | - | 0 | - |

Gráfico 14. Distribuição da intensidade da reação de CD44v6 segundo diagnóstico histológico.



Comparando a intensidade da reação com CD44v5 e CD44v6, observou-se que existe diferença entre os diagnósticos histológicos.

Não houve diferença entre a expressão de CD44v5 e CD44v6 e a positividade para HPV e HIV.

Para avaliar a porcentagem de acerto dos parâmetros de expressão de CD44v5 e CD44v6, utilizou-se a Regressão Logística Univariada, comparando a o padrão e a intensidade de reação dos dois marcadores com as médias obtidas entre estes dois parâmetros, como se observa na Tabela 22.

Tabela 22. Porcentagem de acerto dos marcadores, Intensidade da CD44v6 e CD44v5, Padrão da CD44v6 e CD44v5 e suas médias segundo o grau histológico.

| Porcentagem de acerto dos marcadores CD44v6 e CD44v5, Padrão da CD44v6 e CD44v5 e suas médias | | | | | | |
|--|-----------------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------------|------------------------|-----------------------|
| Grau histológico | Intensidade (CD44v6) | Padrão (CD44v6) | Média (CD44v6) | Intensidade (CD44v5) | Padrão (CD44v5) | Média (CD44v5) |
| Negativo | 0,0% | 0,0% | 9,1% | 0,0% | 0,0% | 18,2% |
| NIC1 | 100,0% | 73,3% | 93,3% | 80,0% | 93,3% | 73,3% |
| NIC2 | 70,0% | 100,0% | 30,0% | 100,0% | 50,0% | 0,0% |
| NIC3 | 0,0% | 80,0% | 80,0% | 66,7% | 0,0% | 66,7% |
| Ca. inv. | 100,0% | 100,0% | 100,0% | 88,9% | 88,9% | 88,9% |
| Porcentagem global | 51,7% | 70,0% | 65,0% | 66,7% | 45,0% | 51,7% |

Com este teste, observamos que o padrão de imunomarcção com o anticorpo monoclonal CD44v6 é melhor marcador de progressão que a intensidade da reação deste marcador e superior ao padrão de reação do CD44v5. Selecionamos o padrão de expressão da molécula de adesão CD44v6 como o terceiro imunomarcador, para constituir o painel imunoistoquímico para o diagnóstico de lesões pré-cancerosas e câncer do colo uterino, juntamente com os anticorpos monoclonais para as proteínas do ciclo celular, p16^{INK4a} e Ki67.

4.3.7 PAINEL PARA EXAME IMUNOISTOQUÍMICO DE LESÕES PRÉ-CANCEROSAS E CÂNCER DO COLO UTERINO: P16^{INK4A}, KI67 E CD44V6

A partir do estudo, através dos modelos de regressão logística univariados, da expressão das proteínas do ciclo celular, p16^{INK4a}, ciclina D1, p53 e Ki67 e das

moléculas de adesão CD44v5 e CD44v6, verificamos, pelas porcentagens globais de acerto, que os melhores marcadores para serem utilizados conjuntamente para exame imunohistoquímico de lesões pré-cancerosas e câncer do colo uterino foram: p16^{INK4a}, Ki67 e CD44v6. Desta forma, o Modelo Logístico Binário utilizará estas três variáveis.

Com o Modelo Logístico Binário procuramos estimar a probabilidade de uma paciente pertencer a cada um dos grupos de diagnósticos histológicos, observados os valores (escores) para os marcadores p16^{INK4a}, Ki67 e CD44v6. Este modelo estima as probabilidades da paciente ter uma das patologias considerando a combinação destes marcadores. Assim, o primeiro modelo terá como variável resposta se a paciente pertence ou não ao grupo histológico negativo para neoplasia, o segundo modelo se a paciente pertence ou não ao grupo NIC1, NIC2, NIC3 e carcinoma invasivo. As variáveis explicativas serão os marcadores selecionados, p16^{INK4a}, Ki67 e CD44v6. A Tabela 23 mostra as combinações que ocorreram neste estudo.

Tabela 23. Combinações dos resultados da expressão dos marcadores observadas na amostra estudada.

| Grau Histológico (observado) | Marcadores | | | Probabilidades estimadas | | | | | Grau predito |
|------------------------------|------------|------|--------|--------------------------|--------|---------|---------|----------|--------------|
| | P16 | Ki67 | CD44v6 | Negativo | NIC1 | NIC2 | NIC3 | Ca. Inv. | |
| Negativo | 0 | 0 | 1 | 81,82% | 36,66% | 0,00% | 0,00% | 0,00% | Negativo |
| Negativo | 0 | 1 | 1 | 100,00% | 21,37% | 0,00% | 0,00% | 0,00% | Negativo |
| Negativo | 2 | 0 | 1 | 33,33% | 62,96% | 0,00% | 0,00% | 0,00% | NIC1 |
| NIC1 | 0 | 0 | 1 | 81,82% | 36,66% | 0,00% | 0,00% | 0,00% | Negativo |
| NIC1 | 0 | 0 | 3 | 0,00% | 6,55% | 0,00% | 0,00% | 0,00% | NIC1 |
| NIC1 | 0 | 2 | 1 | 0,00% | 41,53% | 0,00% | 0,00% | 0,00% | NIC1 |
| NIC1 | 0 | 2 | 2 | 0,00% | 19,01% | 50,00% | 0,00% | 0,00% | NIC2 |
| NIC1 | 1 | 0 | 1 | 0,00% | 72,12% | 0,00% | 0,00% | 0,00% | NIC1 |
| NIC1 | 1 | 2 | 1 | 0,00% | 76,05% | 0,00% | 0,00% | 0,00% | NIC1 |
| NIC1 | 2 | 0 | 1 | 33,33% | 62,96% | 0,00% | 0,00% | 0,00% | NIC1 |
| NIC1 | 2 | 1 | 2 | 0,00% | 20,87% | 75,00% | 0,00% | 0,00% | NIC2 |
| NIC1 | 2 | 2 | 1 | 0,00% | 67,60% | 0,00% | 0,00% | 0,00% | NIC1 |
| NIC1 | 3 | 0 | 1 | 0,00% | 84,92% | 0,00% | 0,00% | 0,00% | NIC1 |
| NIC1 | 3 | 2 | 2 | 0,00% | 69,54% | 0,00% | 0,00% | 0,00% | NIC1 |
| NIC2 | 0 | 1 | 2 | 0,00% | 8,24% | 50,00% | 0,00% | 0,00% | NIC2 |
| NIC2 | 1 | 1 | 2 | 0,00% | 28,64% | 100,00% | 0,00% | 0,00% | NIC2 |
| NIC2 | 1 | 2 | 2 | 0,00% | 51,20% | 100,00% | 0,00% | 0,00% | NIC2 |
| NIC2 | 1 | 2 | 3 | 0,00% | 27,76% | 100,00% | 0,00% | 0,00% | NIC2 |
| NIC2 | 2 | 1 | 2 | 0,00% | 20,87% | 75,00% | 0,00% | 0,00% | NIC2 |
| NIC2 | 2 | 2 | 2 | 0,00% | 40,81% | 75,00% | 0,00% | 0,00% | NIC2 |
| NIC2 | 2 | 2 | 3 | 0,00% | 20,16% | 100,00% | 0,00% | 0,00% | NIC2 |
| NIC2 | 2 | 3 | 2 | 0,00% | 0,02% | 100,00% | 0,00% | 0,00% | NIC2 |
| NIC2 | 3 | 2 | 3 | 0,00% | 45,54% | 100,00% | 0,00% | 0,00% | NIC2 |
| NIC3 | 0 | 2 | 5 | 0,00% | 0,00% | 0,00% | 100,00% | 0,00% | NIC3 |
| NIC3 | 2 | 2 | 5 | 0,00% | 0,00% | 0,00% | 100,00% | 0,00% | NIC3 |
| NIC3 | 2 | 2 | 6 | 0,00% | 0,00% | 0,00% | 31,73% | 68,27% | Ca. inv. |
| NIC3 | 2 | 3 | 4 | 0,00% | 0,00% | 0,00% | 100,00% | 0,00% | NIC3 |
| NIC3 | 2 | 3 | 5 | 0,00% | 0,00% | 0,00% | 100,00% | 0,00% | NIC3 |
| NIC3 | 3 | 3 | 5 | 0,00% | 0,00% | 0,00% | 100,00% | 0,00% | NIC3 |
| NIC3 | 3 | 3 | 6 | 0,00% | 0,00% | 0,00% | 19,54% | 80,46% | Ca. inv. |
| Ca. inv. | 2 | 2 | 6 | 0,00% | 0,00% | 0,00% | 31,73% | 68,27% | Ca. inv. |
| Ca. inv. | 2 | 3 | 6 | 0,00% | 0,00% | 0,00% | 41,37% | 58,63% | Ca. inv. |
| Ca. inv. | 3 | 2 | 6 | 0,00% | 0,00% | 0,00% | 13,79% | 86,21% | Ca. inv. |
| Ca. inv. | 3 | 3 | 6 | 0,00% | 0,00% | 0,00% | 19,54% | 80,46% | Ca. inv. |

Observou-se, que quando os marcadores têm combinações de valores cada vez maiores, a probabilidade da paciente ter uma patologia mais grave aumenta gradativamente. Logo, através da combinação desses três marcadores, utilizando a regressão logística, pode-se estimar a chance da biópsia cervical com determinada característica imunoistoquímica pertencer a determinado grupo de diagnóstico histopatológico. As Figuras 7 e 8 mostram a aplicação do Modelo de Regressão Logística Binária proposto em oito casos deste estudo.

A partir dos 60 casos estudados foi construída uma tabela que mostra combinações projetadas, aplicando o modelo de regressão logística binária, visando estimar as probabilidades de acerto do diagnóstico histopatológico, dadas as características IMQ com o painel sugerido (Ver anexo XI).

Figura 7. A. Caso 35, paciente HIV negativa e HPV negativa. A1. metaplasia escamosa, HE. A2. p16^{INK4a} negativo (0). A3. Ki67 negativo (0). A4. CD44v6 positivo (1): chance de ser normal: 81,82%

B. Caso 52, paciente HIV negativa e HPV positiva, tipo 52. B1. NIC1, HE. B2. Ki67 negativo (0). B3. p16^{INK4a} positivo (3). B4. CD44v6 positivo (1): chance de ser NIC1: 84,22%.

C. Caso 33, paciente HIV negativa e HPV positiva, tipos 52 e 58. C1. NIC1, HE. C2. p16^{INK4a} positivo (2). C3. Ki67 positivo (1). C4. CD44v6 positivo (2): chance de ser NIC1: 20,87% e de ser NIC2: 75%.

D. Caso 5, paciente HIV positiva e HPV positiva, tipos 31 e 33. D1. NIC2, HE. D2. p16^{INK4a} positivo (3). D3. Ki67 positivo (2). D4. CD44v6 positivo (3): chance de ser NIC2: 100%.

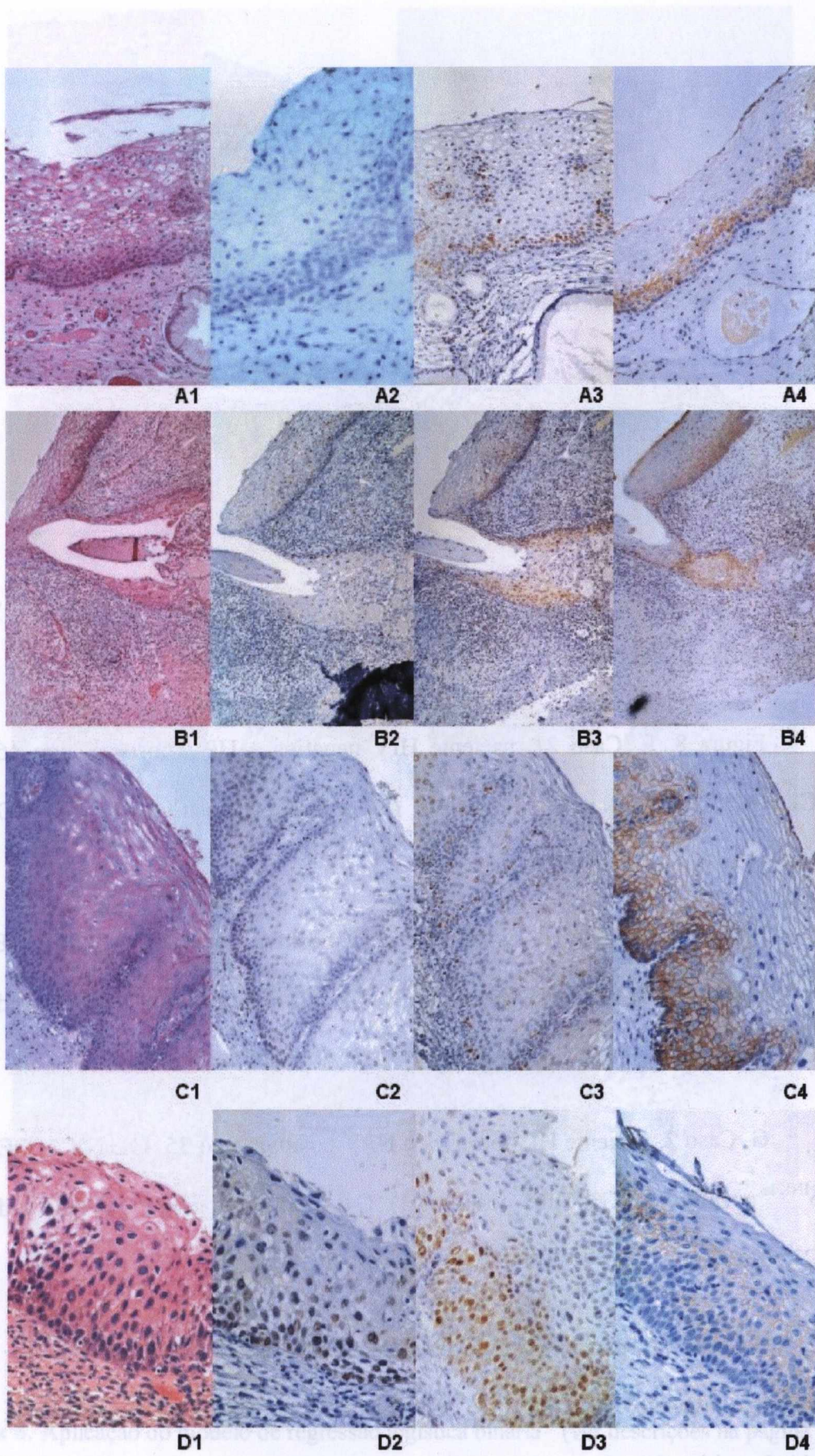


Figura 7 Aplicação do modelo de regressão logística binária (ver descrições na página contra-later

Figura 8. E. Caso 21, paciente HIV negativa e HPV positiva, tipo 16. E1. NIC2/NIC3, HE. E2. p16^{INK4a} positivo (2). E3. Ki67 positivo (2). E4. CD44v6 positivo (5): chance de ser NIC3: 100%.

F.Caso 8, paciente HIV positiva e HPV positiva, tipo 16. F1. NIC3, HE. F2. p16^{INK4a} positivo (3). F3. Ki67 positivo (3). F4. CD44v6 positivo (4): chance de ser NIC3: 100%.

G. Caso 2, paciente HIV positiva e HPV positiva, tipo 35. G1. NIC3, HE. G2. p16^{INK4a} positivo (3). G3. Ki67 positivo (3). G4. CD44v6 positivo (5): chance de ser NIC3: 100%.

H.Caso 56, paciente HIV desconhecido e HPV positiva, tipo 16. H1. Carcinoma invasivo, HE. H2. p16^{INK4a} positivo (3). H3. Ki67 positivo (2). H4. CD44v6 positivo (6): chance de ser carcinoma: 86,21%.

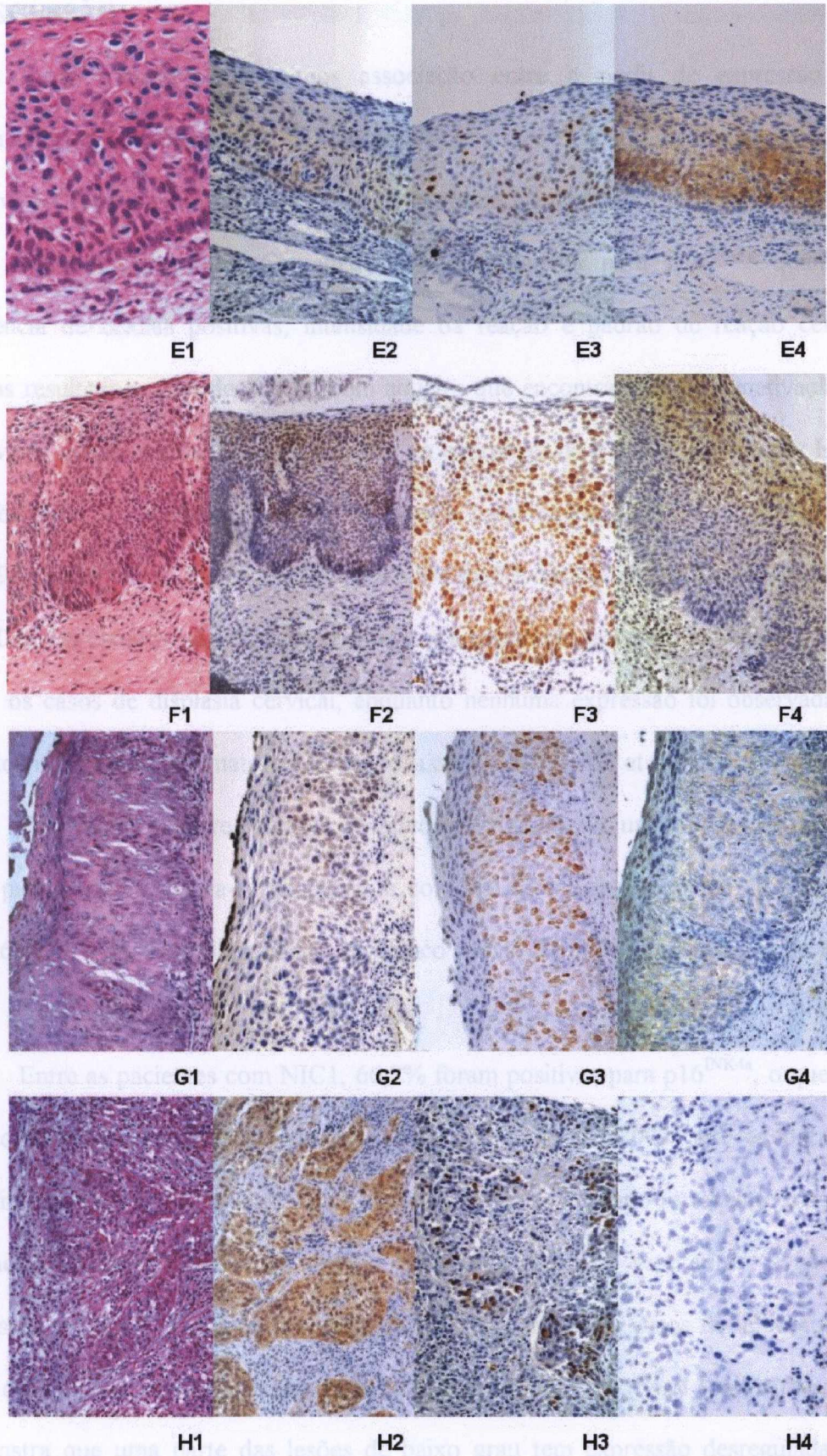


Figura 8. Aplicação do modelo de regressão logística binária (ver descrições na página contra-lateral).

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho, observamos associação entre o perfil de expressão das proteínas do ciclo celular p16^{INK4a}, ciclina D1, p53 e Ki67 e das moléculas de adesão CD44v5 e CD44v6 e o grau de progressão da carcinogênese cervical.

Nós analisamos a positividade imunoistoquímica para p16^{INK4a} quanto à frequência de células positivas, intensidade da reação e padrão de reação celular. Nossos resultados estão de acordo com aqueles que encontraram que a inativação da pRB via p16/cdk-ciclina/Rb com aumento da expressão da p16^{INK4a} em células HPV-transformadas é importante mecanismo para a carcinogênese cervical (NAKAO et al.,1997; SANO et al.,1998a; SANO et al.,1998b; KLAES et al., 2000; KEATING et al.,2001). Os estudos na literatura confirmam a expressão aumentada de p16^{INK4a} em todos os casos de displasia cervical, enquanto nenhuma expressão foi observada em epitélios normais ou inflamatórios da mucosa cervical (KLAES et al., 2001).

Encontramos, entre os casos negativos para neoplasia, um com reação positiva fraca para p16^{INK4a}. Trata-se de paciente com AIDS, positiva para os HPV de alto risco 68, 73 e 84, com diagnóstico citológico prévio de lesão intra-epitelial de baixo grau.

Entre as pacientes com NIC1, 66,7% foram positivas para p16^{INK4a}, o que está de acordo com os dados de von Knebel Doeberitz et al. (2002) que encontraram aproximadamente 60% dos casos de lesão de baixo grau corando fortemente para este marcador na camada basal do epitélio escamoso. Segundo este autor, a falta de expressão da p16^{INK4a} nos outros casos de NIC1 ocorreu nos casos de infecção pelo HPV de alto risco que mostraram características de replicação viral (coilocitos). Isto demonstra que uma parte das lesões de baixo grau tem expressão desregulada dos oncogenes virais nas camadas basais ou parabasais. As lesões com expressão

umentada de p16^{INK4a} provavelmente exibem padrão aberrante dos genes E6-E7, enquanto que as lesões p16^{INK4a} negativas não devem expressar os oncogenes virais nas células basais e não têm risco de progressão (VON KNEBEL DOEBERITZ, 2002). Klaes encontrou 100% de expressão de p16^{INK4a} em NIC1 associada com HPV de alto risco. Ele justifica esta taxa elevada pelo fato de todos os casos terem vindo de cones, se tratando de lesões mais avançadas e não de infecções agudas (KLAES, 2002).

De acordo com a expressão da p16^{INK4a} no grupo das NIC1, sugere-se dois tipos de lesões: 1) as infecções HPV agudas, com expressão de oncogenes virais nas células epiteliais diferenciadas, p16^{INK4a} negativas nas camadas basais e parabasais e 2) aquelas com expressão dos oncogenes virais desregulada, p16^{INK4a} positivas nas camadas basal e parabasal (KLAES, 2002). Estas poderão progredir para lesões mais graves. Todos os nossos casos expressando p16^{INK4a} foram positivos para HPV oncogênico. Entre os casos negativos para esta proteína, dois foram HPV negativos e três foram positivos para HPV oncogênicos. Marcadores moleculares que possibilitem diferenciar estes dois grupos poderão ter um grande impacto clínico. Eles ajudarão a reduzir a subjetividade de interpretação dos patologistas, particularmente nas lesões displásicas iniciais (STOLER et al., 2001).

A progressão da NIC1 para NIC de alto grau é acompanhada por integração do genoma viral no cromossomo do hospedeiro (SCHWARZ et al., 1985), com inativação da proteína regulatória E2. O único caso de NIC2 negativo para p16^{INK4a}, foi positivo para HPV 53 e 16. Entre os casos de NIC3, um caso foi negativo para p16^{INK4a} e todos os casos de carcinoma foram positivos.

Entre os casos positivos para p16^{INK4a}, verificou-se relação entre a gravidade da lesão e intensidade da reação.

Em todos os casos positivos para p16^{INK4a}, houve reação nuclear, entretanto, em relação à reação no citoplasma, observamos relação entre o aumento da intensidade e progressão da oncogênese. Provavelmente isto decorre da síntese aumentada desta proteína, com acúmulo e hiperexpressão no citoplasma.

Para verificar a expressão da p16^{INK4a} avaliamos a frequência de células positivas, a intensidade da reação e o padrão de reação celular que mostraram diferenças significantes entre todos os grupos histológicos estudados. Comparando os pares, constatamos que os grupos negativos para neoplasia/NIC1 e NIC1/NIC2 são diferentes entre si. Não se observaram diferenças entre NIC2 e NIC3 e NIC3 e carcinoma. Nossos achados permitem concluir que a p16^{INK4a} pode ser útil na separação de lesões de baixo grau das de alto grau, o que está relacionado com a presença e tipo de incorporação genômica do HPV oncogênico. Portanto, este marcador é útil para separar os casos HPV negativos ou infectados pelo HPV de baixo risco, daqueles infectados pelo HPV de alto risco oncogênico em que já ocorreu transformação da célula. Em relação ao HPV16 isolado, que foi o mais prevalente em nossa série, quando comparado aos demais tipos, não houve diferença estatística quanto à expressão da p16^{INK4a}. A positividade para a p16^{INK4a} está relacionada à integração do HPV no genoma, mais freqüente à medida que ocorre a progressão da infecção para lesões pré-cancerosas de alto grau e carcinoma. Nossos achados sugerem que esta integração pode ocorrer em casos de NIC 1, o que está de acordo com as observações de Lehn et al (1988), que não excluem que a integração do genoma do HPV aconteça precocemente no desenvolvimento do câncer cervical. Os autores observaram correlação entre o aumento do número das células neoplásicas e detecção do genoma do HPV16 integrado (LEHN et al., 1988).

Infecções por mais de um tipo de HPV, simultaneamente, não estão associadas com aumento do risco de câncer em relação à infecções por apenas um tipo viral (MUÑOZ et al., 2003). Não observamos diferença de expressão da p16^{INK4a} em relação à quantidade de tipos virais na amostra.

Todos nossos casos negativos para neoplasia e 80% das NIC1 foram positivos para ciclina D1. Noventa por cento das NIC2 e todos os casos de NIC3 foram negativos. Um caso de carcinoma invasivo foi fracamente positivo para ciclina D1. Estes achados estão de acordo com os estudos de Bae et al (2001) que detectaram ciclina D1 nas cérvices normais e falta de expressão nas lesões cervicais. Outros não encontraram expressão da ciclina D1 na maioria (87%) das lesões de baixo grau infectadas com HPV oncogênicos, enquanto que observaram expressão nuclear nas camadas basal, parabasal e ocasionalmente na intermediária em 92% dos casos de lesões de baixo grau infectados pelo HPV de baixo risco (SOUTHERN & HERRINGTON, 1998a). Estes achados são compatíveis com as observações *in vitro*, de que a expressão da proteína ciclina D1 não é indispensável para progressão da fase G1 em linhagens de ceratinócitos humanos expressando proteínas E6 e E7 de HPV oncogênicos (LUKAS et al 1994). Estas oncoproteínas subvertem o ciclo celular, fazendo com que as células proliferem independente da ciclina D1, enquanto as células que não têm HPV incorporado expressam ciclina D1 no ciclo proliferativo. Isto é compatível com a maior afinidade do HPV-E7 de alto risco pela pRb em comparação com a menor afinidade de E7 de HPV de baixo risco (SOUTHERN & HERRINGTON, 1998a).

Nós encontramos expressão inversa desta proteína (Ciclina D1) em relação a outras proteínas do ciclo celular estudadas, em particular com a p16^{INK4a}, o que

corroborar o mecanismo de inativação da pRb por HPV E7 com aumento da proteína p16^{INK4a} e redução da expressão da ciclina D1 (SERRANO et al., 1993).

A mutação do gene supressor p53 está entre as alterações genéticas mais frequentes do câncer humano (HARRIS et al., 1990), não ocorrendo, ou é rara na carcinogênese cervical, onde a inativação da p53 selvagem por E6 produzirá acúmulo desta proteína (LEE et al., 1994). Na cérvix uterina, os resultados de imunohistoquímica para detecção da proteína p53 são contraditórios. Em lesões pré-invasivas a detecção da p53 tem variado de 3 a 83% e nos carcinomas 4 a 100% (COOPER et al. 1993). Expressão aumentada de p53 tem sido detectada em carcinoma invasivo e *in situ*, (CHANG, 1993; DIMITRAKAKIS et al., 2000; PARK et al., 1999) enquanto que tecido displásico e normal são negativos (CHANG, 1993; DIMITRAKAKIS et al., 2000). Outros estudos não mostram diferença de expressão com a progressão da NIC (VASSALO et al, 2000). Vários estudos têm demonstrado associação entre acúmulo da proteína p53 e comportamento agressivo de vários carcinomas, incluindo a maior propensão à metástase e menor sobrevida dos pacientes (GOH, 1994; PARK et al., 1999).

Observamos que 63,6% dos casos negativos para neoplasia mostraram positividade nuclear para p53 nas camadas basal e parabasal. Esta alta porcentagem positiva neste grupo de pacientes poderia ser justificada pelo anticorpo monoclonal que usamos, DO7, que detecta tanto a proteína p53 selvagem quanto a mutante. Nossos achados estão de acordo com Jeffers et al. (1994) que usando anticorpo policlonal que reconhece ambas as proteínas p53, encontraram 62,5% de positividade nos epitélios normais, restrito as camadas basal e supra basal, principalmente nas áreas de metaplasia escamosa. No esôfago, Nakamura et al. (1995) observaram expressão da p53 no núcleo das células da camada basal dos epitélios normais e

displásico, usando anticorpo policlonal que reage com p53 selvagem e mutante. Um estudo com ambos anticorpos, mono e policlonal mostrou resultados divergentes (51 casos positivos em 92 com anticorpo policlonal CM1 e 17 em 92 com anticorpo monoclonal Pab 1801), enfatizando a importância do anticorpo utilizado (HELLAND et al, 1993). A positividade nas camadas basal e parabasal poderia ainda ser explicada pelo fato de que nove das pacientes com ZTA à colposcopia mostram na biópsia, metaplasia escamosa e cervicite crônica o que poderia estar relacionado à condição inflamatória ou reativa, quando ocorre aumento da meia-vida da p53 selvagem, secundária à ligação à outras proteínas celulares ou a alteração das seqüências regulatórias (COOPER et al.,1993; HELLAND et al.,1993).

Em 93,3% dos casos de NIC1 e 30% das NIC2 a p53 foi positiva. Resultados semelhantes aos de Vassalo et al. (2000) que encontraram maior expressão da proteína p53 em NIC1, comparando com as lesões de alto grau NIC2 e NIC3. Entretanto, achamos que a expressão desta proteína na camada basal do epitélio, nestes casos, não pode ser considerada como marcador de risco de progressão, uma vez que esta também ocorre em epitélios normais, e pode refletir aumento de atividade proliferativa com acúmulo da proteína selvagem.

O número de núcleos positivos acima da camada basal foi pequeno (<10%) na maioria dos casos. A maior expressão da p53 ocorreu nos casos de NIC3 e carcinoma, 53,3 % e 88,9%, respectivamente, o que está de acordo com os achados de Cooper et al. (1993) que observaram positividade nuclear em 86% dos carcinomas, com o mesmo anticorpo usado neste estudo.

De modo geral, a expressão da proteína p53 estava limitada, na maioria dos casos, a pequeno número de células e não houve correlação com a expressão e a o tipo

de HPV, em concordância com outros estudos (VASSALO et al., 2000; JEFFERS, et al., 1994; COOPER et al., 1993).

O antígeno Ki 67 é expresso durante todas as fases do ciclo celular, G1, S, G2 e M, de células proliferantes, mas ausente nas células quiescentes (G0). É, portanto, um marcador de proliferação celular, que pode ser detectado por anticorpo mononuclear (GERDES et al.,1983; GERDES et al.,1991). Vários estudos têm indicado que o Ki67 é um marcador de prognóstico relevante no estudo dos tumores humanos (BROWN et al.,1990). A imunopositividade para a Ki67 reflete a relação entre atividade proliferativa, grau do NIC e expressão do HPV (KONISHI et al.,1991; DEVICTOR et al.,1993; RESNICK et al.,1996).

Neste estudo, 68,4% dos casos foram positivos para Ki67. Entre os 19 casos considerados negativos para este marcador, houve 10 casos com diagnóstico histológico de negativo para neoplasia e 9 casos de NIC1. O índice de proliferação nos casos negativos variou entre 9,4 e 39,1% das células das camadas basal e parabasal, sendo a maior expressão deste marcador nas células parabasais. Observou-se expressão variada nas células basais, o que está de acordo com outros trabalhos (RESNICK et al.,1996; KONISHI et al., 1991; AL-SALEH et al.,1995). Este achado pode ser explicado pela influência hormonal que interfere no número de células proliferantes (KONISHI et al.,1991). Resnick et al (1996) encontraram a proporção de células parabasais variando de 10 a 50% e não acharam correlação entre a frequência de células parabasais coradas no epitélio normal e NIC. Dos nossos casos considerados negativos para Ki67, 9 foram HPV negativos (5 casos negativos para neoplasia e 4 NIC1) e 10 casos HPV positivos (5 casos negativos e 5 NIC1), destes apenas um caso foi positivo para o tipo 6, de baixo risco, e os demais foram positivos

para um ou dois tipos virais de baixo risco, não havendo diferença estatística entre os dois grupos.

Sessenta por cento das NIC1 e todos os casos de NIC2, NIC3 e carcinoma invasivo foram positivos para Ki67. Nas NIC1 e NIC2 as células KI67 positivas estavam distribuídas nas camadas basal, parabasal e intermediária, e difusamente distribuída por todas as camadas na NIC3. Dito de outra forma, ocorre mudança no padrão de expressão deste antígeno das células basais e parabasais (epitélio normal, sem NIC) para intermediárias (NIC1) e superficiais (NIC2 e 3) (AL-SALEH et al.,1995).

Tanto na análise de correspondência como nos modelos de regressão logística, o anticorpo monoclonal p16^{INK4a}, seguido do Ki67 mostraram melhores resultados que o p53 e ciclina D1 em relação ao diagnóstico histológico, sendo pois considerados importantes para compor um painel de imunomarcacão para lesões cervicais.

Poucos autores têm estudado simultaneamente a expressão de proteínas do ciclo celular, por IMQ na carcinogênese cervical. Skomedal et al (1999) estudaram várias proteínas do ciclo celular em carcinomas cervicais, entre as quais, p53 e ciclina D1 e não encontraram nenhuma diferença na expressão aberrante ou co-expressão de qualquer uma destas proteínas e o tipo histológico, grau de diferenciação das neoplasias e sobrevida dos pacientes. Entretanto, em relação à NICs, Keating et al. (2001) encontraram que o resultado da imunoistoquímica com Ki67, ciclina E e p16 estavam correlacionados com o diagnóstico histológico, com escores positivos de 68,4%, 96,7%, e 100% das lesões de baixo grau e 94,75, 91,65 e 100% das lesões de alto grau respectivamente. Nós observamos que existe relação entre a p16^{INK4a} e Ki67 e a gravidade do grau histológico, e relação inversa entre a expressão da ciclina D1 e a

progressão da carcinogênese cervical. Quanto a p53, não observamos associação clara entre sua expressão e a progressão da carcinogênese.

Quanto à presença ou não do HPV verificamos que houve diferença entre as pacientes HPV negativas, que apresentaram baixa positividade para p16^{INK4a}, p53 e Ki67 e positividade mais alta destes marcadores nas pacientes HPV positivas. A ciclina D1 comportou-se de maneira inversa.

Não observamos diferença na expressão destas proteínas e a infecção pelo HIV. Neste trabalho, nas pacientes HIV positivas, foram detectadas até 5 tipos virais diferentes, enquanto as HIV negativas apresentaram infecção com até, no máximo, dois tipos de HPV simultaneamente. Maiores taxas de HPV oncogênicos e múltiplos tipos de HPV são mais frequentes em mulheres HIV positivas (MAIMAN, 1998; LEVI et al., 2002). Este maior número de tipos de HPV detectadas em mulheres HIV positivas está mais associado com a persistência ou ativação de infecções pré-existentes, devido ao declínio da imunidade, do que da aquisição de outra infecção recente (PALEFSKY et al., 1999).

Dentre outras moléculas importantes na carcinogênese, além das relacionadas com as do ciclo celular, estão moléculas de cito-adesão. A CD44 regula proliferação celular e migração, estando sua expressão associada com transformação neoplásica, invasão e metástase (DELLAS et al., 1996; KAINZ et al, 1995). No presente trabalho observamos alterações na expressão tanto quantitativa quanto qualitativa da CD44v5 e CD44v6, e que podem ser utilizadas na avaliação prognóstica na carcinogênese cervical.

Embora a maioria dos autores considere apenas a intensidade da reação como parâmetro de avaliação da expressão das moléculas CD44v5 e CD44v6 (KAINZ et al., SPEISER et al., 1997; SHIMABUKURO et al., 1997), e alguns a intensidade

aliada à porcentagem de células positivas (SAEGUSA et al, 1999;CALLAGY et al., 2000), nossos resultados indicam que o padrão de distribuição da expressão desses marcadores se altera nos diferentes graus histológicos das neoplasias cervicais e que este padrão pode ter significado mais importante que a intensidade e/ou quantificação das células. A análise do perfil imunistoquímico com CD44v5 e CD44v6 permitiu enquadrar todos os casos em um dos padrões de reação anteriormente definidos. Existiu diferença entre os diagnósticos histológicos quanto ao padrão de reação para os dois tipos de moléculas de adesão. Não há diferença estatística no padrão de expressão entre os casos normais e NIC 1, entretanto, os demais grupos diferem entre si, observando-se inversão dos padrões entre NIC2 e NIC3.

Em nossa série, os padrões de expressão de CD44v5 e CD44v6 mostram clara polarização em relação as alterações benignas e lesões de alto grau (NIC3) e neoplasia invasiva, com perda de expressão destes marcadores associada à progressão da carcinogênese cervical, o que está de acordo com outros estudos (DELLAS et al., 1996; KOLBERGER et al., 1997). Em relação à CD44v5, no epitélio benigno (metaplasia escamosa sem NIC) observou-se padrão 1 em todos os casos, enquanto que nas NIC 3 são observados os padrões 4, 5 ou 6 e nos casos de câncer invasivo todos os casos são padrão 6 (perda da expressão), exceto um que foi padrão 5. Nos casos de NIC 1, a maioria tem padrão semelhante ao epitélio normal, mas três casos têm padrões que se superpõem àqueles vistos em casos de NIC 2. Nas NIC 2 nenhum caso tem padrão de epitélio normal nem padrões 4, 5 ou 6. Esta polarização é ainda mais marcante em relação ao CD44v6 onde se observa padrão 1 em todos os casos sem NIC e padrão 6 em todos os casos de carcinoma invasivo. Com este marcador, os casos de NIC 3 têm perfil distinto dos casos de NIC 1 e 2 que mostram algumas sobreposições.

A presença de padrões variados em grupos menos polarizados pode significar etapas diferentes no curso da malignização, denotando que a expressão de CD44v não é um processo contínuo na história natural do câncer cervical.

Neste estudo, todos os epitélios normais exibiram reação positiva para as CD44v5 e CD44v6 nas camadas basal e parabasal, sendo que a camada basal mostrou expressão de ambas as moléculas de forma variada, desde negativa, à positividade focal ou francamente positiva. A camada parabasal foi positiva em todos os casos. Encontramos CD44v6 positivo em todos epitélios normais em contraste com os achados de Kohlberger et al. (1997) em que apenas 8 epitélios normais presentes nos 45 casos de NIC foram positivos. Observamos que apesar da positividade da reação ser forte na camada parabasal, esta intensidade é bastante variável entre epitélios normais, sendo, porém, mais forte do que nas NIC, o que está de acordo com outros estudos (DELLAS et al., 1996; SHIMABUKURO et al., 1997). Estas células têm alta taxa de proliferação, sugerindo que a expressão de CD44v pode de alguma forma estar relacionada com proliferação (MACKAY et al., 1994) ou com a necessidade de coesão dessa camada. Como estas moléculas têm papel na adesão intercelular, sua expressão na camada basal parece ser importante na adesão destas células, garantido o processo de crescimento e maturação do epitélio e desaparecendo nas camadas mais superficiais, onde não serão necessárias. A expressão destas moléculas nas camadas basal e parabasal e nos terços inferiores do epitélio, respectivamente padrões 1 e 2, ocorre nos casos normais, NIC1 e NIC2, sugerindo que nestes casos, estas moléculas estão cumprindo sua função de adesão, e que estas NIC teriam prognóstico mais favorável. O padrão 3 sugere retardo da expressão das moléculas que passam a se expressar no terço médio ou que a renovação nas camadas basais é tão intensa que não dá tempo para a maturação das células ainda nesta camada. O processo de alteração na

maturação celular e expressão de CD44 se acentua ainda mais no padrão 4. Estes padrões aparecem em poucos casos, com ambos os marcadores, padrão 3 em um caso de NIC1 e três casos de NIC2 e o padrão 4 em dois casos de NIC3. Esta forma de expressão é peculiar, sendo necessário maior número de casos para definir seu significado. A imunoreatividade heterogênea destes anticorpos, foi observada previamente em NIC3 e carcinoma por outros (SAEGUSA et al 1999; SHIMABUKURO et al 1997; CALLAGY et al 2000), sem entretanto, ser considerado como possível padrão específico na progressão da carcinogênese. Callagy et al considera que esta heterogeneidade de expressão da CD44 reflete o processo dinâmico da carcinogênese cervical (CALLAGY et al, 2000).

Observamos o padrão 5 em NIC3 e em apenas um caso de carcinoma com CD44v5. Este padrão representa perda acentuada da capacidade das células expressarem as moléculas de adesão de maneira ordenada, passando a ser expressa difusamente, e parece significar risco de evolução para invasão. No padrão 6, observado nos carcinomas, há completa inibição da expressão da CD44v5 e v6. A falta de expressão dessas moléculas no câncer reflete a perda de interação célula-célula e célula-matriz o que facilitaria a invasão da membrana basal e estroma. Por outro lado, tem sido demonstrado que quando ocorre expressão da CD44v6 em carcinoma invasivo deve estar relacionado com metástase e pior prognóstico (KAINZ et al, 1995). Como nosso número de casos de carcinoma invasivo é pequeno e como não fizemos seguimento destas pacientes, não é possível, neste caso, excluir a possibilidade de que expressão de CD44V6 em câncer cervical esteja relacionado com pior prognóstico.

Daniel et al. (1997) mostraram que a integração do genoma do HPV16 no epitélio cervical está associado com o aumento da expressão da CD44 e da síntese de

E6-E7 durante a transição de NIC3 para carcinoma invasivo. De acordo com nosso estudo, onde os quatro casos padrão 3 são positivos para DNA oncogênicos, podemos inferir que as células basais por terem incorporado no genoma parte do DNA do HPV poderiam perder a expressão destas moléculas, nos terços inferior e superior do epitélio. O padrão 4 (negativo nos 2/3 inferiores e positivo no superior), que observamos em dois casos de pacientes do grupo 5 (NIC3), ambas HIV positivas e com infecção pelo HPV 16, poderia corresponder a uma situação intermediária entre o padrão 5 e o 6. Poderíamos supor que em alguns casos fortemente positivos em toda extensão do epitélio (padrão 5, intensidade 3), algumas células perderiam as moléculas de adesão, quantitativa e/ou qualitativamente, e passariam a ser padrão 5 com reação focal ou fraca, e finalmente, com a progressão da carcinogênese, não mais expressariam estas moléculas, tornando-se padrão 6, como nos casos de carcinoma invasivo. Estas células poderiam expressar outro tipo de molécula de adesão, que iria facilitar a invasão tissular ou o evento ocorreria concomitante a expressão de metaloproteinases que digeririam a membrana basal permitindo a invasão.

Quanto à intensidade de reação para os dois tipos de moléculas de adesão (CD44v5 e CD44v6) existe diferença estatística entre os grupos histológicos.

Comparando o padrão de reação e intensidade entre CD44v5 e CD44v6 não há evidência de diferença entre os dois tipos de moléculas. No entanto, considerando a porcentagem global de acerto através da regressão logística univariada, verificamos que o padrão de imunomarcção com o anticorpo monoclonal CD44v6 é melhor que a intensidade de reação deste marcador e muito superior ao padrão de reação do CD44v5.

Encontramos que CD44v5 e CD44v6 são expressas em epitélio normal, bem como nas neoplasias intraepiteliais de todos os graus histológicos diferindo quanto ao

padrão de reação e intensidade, que foi mais forte no epitélio normal e NIC1. Estes achados sugerem que o epitélio cervical expressa padrão complexo de variantes da CD44 e que a variação da expressão e/ou redução destas moléculas de adesão no epitélio cervical durante a transformação neoplásica pode contribuir com o fenômeno invasivo e metastático. Alguns encontraram redução da expressão de CD44v5 durante a progressão das lesões displásicas no epitélio cervical (KOHLBERGER et al., 1997), e do carcinoma microinvasivo comparado com NIC 1 e NIC 3 mas não em relação à CD44v6 entre NIC1, NIC3 e carcinoma microinvasivo (CALLAGY et al., 2000). Conquanto a organização genômica destas duas isoformas seja semelhante (SCREATON et al., 1992), elas não são iguais. Elas não diferiram quanto ao padrão da reação, com apenas um caso de NIC 3 mostrando padrão divergente, entretanto, observamos diferença na intensidade de expressão entre CD44v5 e CD44v6.

Não encontramos diferença na expressão de CD44v5 e CD44v6 nas amostras de pacientes HIV positivas e negativas, o que está de acordo com os achados de outros (DARAI et al., 2000), e em relação ao *status* da infecção pelo HPV, concordando com os achados da literatura (DELLAS et al., 1996; DARAI et al., 2000).

A literatura é controversa quanto a utilidade da expressão da CD44v na clínica (BIESOLD et al., 1995; KAINZ et al., 1995; SPEISER et al., 1997; COSTA et al., 2001). Neste estudo mostramos que o padrão de distribuição da expressão de CD44v5 e CD44v6 difere entre os graus histológicos das lesões cervicais e sugerimos que este parâmetro tenha significado mais importante que a intensidade isoladamente. Observamos redução da expressão destas moléculas de adesão, particularmente nas NIC 3 e carcinoma, e alteração no padrão de expressão destas moléculas durante a carcinogênese cervical, mais evidente nas NIC2 e NIC3. CD44v5 e CD44v6 não

diferiram quanto ao padrão da reação, entretanto, diferiram na intensidade de expressão. Concluimos que a CD44v6 tem melhor aplicabilidade prática do que a CD44v5, podendo ser útil como indicador prognóstico de evolução desfavorável.

Nos últimos anos a técnica da imunistoquímica tem sido de valor inestimável na resolução de problemas diagnósticos, difíceis ou impossíveis pelos métodos morfológicos convencionais. Infelizmente, são raras as situações em que a solução se faz com o uso de um único anticorpo monoclonal, sendo na grande maioria das vezes, necessária a utilização de um painel de marcadores. Na cérvix uterina não tem sido diferente. Vários estudos têm mostrado a preocupação de se encontrar imunomarcadores capazes de responder à questões sobre a carcinogênese cervical (KONISHI et al., 1991; PARK et al., 1999; SKOMEDAL et al., 1999; KEATING et al., 2001).

Após estudo da expressão das proteínas do ciclo celular p16^{INK4a}, ciclina D1, p53 e Ki67 e das moléculas de adesão CD44v5 e CD44v6, selecionamos um painel constituído dos anticorpos monoclonais p16^{INK4a}, Ki67 e CD44v6, cujo uso seletivo poderá ser importante para resolver problemas diagnósticos relacionados ao grau histológico e infecção pelo HPV oncogênico bem como auxiliar no prognóstico destas lesões.

Utilizando o Modelo Logístico Binário procuramos estimar a probabilidade de uma paciente pertencer a cada um dos grupos histológicos, observados os valores para os marcadores p16^{INK4a}, Ki67 e CD44v6. Este modelo estima as probabilidades da paciente ter cada uma das patologias considerando determinada combinação destes marcadores.

A análise conjunta da expressão destes marcadores mostrou forte associação entre eles e com os diagnósticos histopatológicos. Quando consideradas as

combinações dos escores de cada anticorpo, pelo modelo de regressão logística, obteve-se correlação de cerca de 90% entre o diagnóstico dado e o predito, sendo que os casos não concordantes, mostraram diferença de um grau histológico. Estes casos foram revisados por dois patologistas do estudo (CQ e LF) e dois patologistas que desconheciam os casos e o trabalho. O caso 7, HPV positivo, tipos 68, 73 e 84, teve o diagnóstico de metaplasia escamosa. O painel mostrou p16^{INK4a}:2/ Ki67:0/CD44v6:1, com diagnóstico predito de NIC 1. O caso 33, HPV positivo, tipos 58 e 52, teve o diagnóstico de NIC1. O painel mostrou p16^{INK4a}:2/ Ki67:1/CD44v6:2, com diagnóstico predito de NIC 2. O caso 9, HPV positivo, sem determinação do tipo viral teve o diagnóstico de NIC1. O painel mostrou p16^{INK4a}:0/Ki67:0/CD44v6:1, com diagnóstico predito de negativo para neoplasia. A revisão destes casos foi consensual em manter o diagnóstico inicial.

O caso 25, HPV positivo, tipos 53 e 16, foi classificado como NIC2. O painel mostrou p16^{INK4a}:0/Ki67:1/CD44v6:2, com diagnóstico predito de NIC 1. Os patologistas ficaram divididos entre NIC1 e NIC2. Como a p16^{INK4a} foi negativa, concluiu-se que este caso poderia ser considerado NIC1. O caso 49, HPV negativo foi classificado como NIC1. O painel mostrou p16^{INK4a}:0/Ki67:0/CD44v6:1, com diagnóstico predito de negativo para neoplasia. Não houve consenso entre os patologistas entre epitélio reativo e NIC1. Considerando os escores encontrados e a negatividade para HPV, considerou-se que poderia ser epitélio reativo.

Três casos diagnosticados como NIC 3 (23, 37 e 38) mostraram escores com maior chance de ser carcinoma invasivo (p16^{INK4a}:3/ Ki67:3/CD44v6:6 e p16^{INK4a}:2/ Ki67:2/CD44v6:6), devido a perda da expressão de CD44v6. Na revisão, os diagnósticos de NIC3 foram mantidos. Casos como estes, deveriam ser considerados como potencialmente invasivos, necessitando de maior cuidado no estudo do cone e

no seguimento da paciente. Outra possibilidade é que representem estados pré-invasivos.

Apesar do valor inquestionável e da alta sensibilidade da PCR para detecção do HPV, esta técnica pode ter resultados falsos. Das 60 pacientes incluídas neste estudo, 14 foram HPV-DNA negativas por PCR, entre as quais, 4 diagnosticadas como NIC e 4 como carcinoma invasivo. Este índice elevado de negatividade para DNA-HPV entre as pacientes com câncer está em desacordo com a literatura, que tem mostrado positividade entre 95-100% por PCR nesta neoplasia (WALBOOMERS et al., 1999; BOSCH,2002). Das nove pacientes com câncer, em duas foi feita colheita com escova no momento da biópsia (casos 22 e 56), sendo a PCR positiva em ambas. As outras sete pacientes, a PCR foi feita em material parafinado, proveniente da peça cirúrgica, sendo três casos positivos, (só sendo possível detectar o tipo viral em um deles, caso 55) e quatro casos negativos. Considerando a positividade de quase 100% para a detecção de DNA-HPV em carcinoma de células escamosas cervicais (BOSCH, 2002), a alta incidência de casos negativos neste grupo não está de acordo com os achados mais recentes da literatura, sem que tenhamos conseguido uma explicação clara para este fato.

Para o diagnóstico da maioria das lesões pré-neoplásicas e neoplásicas da cérvix uterina os exames morfológicos convencionais são suficientes. Sob circunstâncias ideais o grau de NIC usando os três métodos, colposcopia, citologia e histopatologia deveria ser o mesmo. Entretanto, a discordância de mais de um grau entre a citologia e biópsia reflete discrepância acentuada, o que frequentemente terá repercussão no tratamento e seguimento destas pacientes (LYALL et al.,1995).

Para superar estas limitações se faz necessário identificar biomarcadores com melhor valor preditivo positivo para presença de NIC ou câncer, pois o

reconhecimento da patologia molecular da doença pode auxiliar no prognóstico e tratamento. Além disso, o exame histológico não permite identificação do tipo viral e do potencial oncogênico, bem como os efeitos celulares não refletem integração viral, sendo necessárias técnicas complementares que auxiliem o diagnóstico.

O conjunto de nossos resultados permite-nos sugerir a aplicação de um painel constituído dos anticorpos monoclonais p16^{INK4a}, Ki67 e CD44v6 na avaliação de carcinogênese cervical.

A reação positiva para Ki67 é importante indicador de lesão de alto grau, mas menos precisa para lesões de baixo grau, refletindo melhor a atividade proliferativa em neoplasia. A p16^{INK4a} separa os casos HPV negativos ou infectados pelo HPV de baixo risco, daqueles infectados pelo HPV de alto risco oncogênico em que já ocorreu transformação, permitindo identificar lesões cervicais de baixo grau com risco aumentado de progredir para lesões pré-cancerosas de alto grau ou câncer invasivo. A CD44v6 é útil como marcador de risco de progressão em lesões intra-epiteliais de alto grau.

Este painel de anticorpos monoclonais poderá ser empregado em biópsias cervicais em conjunto com a técnica estatística do Modelo Logístico Binário (Tabela 22), possibilitando identificar as lesões transformadas por HPV oncogênicos, separando as NIC1 com potencial de progressão (p16^{INK4a}) ; identificando lesões de alto grau, devido ao aumento progressivo do índice de proliferação celular (Ki67) e com risco aumentado de progredir (CD44v6), além de que poderá ajudar a reduzir a subjetividade de interpretação dos patologistas (p16^{INK4a}, Ki67 e CD44v6), particularmente nas lesões iniciais.

A partir deste estudo, propomos a avaliação conjunta do painel imunohistoquímico com os anticorpos monoclonais, p16^{INK4a}, Ki67 e CD44v6 e consulta a tabela de Modelo Logístico Binário para verificar as chances da lesão pertencer a um determinado diagnóstico histológico.

6. CONCLUSÕES

6.1. A frequência de células positivas, a intensidade da reação e o padrão de reação celular para p16^{INK4a} diferiu significativamente nas diferentes formas de neoplasia intra-epitelial do colo uterino e em relação ao controle não-neoplásico.

6.2. A média dos valores atribuídos aos três parâmetros foi superior a cada um deles separadamente, sendo, portanto, considerada como o melhor indicador da expressão de positividade para p16^{INK4a}.

6.3. Os grupos, negativo e NIC1, NIC1 e NIC2 diferem estatisticamente quanto a média dos parâmetros de expressão de p16^{INK4a}.

6.4. Não houve diferença de expressão da p16^{INK4a} em relação ao tipo de HPV oncogênico, infecção por mais de um tipo deste vírus e infecção pelo HIV.

6.5. Existe diferença estatística significativa entre as diferentes formas de neoplasia epitelial do colo (negativo, NIC1, NIC2, NIC3 e carcinoma) e expressão das proteínas do ciclo celular: ciclina D1, Ki67 e p53.

6.6. O anticorpo monoclonal p16^{INK4a}, seguido do Ki67 mostraram melhor correlação que o p53 e a ciclina D1 em relação às diferentes formas de neoplasia epitelial do colo (negativo, NIC1, NIC2, NIC3 e carcinoma), sendo recomendados para compor um painel de imunomarcção para lesões cervicais.

6.7. Existe diferença estatisticamente significativa entre as diferentes formas de neoplasia epitelial do colo (negativo, NIC1, NIC2, NIC3 e carcinoma) quanto ao **padrão** e à **intensidade** da reação com CD44v5 e CD44v6.

6.8. O padrão de reação da CD44v6 correlacionou-se melhor que a intensidade da reação da CD44v5 e CD44v6 e o padrão de reação da CD44v5 separadamente, sendo portanto considerado como o melhor indicador da expressão de positividade entre estas moléculas de adesão.

6.9. Não houve diferença de expressão da ciclina D1, Ki67, p53, CD44v5 e CD44v6 em relação ao tipo de HPV, à infecção com mais de um tipo deste vírus e a infecção pelo HIV.

6.10. A reação positiva para Ki67 é importante indicador de lesão de alto grau, mas menos precisa para lesões de baixo grau. em neoplasia.

6.11. A p16^{INK4a} separa os casos HPV negativos ou infectados pelo HPV de baixo risco, daqueles infectados pelo HPV de alto risco oncogênico em que já ocorreu a iniciação da oncogênese, permitindo identificar lesões cervicais de baixo grau com risco aumentado de progredir para lesões pré-cancerosas de alto grau ou câncer invasivo.

6.12. A CD44v6 é útil como marcador de risco de progressão de lesões intra-epiteliais de alto grau.

6.13. O Modelo Logístico Binário, que considera a combinação dos marcadores p16^{INK4a}, Ki67 e CD44v6, é recomendado para estimar a chance da biópsia cervical com determinadas características imunoistoquímicas corresponder a um diagnóstico histopatológico.

6.14. Os marcadores p16^{INK4a}, Ki67 e CD44v6 podem ser utilizados conjuntamente (painel) para exame imunoistoquímico de lesões pré-cancerosas e câncer do colo uterino.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALANI, R. M.; MUNGER, K. Human Papillomaviruses and associated malignancies. **J. Clin. Oncol.**, **16**: 330-337, 1998.

AL-SALEH, W.; DELVENNE, P.; GREIMERS, R.; FUEDMAN, V.; DOYEN, J.; BONIVER, J. Assessment of Ki-67 antigen immunostaining in squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix. Correlation with histologic grade and Human Papillomavirus type. **Am J. Clin. Pathol.**, **104**: 154-160, 1995.

AMBROS, R. A.; KURMAN, R. J. Current concepts in the relationship of human papillomavirus infection to the pathogenesis and classification of precancerous squamous lesions of the uterine cervix. **Semin. Diagn. Pathol.**, **7**: 158-172, 1990.

ANDRADE, L.; OYAKAWA, N.; VASSALO, J. Immunohistochemical demonstration of papillomavirus infection in condylomatoses and preneoplastic lesions in the lower female genital tract. **Pathologica**, **83**: 301-306, 1991.

ANTTILA, T.; SAIKKU, P.; KOSKELA, P.; BLOGU, A.; DILLNER, J. I.; KAHEIMO, I. Serotypes of Chamydia trachomatis and risk for development of cervical squamous cell carcinoma. **J. Am. Med. Assoc.**, **285**: 47-51, 2001.

AYHAN, A.; TOK, E.; BILDIRICI, I.; AYHAN, A. Overexpression of CD44 variant 6 in human endometrial cancer and its prognostic significance. **Gynecol. Oncol.**, **80**: 355-358, 2001.

BAE, D. S.; CHO, S.B.; KIM, Y.J.; WHANG, J.D.; SONG, S.Y.; PARK, C.S.; KIM, D.S.; LEE, J.H. Aberrant expression of Cyclin D1 is associated with poor prognosis in early stage cervical cancer of the uterus. **Gynecol. Oncol.**, **81**: 341-347, 2001.

BARRASSO, R. Colposcopy as a screening tool for cervical cancer detection. Em: Franco E, Monsonogo J. (eds). **New Development in cervical cancer screening and prevention**. Blackwell Science. Oxford , 400-405, 1997.

BIESOLD, C.; KOHLER, U.; HORN, L.C.; BILEK, K.; EMMERT, C. CD44 exon 6 as a predictor of lymphatic metastasis in cervical carcinoma: an immunocytological study of 94 cases. **Arch. Gynecol. Obstet.**, **253**: 147-153, 1995.

BOSCH F.X.; MANOS M.; MUÑOZ M.; SHERMAN M.; JANSEN A.; PETO J.; SCHIFFMAN M.; MORENO ; SHAH K.V.; and the IBSCC Study Group. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J. Natl Cancer Inst.* **87**: 796-802, 1995.

BOSCH, F.X.; LORINCZ, A.; MUÑOZ, N.; MEIJER, C.J.L.M.; SHAH, K.V. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. **J. Clin. Pathol.**, **55**: 244-265, 2002.

BRADBIER C. Is infection with HIV a risk factor for cervical intraepithelial neoplasia? **Lancet**, **2**: 1277-1278, 1987.

BROWN, D.C.; GATTER, K.C. Monoclonal antibody Ki67: Its use in histopathology. **Histopathology**, **17**: 489-503, 1990.

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

CAIRNS, P.; POLASCIK, T. J.; EBY, Y.; TOKINO, K.; CALFANO, J.; MERLO, A.; MAO, L.; HERATH, J.; JINKINS, R.; WESTRA, W.; RUTTER, J. L.; BUCKLER, A.; GABUELSON, E.; TOCKMAN, M.; CHOK, R.; HEDRICK, L.; BOVA, G. S.; ISAACS, W.; KOCH, W.; SCHWAS, D.; SICHANSKY, D. Frequency of homozygous deletions at p16 / CDKN2 in primary human tumors. **Nat. Genet.**, **11**: 210-212, 1995.

CALLAGY, G.; O'GRADY, A.; BUTLER, D.; LEADER, M.; KAY, E. Expression of CD44 in uterine cervical squamous neoplasia: A predictor of microinvasion? **Gynecol. Oncol.**, **76**: 73-79, 2000.

CANN, A.J. **Principles of molecular virology**. 2.ed. California: Academic Press San Diego, 1997.

CASTELLSAGUÉ, X.; BOSCH, F. X.; MUÑOZ, N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. **Virus Res.**, **89**: 191-199, 2002.

CDC.1993 Revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. **MMWR: Morb. Mortal. Wkly. Rep.**, **41**: 1-20, 1993.

CHANG, F.; SYRJANEN, S.; KURVINEN, K.; SYRJANEN, K. The p53 tumor suppressor gene as a common cellular target in human carcinogenesis. **Am. J. Gastroenterol.**, **88**: 174-186, 1993.

CHO, N.H.; KIM, Y.T.; KIM, J.W. Correlation between G1 cyclins and HPV in the uterine cervix. **Int. J. Gynecol. Pathol.**, **16**: 339-347, 1997.

CLARKE, B.; CHETTY, R. Cell cycle aberrations in the pathogenesis of squamous cell carcinoma of the uterine cervix. **Gynecol. Oncol.**, **82**: 238-246, 2001.

CLERICI, M.; MEROLA, M.; FERRARIO, E.; TRABATTONI, D.; VILLA, M.L.; STEFANON, B.; VENZON, D.J.; SHEARER, G.M.; DE PAOLO, G.; CLERICI, E. Cytokine production patterns in cervical intraepithelial neoplasia: associations with papillomavirus infection **J. Natl. Cancer Inst.**, **89**: 245-250, 1997.

COOPER, K.; HERRINGTON, C.S.; EVANS, M.F.; GATTER, K.C.; JAMES, O.D. P53 Antigen in Cervical Condylomata, Intraepithelial Neoplasia, and Carcinoma: Relationship to HPV Infection and Integration. **J. Pathol.**, **171**: 27-34, 1993.

COSTA, S.; TERZANO, P.; BOVICELLI, A.; MARTONI, A.; ANGELELLI, B.; SANTINI, D.; CECCARELLI, C.; LIPPONEN, P.; ERZIN, M.; SYRJÄNEN, S.; SYRJÄNEN, K. CD44 isoform 6 (CD44V6) is a prognostic indicator of the response

to neoadjuvant chemotherapy in cervical carcinoma. **Gynecol. Oncol.**, **80**: 67-73, 2001.

COX, J.T.; LORINCZ, A.T.; SCHIFFMAN, M.H.; SHERMAN, M.E.; CULLEN, A.; KURMAN, R. Human papillomavirus testing women with a cytologic diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **172**: 946-54, 1995.

CRUM, C.P.; CIBAS, E.S.; LEE, K.R. **Pathology of early cervical neoplasia. Contemporary issues in Surgical Pathology.** New York: Churchil Livingstone, 288p; 1997.

CRUM, C.P. Symposium Part 1: Should the Bethesda System terminology be used in diagnostic surgical pathology?: Point. **Int. J. Gynecol. Pathol.**, **22**: 5-12, 2003.

DANIEL, B.; RANGANAJAN, A.; MUKHERJU, G.; VALIKAD, E.; KRISHNA, S. The link between integration and expression of human papillomavirus type 16 genome and cellular change in the evolution of cervical intraepithelial neoplastic lesions. **J. Gen. Virol.**, **78**: 1095-1098, 1997.

DARAI, E.; WALKER-CAMBROUZE, F.; BÉNIFLA, J.L.; HÉNIN, D.; FELDMAN, G.; MADELENAT, P.; SCOAZEC, U. E-Cadherin and CD44 expression in cervical intraepithelial neoplasia: Comparison between HIV-positive and HIV-negative women and correlation with HPV status. **Gynecol. Oncol.**, **76**: 56-62, 2000.

DEACAN, J.; PETO, J.; YULE, R.; DESAI, M.; BINNS, W.; TAYLOR, C. Sexual behaviour and smoking as determinants of cervical HPV infection and of CIN3 among those infected: a case-control study nested within the Manchester cohort. **Br. J. Cancer**, **88**: 1565-1572, 2000.

DELLAS, A.; SCHULTHEISS, E.; ALMENDRAL, A.C.; TORHOST, J.; GUDAT, F. Expression of CD44 and variant isoforms in cervical intraepithelial neoplasia. **Gynecol. Oncol.**, **62**: 218-225, 1996.

DESAINTES, C.; DEMERET, C.; GOYAT, S.; YANIV, M.; THIERRY, F. Expression of the papillomavirus E2 protein in Hela cells leads to apoptosis. **EMBO J.**, **16**: 504-514, 1997.

DE VET, H.; KNIPSCHILD, P.; SCHOUTERN, H.; KOUDSTAD, J.; KWEE, W. S.; WILLEBRAND, D.; STURMANS, F.; ARENDS, J. Interobserver variation in histopathological grading of cervical dysplasia. **J. Clin. Epidemiol.**, **43**: 1395-1398, 1990.

DEVICTOR, B.; BONNIER, P.; PIANA, L. C-myc protein and Ki-67 antigen immunodetection in patients with uterine cervix neoplasia: correlation of microcytometric analysis and histological data. **Gynecol. Oncol.**, **49**: 284-290, 1993.

DIMITRAKAKIS, C.; KYMIONIS, G.; DIAKOMANOLIS, E.; PAPASPYROU, I.; RODOLAKIS, A.; ARZIMANOGLU, I.; LEANDROS, E.; MICHALAS, S. The possible role of p53 and bcl-2 expression in cervical carcinomas and their premalignant lesions. **Gynecol. Oncol.**, **77**: 129-136, 2000.

DUENSING, S.; MUNGER, K. Centrosome abnormalities, genomic instability and carcinogenic progression. **Biochim. Biophys. Acta**, **1741**: 81-87, 2001.

DÜRST, M. Malignant progression of an HPV16-immortalized human keratinocyte cell line (HPK1A) in vitro. **Cancer Genet. Cytogenet.**, **85**: 105-112, 1995.

DYSON, N.; HOWLEY, P. M.; MUNGER, K.; HARLOW, E. The human papillomavirus – 16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. **Science**, **243**: 934-937, 1989.

EL-DEIRY, W.S.; HARPER, J.W.; O'CONNOR, P.M.; VELCULESCU, V.E.; CANMAN, C.E.; JACKMAN, J.; PIENSTEPOL, J.A.; BURRELL, M.; HELL, D.E.; WANG, Y. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. **Cancer Res**, **54**:1169-1174, 1994.

FERENCZY, A.; BERGERON, C.; RICHART, R.M. Human papillomavirus DNA in fomites and objects used for the management of patients with genital papillomavirus infections. **Obstet. Gynecol.**, **74**: 950-954, 1989.

FRANCO, E. L.; VILLA, L.L.; SOBRINHO, J. P.; PRADO, J.M.; ROUSSEAU, M.C.; DÉSY, M.; ROHAN, T.E. Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from high-risk area for cervical cancer. **J. Infect. Dis.**, **180**: 1415-1423, 1999.

FRANCO, E. L. Understanding the epidemiology of genital infection with oncogenic and nononcogenic human papillomavirus: A promising lead for primary prevention of cervical cancer. **Cancer Epidemiol. Biom.**, **6**: 759-761, 1997.

GAFFIKIN, L.; AHMED, S.; CHEN, Y.Q.; MC GRATH, J.M.; BLUMENTHAL, P.D. Risk factors as the basis for triage in low-resource cervical cancer screening programs. **Int. J. Gynecol. Obstet.**, **80**: 41-47, 2003

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**, **31**: 13-20, 1983.

GERDES, J.; LI, L.; SCHWARTZ, D. M.; WOHLLENBERG, G.; GERLACH, C.; STAHRMER, I.; KLOTH, S.; BRANDT, E.; FLAD, H.D. Immunohistochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. **Am. J. Clin. Pathol.**, **138**: 867-873, 1991.

GIARRÈ, M.; CALDEIRA, S.; MALANCHI, I.; CICCOLINI, F.; LEA, M.J.; TOMMASINO, M. Induction of pRb degradation by the human papillomavirus

Type 16 E 7 Protein is essential to efficiently overcome p16 INK4a – imposed G1 cell cycle arrest. **J. Virol.**, **75**: 40705-4712, 2001.

GOH, H.; CHAN, C.S.; KHINE, K.; SMITH, D.R. P53 and behaviour of colorectal cancer. **Lancet**, **344**: 233-234, 1994.

GOODFELLOW, P.N.; BANTING, G.; WILS, M.V.; TUNNACLIFF, A.; PARKER, M.; SOLOMON, E.; DAECHAU, R.; FABRE, J.W. The gene, MIC4, which controls expression of the antigen defined by monoclonal antibody F 10.44.2, is on human chromosome 11. **Eur. J. Immunol.**, **12**: 659-663, 1982.

GRENKO, R.T.; ABENDROTH, C.S.; FROW ENHOFFER, E.E.; RUGGIERO, F.M.; ZAINO, R.J. Variance in the interpretation of cervical biopsy specimens obtained for atypical squamous cells of undetermined significance. **Am. J. Clin. Pathol.**, **114**: 735-740, 2000.

GÜNTHER, U.; HOFMAN, M.; RUDY, W.; REBER, S.; ZÖLLER, M.; HAUSSMAM, S.; MATZKU, A.; WENZEL, H.; PONTA, H.; HERRLICH, P. A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. **Cell**, **65**: 13-24, 1991.

HARN H.J.; HO L.I.; CHANG J.Y.; WU C.W.; JIANG S.Y.; LEE H.S.; LEE, W.H. Differential expression of the human metastasis adhesion molecule CD44v in normal and carcinomatous stomach mucosa of chinese subjects. **Cancer**, **75**: 1065-1071, 1995.

HARRIS, C.C. At the crossroads of molecular carcinogenesis and risk assessment. **Science**, **262**: 1980-1981, 1993

HELLAND, A.; HOLM, R.; KRISTENSEN, G.; KAERN, J.; KARLSEN, F.; TROPE, C.; NESLAND, J. M.; BORRENSSEN, A.L. Genetic alterations of the Tp53 gene, p53 protein expression and HPV infectron in primay cervical carcinoma. **J. Pathol.**, **171**: 105-114, 1993.

HENGSTERMANN, A.; LINARES, L.K.; CIECHANOVER, A.; WHITAKER, N.J.; SHEFFNER, M. Complete switch from Mdm2 to human papillomavirus E6-mediated degradation of p53 in cervical cancer. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, **98**: 1218-1223, 2001.

HERMAN, J.G.; MERLO, A.; MAO, L. Inactivation of the CDKN2/p16/MTS 1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. **Cancer Res.**, **55**: 4525-4530, 1995.

HILDESHEIM, S.; WANG, S. Host and viral genetics and risk of cervical cancer: a review. **Virus Res.**, **89**: 229-240, 2002.

HIRAMA, T.; MILLER, C.W.; WILCZYNSKI, S.P.; KOEFFLER, H.P. P16 (CDK2) Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor / multiple tumor Suppressor -1) gene is not altered in uterine cervical carcinomas or cell lines. **Mod. Pathol.**, **9**: 26-31, 1996.

HO, G.Y.; BURK, R.D.; KEIN, S.; KADISH A.S.; CHANG, C.G.; PALAN, P.; BASU, J.; TACHEZY, R.; LEWIS, R.; ROMNEY, S. Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia. **J. Nat. Cancer Inst.**, **87**: 1365-1371, 1995.

HOWLEY, P.M. Papillomavirinae and their replication. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M. et al.(Eds.). **Virology**. 2. ed. New York: Raven Press LTDA, 1990. cap 58.

IBRAHIN, E. M.; BLACKETT, A.D.; TIDY, J. A.; WELLS, M. CD44 ia a marker of endocervical neoplasia. **Int. J. Gynecol. Pathol** **18**: 101-108, 1999.

JEFFERS, M.D.; RICHMOND, J.; HARSON, M.; MC NICOL. P53 immunoreactivity in cervical intraepithelial neoplasia and non-neoplastic cervical squamous epithelium. **J. Clin. Pathol.**, **47**: 1073-1076, 1994.

JIAN, Y.; SCHMIDT-GRIMMINGER, D.C.; CHIEN, W.M.; WI, X.; BROKER, T.R.; CHOU, L.T. Post-transcriptional induction of 21 cip1 protein by human papillomavirus E7 inhibits unscheduled DNA synthesis reactivated in differentiated keratinocytes. **Oncogene**, **17**: 2027-2038, 1998.

JOSEFSSON, A.M.; MAGNUSSON, P.K.E.; YLOTALO, N.; SORENSEN, P.; QWARFORTH-TUBBIN; ANDERSEN, P.K.; MELBYE, M.; ADAMI, H.O.; GYLLENSTEN, U.B. Viral load of human papillomavirus 16 as a determinant for development of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. **Lancet** **355**: 2189-2193, 2000.

KADISH, A.S.; HO, G.Y.; BURK, R.D.; WANG, Y.; ROMNEY, S.L.; LEDWIDGE, R.; ANGELETTI, R.H. Lymphoproliferative responses E6 and E7: outcome of HPV infection and associated neoplasia. **J. Natl. Cancer Inst.**, **89**: 1285-1293, 1997.

KAINZ, C.; KOHLBERGER, P.; TEMPFER, C.; SLIUTZ, G.; REINTHALLER, A.; GITSCH, G.; REINBREITENECKER, G. Prognostic value of CD44 splice variants in human stage III cervical cancer. **Eur. J. Cancer**, **31**: 1706-1709, 1995.

KAINZ, C.; TEMPFER, C.; KOHLBERGER, P.; JANISCH, S.; KOELBL, H.; GITSCH, G.; BREITENECKER, G. Immunohistochemical detection of adhesion molecule CD44 splice variants in lymph node metastases of cervical. **Int. J. Cancer**, **69**: 170-173, 1996.

KEATING, J. T.; CVIKO, A.; RIETHDORF, S.; RIETHDORF, L.; QUADE, B. J.; SUN, D.; DUENSING, S.; SHEETS, E.E.; MUNGER, K.; CRUM, C. P. KI 67, Cyclin E and p16 INK4a are complementary surrogate biomarkers for human papilloma virus – related cervical neoplasia. **Am. J. Surg. Pathol.**, **25**: 884-891, 2001.

KHLEIF, S. N.; DEGREGORI, J.; YEE, C. L.; OTTERSON, G. A.; KAYE, F.; NEVINS, J.; HOWLEY, P. M. Inhibition of Cyclin D – CDK4 / CDK6 activity is associated with E 2F – mediated induction of Cyclin kinase inhibitor activity. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **93**: 4350-4354, 1996.

KIM, Y.T.; CHO, N.H.; PARK, S.W.; KIM, J.W. Under expression of cyclin dependent kinase (CDK) inhibitors in cervical carcinoma. **Gynecol. Oncol.**, **71**: 38-45, 1998.

KIRKWOOD, B. R. **Essentials of Medical Statistics**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1988.

KJAER, S.K.; ADRIAAN, J.C.; BRULE, V.D.; SVARE, E.G.; SHERMAN, M.E.; POLL, P.A.; WALBOOMER, J.M.M.; BOCK, J.E.; MEIJER, J.L.M. Different risk factor patterns for high-grade and low-grade intraepithelial lesions on the cervix among HPV-positive and HPV-negative young women. **Int. J. Cancer**, **76**: 613-619, 1998.

KLAES, R.; FRIEDRICK, T.; SPITKOVSKY, D.; RIDDER, R.; RUDY, W.; PETRY, U.; DALLENBACH-HELLWEG, G.; SCHMIDT, D.; VON KNEBEL DOEBERITZ, M. Overexpression of p16INK4a as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. **Int. J. Cancer**, **92**: 276- 284, 2001.

KLAES, R.; DENER, A.; FRIEDRICH, T.; RUDIGER, R.; HERRINGTIN, S.; JENKINS, D.; KURMAN, R.; SCHMIDT, D.; STOLER, M.; VON KNEBEL DOEBERITZ, M. p16 INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intra epithelial neoplasia. **Am. J. Surg. Pathol.**, **26**: 1389- 1399, 2002.

KOHLBERGER, P.D.; KIEBACK, D.G.; BANCHER, D.; STICKELER, E.; HEINZL, H.; GITSCH, G.; BREITENECKER, G.; KAINZ, C. Immunohistochemical detection of CD44 splice variant expression in premalignant lesions of the cervix and benign cervical epithelium. **Gynecol. Oncol.**, **66**: 227-232, 1997.

KONISHI, I.; FUJII, S.; HIROFUMI, N.; NANBU, Y.; IWAI, T.; MORI, T. Immunohistochemical analysis of estrogen receptors. Progesterone receptors, Ki67

antigen and human papillomavirus DNA in normal and neoplastic epithelium of the uterine cervix. **Cancer**, **68**: 1340-1350, 1991.

KOSS, L. G. The Papanicolaou test for cervical cancer detection. A triumph and a tragedy. **JAMA**, **261**: 737-743, 1989.

KOUTSKY, L.A. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. **Am. J. Med.**, **102**: 3-8, 1997.

KURSROCK, R.; KU, S.; TALPEZ, M. Abnormalities in the PRAD1(CYCLIN D1BCL1) oncogene are frequent in cervical and vulvar squamous cell lines. **Cancer**, **75**: 589-590,1995.

LEE,J.H.; KANG, Y.S.; KOH, J. W.; KIM, B.G.; LEE, E.D.; PARK, K.B.; SEO, Y L. p53 gene mutation is rare in human cervical carcinomas with positive HPV sequences. **Int. J. Gynecol Cancer**, **4**:371-378,1994.

LEHN, H.; VILLA, L.L.; MARZIONA, F.; HILGARTH, M.; HILLEMANS, H-G.; SAUER, G. Physical state and biological activity of human papillomavirus genomes in precancerous lesions of the female genital tract. **J. gen. Virol**, **69**:187-196,1988.

LEVI, J.E.; FINK, M.C.; CANTO, C.L.; CARRETIERO, N.; MATSUBARA, R.; LINHARES, I.; DOS DORES, G.G.; COSTELO, A.; SEGURADO, A.; VIP, D.E.; ELUF, J.J. Human papillomavirus prevalence, viral load and cervical intraepithelial neoplasia in HIV-infected women. **Braz. J. Infect. Dis.**, **6**: 129-135, 2002.

LEVINE, A. J.; MOMAND, J.; FINLAY, C.A. The p53 tumour suppressor gene. **Nature**, **351**:453-456,1991.

LUKAS, J.; MÜLLER, H.; BARTKOVA, J.; KJERULFF A.A.; JANSEN,D.; STRAUSS, M.; BARTEK J. DNA tumor virus oncoproteins and retinoblastoma gene mutation share the ability to relieve the cell's requirement for cyclin D1 function in G1. **J. Cell Biol**, **125**:625-638,1994.

LYALL, H.; DUNCAN, I.D. Inaccuracy of cytologic diagnosis in high grade squamous intraepithelial lesions (CIN 3) **Acta Cytol.**, **39**: 50-54, 1995.

MACIAG, P.C.; VILLA, L.L. Genetic susceptibility to HPV infection and cervical cancer. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **32**: 915-922, 1999.

MACKAY, C.R.; TERPE, H.J.; STAUDER, R.; MARSTON, W.L.; STARK, H.; GÜNTHER, U. Expression and modulation of CD44 variant isoforms in humans. **J. Cell. Biol.**, **124**: 71-82, 1994.

MAIMAN, M. Cervical neoplasia in women with HIV infection. **Oncology**, **8**: 83-94, 1994.

MAIMAN, M. Management of cervical neoplasia in human immunodeficiency virus-infected women. **J. Natl. Cancer Inst. Monographs**, 43-49, 1998.

MANOS, M.M.; KINNEY, W.K.; HURLEY, L.B.; SHERMAN, M.E.; SHIEH-NGAI, J.; KURMAN, R.J.; RANSLEY, J.E.; FETTERMAN, B. J.; HARTINGER, J.S.; MCINTOSH, K.M.; PAWLICKMGE, HIATT, R.A. Identifying women with cervical neoplasia : using human papillomavirus DNA testing for equivocal Papanicolaou results. **JAMA**, **281**: 1605-1610, 1999.

MATSUMURA, Y.; TARIN, D. Significance of CD44 gene products for cancer diagnosis and disease evaluation. **Lancet**, **340**: 1053-1058, 1992.

MILLER, A.B.; NAZEER, S.; FONN, S.; BRANDUP-LUKANOW, A.; REHMAN, R.; CRONJE, H.; SANKARANARAYANAN, R.; KOROLTCHOUKV, SURJANEN K.; SINGER, A.; ONSRUD, M. Report on consensus conference on cervical cancer screening and management. **Int. J. Cancer**, **86**: 440-447, 2000.

MILNER, J.A. Aconformational hypothesis for suppressor and promoter function of p53 in cell growth and cancer. **Proc R. Soc. Lond. B**, **245**: 139-145, 1991.

MUNGER, K.; PHELPS, W.C.; BUBB, V.; HOULEY, P.M.; SCHLEGEL, R. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary for keratinocytes. **J. Virol.**, **63**: 4417-4421, 1989.

MUÑOZ, N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. **J. Clin. Virol.**, **19**: 1-5, 2000.

MUÑOZ, N.; FRANCESCHI, S.; BOSETTI, C.; MORENO, V.; HERRERO, R.; SMITH, J. S.; SHAH, K. V.; MEIJER, C. J. L. M.; BOSCH, F. X. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. **Lancet**, **359**: 1093-1101, 2002.

MUÑOZ, N.; BOSCH, F. X.; SANJOSÉ, S.; HERRERO, R.; CASTELLSAGUÉ, X.; SHAH, K. V.; SNIJDERS, P. J. F.; MEIJER, C. J. L. M. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. **N. Engl. J. med.**, **348**: 518-527, 2003.

NAKAMURA, T.; I DE H.; EGUCHI, R.; HOYASHI, K.; HANYU, F.; NAGASAKO, K.; YUKAWA, M.; ASAKA, K.; FUJIMORI, T.; MAEDA, S. Expression of p53 protein related to Human Papillomavirus and DNA ploidy in superficial esophageal carcinoma. **Jpn. J. Surg.**, **25**: 591-597, 1995.

NAKAO, Y.; YANG, X.; YOKOYAMA, M.; FERENCZY, A.; TANG, S.C.; PATER, M.M.; PATER, A. Induction of p16 during immortalization by HPV 16 and 18 not during transformation. **Br. J. Cancer**, **75**: 1410-1416, 1997.

NAKASHIMA, R.; FUJITA, M.; ENOMOTO, T.; HABA, T.; YOSHINOK WADA, H.; KURACHI, H.; SASAKI, M.; WAKASA, K. M.; INOURC BUZARD, G.; MURATA, Y. Alteration of p16 and p15 genes in human uterine tumores. **Br. J. Cancer**, **80** : 458- 467, 1999.

NICHOLS, G. E.; WILLIAMS, M.E.; GAFFEY, M.J.; STOLER, M.H. Cyclin D1 gene expression in human cervical neoplasia. **Mod. Pathol**, **9**:418-425,1996.

NUOVO, G.; PLAIA, T.; BELINSKY, S. A.; BAYLIN, S. B.; HERMAN, J. G. In situ detection of the hypermethylation – induced inactivation of the p16 gene as an early event in oncogenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, **96**: 12754 – 12759, 1999.

OKAMOTO, K.; BEACH, D. Cyclin G is a transcriptional target of the p53 tumor suppressor protein. **EMBO J.**, **13**: 4816-4822, 1994.

ORIEL, J.D. Natural history of genital warts. **Br. J. Vener. Dis.**, **47**: 1-13, 1971.

PALEFSKY, J. M. Cervicovaginal Human Papillomavirus infection in Human Immunodeficiency Virus –1 (HIV-1)-positive and High-risk HIV-Negative women. **J. Nat. Cancer Inst.**, (91): 226-236, 1999.

PARK, C.S.; JOO, I.S.; SONG, S.Y.; KIM D.S.; BAE, D.S.; LEE, J.H. An Immunohistochemical analysis of Heat Shock protein 70, p53 and estrogen status in carcinoma of the uterine cervix. **Gynecol. Oncol.**, **74**: 53-60, 1999.

PARKIN, D.M.; PISANI, P.; FERLAY, J. Estimates of the worldwide incidence of 18 major cancers in 1985. **Int. J. Cancer**, **54**: 594-606, 1993.

PFISTER, H.; FUCHS, P.G. Anatomy, taxonomy and evolution of papillomavirus. **Intervirology**, **37**: 143-149, 1994.

PURANEN, M.; YLISKOSKIMM, SAARIKOSKI S.V.; SYRJÄNEN, K.J.; SYRJÄNEN, S.M. Exposure of infant to cervical human papillomavirus infection of the mother is common. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **176**: 1039-1045, 1997.

QIN, X.Q.; CHITTENDEN, T.; LIVINGSTONE, D.M.; KALLIN, W.G. Identification of a growth suppression domain within the retinoblastoma gene product. **Genes Dev.**, **6**: 953-964, 1992.

REAGAN, J.W.; PATTEN, S.F. Displasia a basic reaction to injury in the uterine cervix. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, **97**: 662, 1962.

RESNICK, M.; LESTER, S.; TATE, J.E.; SHEETS, E.E.; SPARKS, C.; CRUM, C.P. Viral and histopathologic correlates of MN and MIB-1 expression in cervical intraepithelial neoplasia. **Hum. Pathol.**, **27**: 234-239, 1996.

RICHART RM. The natural history of cervical epithelial neoplasia. **Clin obstet Gynecol** **10**: 748, 1967.

RICHART, R.M. Cervical intraepithelial neoplasia. **Pathol. Annu.**, **8**: 301-328, 1973.

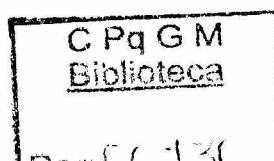
ROBERTSON, A.J.; ANDERSON, J.M.; BECK, J.S. Observer variability in histopathologic reporting of cervical biopsy Specimens. **J. Clin. Pathol.**, **42**: 231- 238, 1989.

SAEGUSA, M.; HASHIMURA, M.; MACHIDA, D.; OKAYASU, I. Down-regulation of CD44 standard and variant isoforms during the development and progression of uterine cervical tumours. **J. Pathol.**, **187**: 173-183, 1999.

SALMI, G.; GRÖN-VIRTA, K.; SOINTU, P.; GUNMAN, R.; KALIMO, H.; JALKANEN, S. Regulated expression of exon V6 containing isoforms of CD44 in man: Down regulation during malignant transformation of tumors of squamo cellular origin. **J. Cell. Biol.**, **122**: 431-442, 1993.

SANO, T.; OYAMA, T.; KASHIWABARA, K.; FUKUDA, T.; NAKAJIMA, T. Immunohistochemical overpression of p16 protein associated with intact retinoblastoma protein expression in cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia. **Pathol. Int.**, **48**: 580-585, 1998a.

SANO, T.; OYAMA, T.; KASHIWABARA, K.; FUKUDA, T.; NAKAJIMA, T. Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncongenic potencial in cervical and genital lesions. **Am. J. Pathol.**, **153**: 1741-1748, 1998b.



SCHIFFMAN, M.H. Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infections causes most cervical intraepithelial neoplasia. **J. Natl. Cancer Inst.**, **85**: 958-964, 1993.

SCHWARZ, E.; FREESE, U.K.; GISSMAM, L.; MAYER, W.; ROGGEBUCK, B.; STREMLow, A.; ZUR HAUSEN, H. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. **Nature**, **314**: 111-114, 1985.

SCHLECHT, N. F.; KULAGA, S.; ROBITAILLE, J.; FERREIRA, S.; SANTOS, M.; MIYAMURA, R. A.; DUARTE-FRANCO, E.; ROHAN, T. E.; FERENCZY, A.; VILLA, L.L.; FRANCO, E.L. Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. **JAMA**, **286**: 3106-3114, 2001

SCHLECHT, N. F.; TREVISAN, A.; DUARTE-FRANCO, E.; ROHAN, T. E.; FERENCZY, A.; VILLA, L.L.; FRANCO, E.L. Viral load as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. **Int. J. Cancer**, **103**: 519-524, 2003.

SCREATON, G.R.; BELL, M.V.; JACKSON, D.G.; CORNELIS, F.B.; GERTH, U.; BELL, J.I. Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternative spliced exons. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, **89**: 12160-12164, 1992.

SERRANO, M.; HAANON, G.J.; BEACH, D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. **Nature**, **366**: 704-707, 1993.

SHAH, K.V.; HOWLEY, P.M. Papillomaviruses. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M. (Eds.). **Virology**. New York: Raven Press LTDA, cap. 59; 1990.

SHERMAN, M.E.; LORINCZ, A.T.; SCOTT, D.R.; WACHOLDER, S.; CASTLE, P.E.; GLOSS, A.G.; MIELZYNSKA-LOHNOS, I.; RUSH, B.B.; SCHIFFMAN, M. Baseline cytology, human papillomavirus testing, and risk for cervical neoplasia: a 10-year cohort analysis. **J. Natl Cancer Inst.**, **95**: 46-52, 2003.

- SHERR, C.J. The ins and outs of RB: coupling gene expression to the cell cycle clock. **Trends Cell Biol.**, **4**: 15-18, 1994.
- SHERR, C.J. Cancer cell cycle. **Science**, **274**: 1672-1677, 1996.
- SHERR, C. J. The Ink4a /ARF network in tumor suppressor and its relatives. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**, **1**: 731-737, 2001.
- SHIMABUKURO, K.; TOYAMA-SORIMACHI, N.; OZAKI, Y.; GOI, T.; FURUKAWA, K.; MIYASAKA, T.; ASO, T.; TOYANO-SORIMACHI, N. The expression patterns of standard and variant CD44 molecules in normal uterine cervix and cervical cancer. **Gynecol. Oncol.**, **65**: 192, 1997.
- SKOMEDAL, H.; KRISTENSEN, G.B.; LEE, A.K.; HOLM, R. Aberrant expression of the cell cycle associated proteins TP53, MDM 2, p21, p27, cdk4, Cyclin D1, RB and EGFR in cervical carcinomas. **Gynecol. Oncol.**, **73**: 223-228, 1999.
- SMITH, J.S.; BOSETTI, C.; MUÑOZ, N.; BOSCH, F.X.; ELUF-NETO, J. Herpes simplex virus- 2 as an HPV cofactor in the etiology of invasive cervical cancer: a pooled analysis of the IARC multicentric case-control study. **J. Natl. Cancer Inst.**,
- SOUTHERN, S.; HERRINGTON, C.S. Differential cell cycle regulation by low-and high-risk human papillomavirus in low-grade squamous intraepithelial lesion of the cervix. **Cancer Res.**, **58**: 2941-2945, 1998a.
- SOUTHERN, S.; HERRINGTON, C.S. Molecular events in uterine cervical cancer. **Sex Trans. Inf.**, **74**:101-109,1998b.
- SPEISER, P.; WANNER, C.; TEMPFER, C.; MITCHELBOCK, M.; HANZAL, E.; BANCHER-TODESCA, D.; GITSCH, G.; REINTHALLER, A.; KAINZ, C. CD44 is an independent prognostic factor in early-stage cervical cancer. **Int. J. Cancer**, **74**:185-188, 1997.

STELLATO, G.; NUMINEN, P.; AHO, M.; LEHTINEN, T.; LEHTINEN, M.; PAONONEN, J. Type 1 cytokine response and treatment out come of genital HPV lesions. **Genitourin. Med.**, **73**: 387-390, 1997.

STOLER, M. H.; SCHIFFMAN, M. Interobserver reproducibility of cervical cytology and histologic interpretations: realistic estimates from ASCUS-LSIL triage study. **JAMA**, **285**: 1500-1505, 2001.

STOREY, A.; THOMAS, M.; KALITA, A.; HARWOOD, C.; GARDIOL, D.; MANTOVANI, F.; BREWER, J.; LEIGH, I.M.; MATLAS, G.; BANKS, L. Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. **Nature**, **393**: 229-234, 1998.

SUN, X.W.; ELLERBROCK, T.V.; LUNGU, O.; CHAISSON, M.A.; BUSH, T.G.; WRIGHT, T.C. Human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus-seropositive women. **Obstet. Gynecol.**, **85**: 680-686, 1995.

SYRJÄNEN, K. J. Spontaneous evolution of intraepithelial lesions according to the grade and type of the implicated HPV. **Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.**, **65**: 45-53, 1996.

SYRJÄNEN, K. J.; SYRJÄNEN, S.M. **Papillomavirus infections in human pathology**. John Wiley & Sons Ltda. 2000.

THOMAS, D. B.; RAY, R. M.; KOETSAWANG, A.; KIVIAT, N.; KUYPERS, J.; QIN, A.; KOETSAWANG, R. Human papillomaviruses and cervical cancer in bangkok. I risk factors for invasive cervical carcinomas with human papillomavirus types 16 and 18 DNA. **Am. J. Epidemiol.**, **153**: 723-731, 2001.

TYLER, K.L.; FIELDS, B. N. Pathogenesis of viral infections. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M. **Fields Virology**. 2.ed. New York: Raven Press, vol.1, p.191-239; 1990..

UNDERHILL, C. CD44: The hyaluronic receptor. **J. Cell Sci.**, **103**: 293-298, 1992.

VASSALO, J.; DERCHAIN, S.F.M.; PINTO, G.A.; MARTINEZ, E.; SYRJANEN, K.J.; ANDRADE, L.A.L. High risk HPV and p53 protein expression in cervical intraepithelial neoplasia. **Int. J. Gynecol. Obstet.**, **71**: 45-48, 2000.

VILLA, L.L.; SICHERO, L.; RAHAL, P.; CABALLERO, O.; FERENCZY, A.; ROHAN, T.; FRANCO, E. Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. **J. Gen. Virol.**, **81**: 2959-2968, 2000.

VON KNEBEL DOEBERITZ, M. New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. **Eur. J. Câncer**, **38**: 2229-2242, 2002.

WALBOOMERS, J.M.; JACOBS, M.V.; MANOS, M.M. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **J. Pathol.**, **189**: 12- 19, 1999.

WEINTRAUB, S.J.; CHOW, K.N.B.; LUO, R.X.; ZHANG, S.H.; HE, S.; DEAN, D. Mecanism of active transcriptional repression by the retinoblastoma protein. **Nature**, **375**: 812-815, 1995.

WINKELSTEIN JUNIOR, R W. Smoking and cancer of the uterine cervix: Hypothesis. **Rev. Commen.**, **106**: 257-259, 1977.

ZHANG, SHI-YU.; CAAMANO, J.; COOPER, F.; GUO, X.; KLEIN-SZANTO, J.P. Immunohistochemistry of Cyclin D1 in human breast cancer. **Am. J. Clin. Pathol.**, **102**: 695-698, 1994.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses in anogenital cancer as a model to understand The role of viruses in human cancer. **Cancer Res** **49**: 4677-4681, 1989.

ZUR HAUSEN, H. Papilomavirus infections: a major cause of human canceres. **Biochim. Biophys. Acta**, **1288**: 55-78, 1996a.

ZUR HAUSEN, H. Roots and perspectives of contemporary papillomavirus resuarch.
J. Cancer Res. Clin. Oncol., **122**: 3-13, 1996b.

ZUR HAUSEN. Immortabilization of human alls and their malignant conversion by
high risk human papillomavirus genotypes. **Semin. Cancer Biol.**, **9**: 405-411, 1999.

8. ANEXOS

ANEXO I

TESE DE DOUTORADO: ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO DAS PROTEÍNAS ASSOCIADAS AO CICLO CELULAR, p16^{INK4a}, CICLINA D1, p53 E Ki67 E DAS MOLÉCULAS DE ADESÃO, CD44v5 e CD44v6, EM LESÕES PRÉ-CANCEROSAS E CÂNCER INVASIVO DA CÉRVIX UTERINA E SUA RELAÇÃO COM O HPV

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Sobre o estudo:

Este trabalho tem como objetivo principal estudar o papel da defesa do organismo no desenvolvimento do câncer cervical uterino. Para tanto, analisaremos pequenos pedacinhos de colo uterino normais (pacientes que farão retirada do útero), de pacientes com infecções e com displasias (que precisem fazer biópsias). Das infecções, alguns poucos tipos do vírus HPV têm sido apontados como principais agentes causadores de lesões, que se não tratadas podem evoluir para câncer. Já é sabido que só a infecção com o HPV não é suficiente para causar câncer, sendo necessários outros fatores, como a diminuição das defesas do organismo. Por isto, escolhemos estudar colos de pacientes HIV positivas (que necessitem fazer biópsia), que desenvolvem mais facilmente outras doenças virais. Assim, poderemos comparar a defesa do organismo em vários grupos de pacientes, e chegar a conclusões que possam ajudar a entender melhor esta doença.

- A. Eu, _____ fui informada de que este estudo prevê exame ginecológico de rotina e obtenção de uma amostra de sangue. O tratamento a que serei submetida será o convencional, sendo utilizado para casos deste tipo independente da participação deste estudo.
- B. Os resultados deste estudo não me beneficiarão diretamente, mas poderão ajudar no futuro, outras pessoas com esta doença.
- C. O procedimento será o seguinte: preenchimento de questionário, exame colposcópico, citológico cervico-vaginal, microbiológico (visando o diagnóstico de *Clamidia trachomatis*, *Ureaplasma*, *Mycoplasma*, *Gonococo*, *Gardnerella vaginalis*, *Tricomonas* e Fungos), PCR para detecção do Papiloma Vírus Humano (HPV), biópsia dirigida com colposcópico (só quando houver indicação médica formal) e coleta de amostra de sangue para sorologia para HIV.
- D. O resultado da sorologia para HIV será comunicado por mim ou pelo médico assistente, juntamente com os demais exames.

- E. Os resultados destes exames serão discutidos comigo e considerados confidenciais. Os resultados serão divulgados na forma de comunicação científica, não permitindo a identificação individual dos pacientes.
- F. Os possíveis desconfortos e riscos inerentes a este procedimento são aqueles relacionados com: 1) biópsia cervical : raramente sangramento e infecção 2) da retirada de sangue venoso: dor local, e, mais raramente infecção, podem ocorrer. Estes são procedimentos médicos de rotina e todos os cuidados apropriados serão tomados.
- G. Dr. _____, discutiu comigo esta informação e se colocou à disposição para responder minhas perguntas. Se eu tiver novas perguntas, eu poderei contactá-lo pelo telefone _____, ou entrar em contato com a responsável pelo estudo, Dra. Conceição Queiroz pelo 9137-8869.
- H. Minha participação neste estudo é inteiramente voluntária, e eu sou livre para recusar ou me retirar em qualquer época após o seu início, sem afetar ou prejudicar o cuidado médico que devo receber.
- I. Recebi uma cópia deste formulário e tive a oportunidade de lê-lo (ou foi lido para mim).
- J. Pela presente, consinto voluntariamente em participar deste estudo, permitindo que os procedimentos descritos acima sejam realizados em minha pessoa.

Assinatura: _____ R.G. nº _____

Testemunha: _____ R.G. nº _____

Médico Assistente: _____

ANEXO II

Universidade Federal da Bahia
 Protocolo DST/Ca Colo Útero
Doutorado Fiocruz- Conceição Queiroz

DATA:**A . IDENTIFICAÇÃO:**

Nome:

DN: / / Idade: Cor: E. civil:

Escolaridade: Profissão:

Endereço:

Nº.estudo:

REGISTRO:

Naturalidade:

Ocupação:

TEL:

B . GINECOLOGIA

Queixa:

HMA:

Menarca:

Ciclos posteriores:

Ciclos atuais:

UM:

Primeiro coito:

Orgasmo:

No parceiros:

No último ano:

Frequência coital:

Coito anal:

Método anticoncepcional:

Uso de preservativo: **Antes:** Nunca:

Ocasional:

Sempre:

Atualmente:

Gesta: Para: Aborto: Expontâneo:

Provocado:

Parto normal:

Cesareana:

1º parto :

Último:

Aleitamento:

Tabagismo:

Quantidade:

Drogas:

Transfusão de sangue e derivados:

Doenças anteriores:

DST:

Cirurgias:

C. DADOS DO PARCEIRO

Portador do HIV () AIDS () Não sabe () Óbito ().....

Usuário de drogas ().....Bissexual ()

D. DADOS SOBRE A PROLE

HIV () AIDS () Não sabe ()

DADOS CLINICO-LABORATORIAIS;Portador do HIV () AIDS () Diagnóstico Elisa () em
confirmado:

Infecção oportunista:

Outras patologias associadas:

Internamentos:

Medicamentos:

EXAME GINECOLÓGICO

EXAMES COMPLEMENTARES (Data, método)

| Peso: | Altura: | P.A.: | ACV: | A.R.: | Membros inferiores: |
|---|-------------------------|---|------|----------------|---------------------|
| MAMAS  | Inspeção estática: | EXAME ESPECULAR  | | Vagina: | |
| | Inspeção dinâmica: | | | Colo: | |
| | Palpação: | | | Muco cervical: | |
| | Aréola e papila: | | | | |
| | Axilas: | | | | |
| VULVA e PERÍNEO  | Pilosidade: | TOQUE  | | Vagina: | |
| | Lábios: | | | Colo: | |
| | Clitóris: | | | Útero: | |
| | Meato uretral: | | | Anexo D: | |
| | Gl. Bartholin: | | | Anexo E: | |
| | Hímen: | | | Reto: | |
| | Estática pélvica: | | | Paramétrios: | |
| | Incontinência urinária: | | | | |
| Obs.: | | | | | |
| Abdome: | | | | | |

Impressão diagnóstica: _____

Conduta: _____

CD4

CD8

Relação CD4/CD8

Carga viral:

Ig:

Citologia/ Microfora:

Colposcopia

Biópsia:

Gram:

Exame à fresco;

Chlamydia:

Gonococos:

Herpes:

VDRL:

HPV:

Citomegalovirus:

Outros:

EVOLUÇÃO/TERAPÊUTICA

ANEXO III

COLPOSCOPIA

A técnica que nós usamos é a vídeo-colposcopia alargada.

Classificação colposcópica internacional (IFPC, Roma, maio de 1990).

A) Achados colposcópicos normais

Epitélio pavimentoso original
Zona de transformação Normal

B) Achados colposcópicos anormais

1) Dentro de zona de transformação

Epitélio acetobranco
Plano
Micropapilar ou microconvoluto

Pontilhado

Mosaico

Leucoplasia

Área iodonegativa

Vasos atípicos

2) Fora de zona de transformação (ectocérvice, vagina)

Epitélio acetobranco

Plano

Micropapilar ou microconvoluto

Pontilhado

Mosaico

Leucoplasia

Área iodonegativa

Vasos atípicos

C) Suspeita de carcinoma invasor

D) Colposcopia insatisfatória

Junção escamocolunar não visualizada

Colo não visível

E) Miscelânea

Micropapilas não-acetorreativas

Condiloma exofítico

Inflamação

Atrofia

Ulceração

Outros

- Especificar o grau

1º grau

Epitélio branco fino

Mosaico regular

Pontilhado regular

Leucoplasia fina

2º grau

Epitélio branco espessado

Mosaico irregular

Pontilhado irregular

Leucoplasia espessa

Vasos atípicos

ANEXO IV

SISTEMA DE TERMINOLOGIA DE BETHESDA DE 2001

TIPO DO ESPÉCIME

INDICAR O TIPO DE TÉCNICA UTILISADA, SE A CONVENCIONAL, EM MEIO LÍQUIDO, OU OUTRA.

ADEQUAÇÃO DO ESPÉCIME

- Satisfatória para avaliação (*descreve a presença ou ausência da componente da zona endocervical/transformação e qualquer outro indicador de qualidade que limite a avaliação da amostra*).
- Insatisfatória para avaliação (*especificar a razão*).
 - Espécime rejeitada/ não processada (*especificar a razão*).
 - Espécime processada e examinada, mas insatisfatória para avaliação oncótica devido a (*especificar a razão*).

CATEGORIZAÇÃO GERAL (opcional)

- Negativo para lesão intraepitelial ou malignidade.
- Anormalidade das células epiteliais: Ver interpretação/diagnóstico (*especificar "escamoso ou glandular" conforme o caso*).
- Outra: Ver interpretação/diagnóstico (*e.x. células endometriais numa mulher com mais de 40 anos*).

REVISÃO AUTOMATIZADA

Se o caso for examinado por um sistema automatizado, especifique qual o utilizado e o resultado.

TESTES COMPLEMENTARES

Forneça uma breve descrição dos métodos do teste e relate o resultado a fim de ser facilmente compreendido pelo clínico.

INTERPRETAÇÃO/ RESULTADO

NEGATIVO PARA LESÕES INTRAEPITELIAIS OU MALIGNIDADE (quando não existe evidência citológica de neoplasia, refira isto na Categorização Geral acima e/ou na secção Interpretação/Diagnóstico do relatório quer existam ou não microrganismos ou outros resultados não-neoplásicos).

MICRORGANISMOS:

- Trichomonas vaginalis

- Células glandulares de aparência benigna pós-histerectomia
- Atrofia

OUTROS:

Células endometriais (*numa mulher com mais de 40 anos*)

ANORMALIDADES DAS CÉLULAS EPITELIAIS**CÉLULAS ESCAMOSAS**

- Células escamosas atípicas
 - de significado indeterminado (ASC-US)
 - não se pode excluir HSIL (ASC-H)
- Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL)
 - inclui: HPV/displasia ligeira/C
- Lesão escamosa intraepitelial de alto grau (HSIL)
 - inclui: displasia moderada e grave, CIN 2 e CIN 3 CIS
 - com características suspeitas de invasão (se *houver suspeita de invasão*)
- Carcinoma de células escamosas

CÉLULAS GLANDULARES

- Células glandulares atípicas (*impossível especificar, ou especificar através comentários*)
 - células endocervicais
 - células endometriais
 - células glandulares
- Atípicas, favorecendo neoplasia
 - células endocervicais
 - células glandulares
- Adenocarcinoma *in situ*
- Adenocarcinoma
 - endocervical
 - endometrial
 - extra-uterino
 - outra não especificada

OUTRAS NEOPLASIAS MALIGNAS: (especificar)**SUGESTÕES E NOTAS EDUCACIONAIS (opcional)**

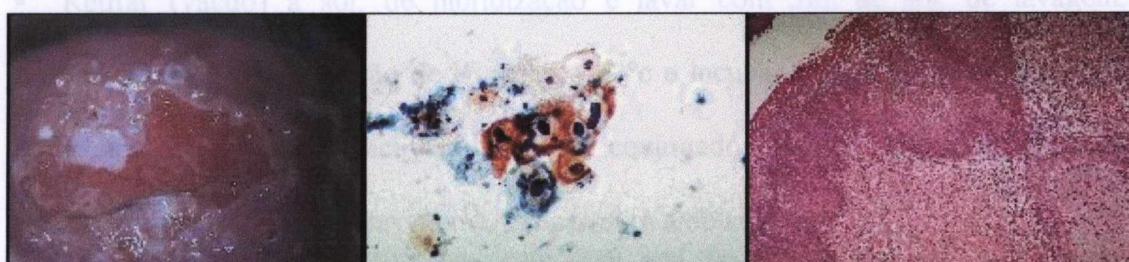
As sugestões devem ser concisas e compatíveis com os protocolos de acompanhamento clínico, publicados por organizações profissionais (referências de publicações relevantes podem ser incluídas).

ANEXO V



Caso 7. ZSD, 25 anos, HIV+, CD4 801, CV487, casada (1 parceiro), com queixa de verrugas vulvares. Colposcopia: ZTA grau 0 Citologia: normal Biópsia: normal PCR

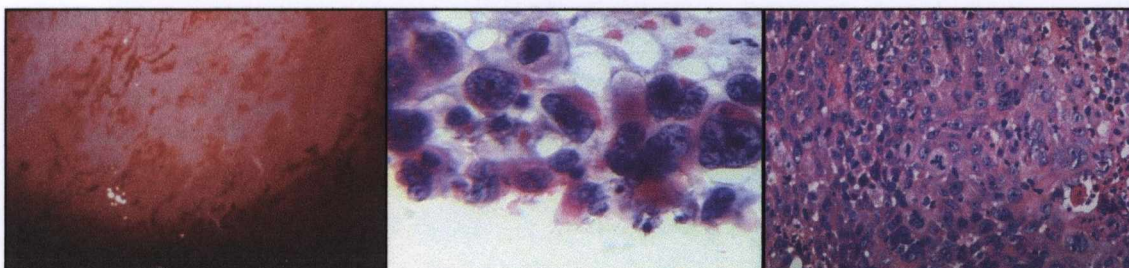
DNA-HPV:positiva



Caso 51. ECRS, 27 anos, solteira, HIV+, CD4 245, CV 1900000. Colposcopia: ZTA grau 1 Citologia: LIBG (NIC1/HPV) Biópsia: NIC 1 PCR HPV+:35,45,52,53,54



Caso 2. MICC, 36 anos, solteira, HIV positiva (CD4 152), com queixa de fluxo vaginal. Colposcopia: ZTA grau 2 Citologia: LIEAG (NIC3) Biópsia: NIC 3 PCR DNA-HPV: +,35



Caso 59. CMMO, 64 anos casada, 2 parceiros, 3partos normais fluxo vaginal hemorrágico. Colposcopia, citologia e biópsia: carcinoma invasivo HIV e HPV negativa.

ANEXO VI

PCR**Protocolo – Tiras “Roche”**

Amplitaq Gold

- 40µl de produto de PCR + 40µl de solução de denaturação.
- Aquecer solução de lavagem e solução de hibridação a 53°C.
- Acondicionar as tiras nas bandejas.
- Adicionar 3ml de solução de hibridização aquecida a 53°C.
- Aplicar 75µl do produto (amostra).
- Acondicionar a bandeja a 53°C sob agitação durante 30min.
- Retirar (vácuo) a sol. de hibridização e lavar com 3ml de sol. de lavagem, temperatura ambiente.
- Adicionar 3ml de solução de lavagem a 53°C e incubar a 53°C durante 15min sob agitação.
- Retirar (vácuo) e adicionar 3ml de conjugado, deixar 30min agitando a temperatura ambiente.
- Lavar com 3ml (sol. de lavagem), temperatura ambiente.
- Incubar 10min temperatura ambiente com 3ml de sol. de lavagem, temperatura ambiente.
- Repetir incubação 10min com 3ml de sol. de lavagem, temperatura ambiente.
- Lavar com 3ml 0,1M de citrato, temperatura ambiente.
- Repetir (vácuo) e adicionar 3ml de DEVELOP por 5min temperatura ambiente (deixar escuro).
- Lavar com H₂O e deixar em Citrato.
- Colocar as tiras em saco plástico e vedar.

Detection Reagent Formulations (According to Roche Mol. Diag., USA)

*1X Hybridization Solution (4X SSPE, 0.2% SDS) * Solução diluída
for 1liter volume

| | |
|-------------------|-------|
| 20X SSPE | 200ml |
| 20% SDS | 10ml |
| dH ₂ O | 795ml |

1X Wash Solution (1X SSPE, 0.2% SDS)
for 1 liter volume

| | |
|-------------------|-------|
| 20X SSPE | 50ml |
| 20% SDS | 10ml |
| dH ₂ O | 945ml |

Conjugate Solution
For – 200ml

1X Wash Solution 200ml - 110ml
 Amplicor SA-HRP 0.6ml - 330ml

Revelador

150ml citrato Na 0.1m
 7,5ml 10ml TMB diluido em Etor – TMB 0.1%
 15ml 20ml H2O2 30%

GFX™ GENOMIC BLOOD DNA PURIFICATION KIT
 (Amersham Pharmacia Biotech)

GFX Column

DNA PURIFICATION FROM BUCCAL CELLS

PROTOCOLO (EXTRAÇÃO NORMAL)

- 01- Aquecer previamente T.E à 70°C.
- 02- Adicionar 0,5ml de Extraction solution em 1,5 – 2,0ml da solução em estudo.
- 03- Misturar bem (vortex).
- 04- Deixar repousar por 10min. Agitar 2 ou 3 vezes, dentro desses 10 minutos.
- 05- Transferir 0,5ml para a coluna, já encaixada no tubo vazio, que acompanha o KIT.
 O volume restante 1,0 – 1,5ml será solução Stock.
- 06- Centrifugar* (0,5ml) da coluna e esvaziar o tubo de colheita (* 8000 rpm – 1 minuto).
- 07- Voltar a coluna para o tubo.
- 08- Adicionar novamente 0,5ml de Extration Solution. Centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto. Esvaziar o tubo.
- 09- Adicionar 0,5ml de Wash Solution. Centrifugar em velocidade máxima (14000 – 16000 rpm) por minutos.
- 10- Esvaziar o tubo e transferir a coluna para o tubo definitivo.
- 11- Eluição aplicar na coluna 100ml de T.E à 70°C.
- 12- Esperar 1 minuto e centrifugar a 8000rpm por 1 minuto.
- 13- Desprizar a coluna, tampar o tubo e etiquetar.

Extração DNA com Tecido Parafinado

- TEP- Tris
- Spin nos tubos 20” – 14000rpm
- 200ml TEP em todos
- Incubar os tubos a 55°C por 2 dias.
- Homogenizar sempre.
- Inativar 95°C por 10’
- Fazer extração fenol /clorofórmio

EXTRAÇÃO FENOL – CLOROFÓRMIO

- 1- Colocar o mesmo volume de Fenol (parte inferior) – 200ul
- 2- Homogenizar (vortex) por 20 segundos
- 3- Centrifugar por 1 minuto – 14000rpm
- 4- Repetir a fase aquosa, colocando-a em outro tubo limpo – reservar.
- 5- Colocar metade do volume de Fenol e a outra metade de Clorofórmio – isomílico (24 partes de Clorofórmio e 1 parte de álcool isoamílico)
- 6- Homogenizar (vortex) por 20 segundos
- 7- Centrifugar por 1 minuto
- 8- Retirar a fase aquosa, passando para outro tubo limpo
- 9- Medir a fase aquosa
- 10- Adicionar o mesmo volume de Clorofórmio-isoamílico
- 11- Homogenizar (vortex) por 20 segundos
- 12- Centrifugar por 1 minuto
- 13- Retirar a fase aquosa
- 14- Repetir as etapas de 10 a 13 (Clorofórmio – isoamílico)
- 15- Passar para outro tubo limpo
- 16- Acrescentar 2,5 X do volume de Etanol 100% gelado
- 17- Adicionar 1/10 do volume final de Acetato de Sódio 3M ph 6,0
- 18- Homogenizar (vortex) por 20 segundos
- 19- Deixar por no mínimo 3 horas a – 20 C ou 30 minutos a – 70C ou O/N a – C
- 20- Centrifugar minutos a 4 C
- 21- Retirar o sobrenadante
- 22- Deixar secar (temperatura ambiente)
- 23- Ressuspender em ul (ou 20 a 40 ul)

MATERIAL PARAFINADO

Após Extração do DNA

| | | |
|-----------------------------|--------------|----------|
| PCR – Globina | | 1X |
| Tampão 10X – | Perkin-Elmer | 5ul |
| Mg Cl ₂ – 25mm – | Perkin-Elmer | 8ul |
| DNTP – 2mm – | | 5ul |
| TAQ 60ld-5u/ul | Perkin-Elmer | 0,6ul |
| 673 – 20mm | | 0,3ul |
| 674 – 20mm | | 0,3ul |
| HSO | | 25,8ul |
| DNA | | 5ul |
| | | |
| | | VF: 50ul |

Correr um gel de agarose 1% e um gel acrilamida 8% - corar pela prata.

PCR – GP- 5/6

| | | |
|------------------|-------|--------|
| GPS + 20um | | 5ul |
| GP6 + 20um | | 5ul |
| Tampão 10X P.E | | 10ul |
| DNTP – 2mm | | 10ul |
| MgCl2 – 25mm P.E | | 0,4ul |
| H2O | | 16,6ul |
| DNA | | 4ul |
| | | |
| | | 50ul |

Após amplificação, fazer um gel de acrilamida 8% e corar pela prata.

ANEXO VII

ANEXO VIII

PROTOCOLO p16^{INK4A}

Controle positivo: carcinoma de células escamosas do colo uterino

Controle negativo: IgG de camundongo não imune

1- Desparafenização

Xilol 3 x 10 mm.

Acetona – 5min.

Alcool absoluto – 2 x 30 Seg.

Álcool 70% - 30 Seg.

Álcool 50% - 30 Seg.

Álcool 30% - 30 Seg.

Lavar em água corrente (3 lavagens).

Lavar em água destilada (3 lavagens).

2- Recuperação Antigênica:

Tanpão citrato, PH 6.0, por 20min / 97°C, em banho maria. Após os 20min, deixar esfriar por 20min a T^a

Lavar em água corrente (3 lavagens).

Lavar em água destilada (3 lavagens).

3- Bloqueio da peroxidase endógena:

Metanol + Peróxido de Hidrogênio a 3% - 20min a T/A.

Lavar em água corrente (3 lavagens)

PBS 2x5min lavar em água destilada – (3 lavagens).

4- AC Primário: Anti-human p16^{INK4a} /MTS1, MTM Laboratories, Clone E6H

Diluição: 1:100 (Diluyente DAKO cod: S 3022)

Overnight 4°C

Retirar da geladeira e deixar chegar a temperatura ambiente.

PBS 2x5min.

5- AC Secundário: KIT DAKO Envision 30min a T/A.

PBS 2x5min.

6- Revelação:

DAB – 24µl

DMSO – 10

H2O2 – 1

PBS – 1000

Misturar, filtrar e pingar sobre os cortes.

Lavar em água corrente e destilada, 5min cada.

Contra corar em hematoxilina de Gill 3min.

Lavar em água corrente e destilada (2 lavagens cada).

Álcool absoluto 2x3min.

Acetona 1min.

Xilol 2x3min.

MONTAR COM BÁLSAMO E LAMINULA.

ANEXO IX

PROTOCOLO CICLINA D1

Controle positivo: carcinoma lobular da mama

Controle negativo: IgG de camundongo não imune

1- Desparafenização

Xilol 3 x 10 mm.

Acetona – 5min.

Alcool absoluto – 2 x 30 Seg.

Álcool 70% - 30 Seg.

Álcool 50% - 30 Seg.

Álcool 30% - 30 Seg.

Lavar em água corrente (3 lavagens).

Lavar em água destilada (3 lavagens).

2- Recuperação Antigênica:

Tanpão citrato, PH 6.0, por 40min / 97°C, em banho maria. Após os 40min, deixar esfriar por 20min a T/A.

Lavar em água corrente (3 lavagens).

Lavar em água destilada (3 lavagens).

3- Bloqueio da peroxidase endógena:

Metanol + Peróxido de Hidrogênio a 3% - 20min a T/A.

Lavar em água corrente (3 lavagens)

PBS 2x5min lavar em água destilada – (3 lavagens).

4- AC Primário: Anti-human Cyclin D1, DAKO, Clone DCS-6

Diluição: 1:100 (Diluyente DAKO cod: S 3022)

Overnight 4°C

Retirar da geladeira e deixar chegar a temperatura ambiente.

PBS 2x5min.

5- AC Secundário: KIT DAKO LSAB 30min a T/A.

PBS 2x5min.

6- Streptoavidina: KIT DAKO LSAB 30min a T/A.**7- Revelação: KIT DAKO (cod K3468)**

Lavar em água corrente e destilada, 5min cada.

Contra corar em hematoxilina de Gill 3min.

Lavar em água corrente e destilada (2 lavagens cada).

Álcool absoluto 2x3min.

Acetona 1min.

Xilol 2x3min.

Montar com bálsamo e laminula.

ANEXO X

PROTOCOLO P53

Controle positivo: carcinoma de intestino

Controle negativo: IgG de camundongo não imune

1- Desparafenização

Xilol 3 x 10 mm.

Acetona – 5min.

Alcool absoluto – 2 x 30 Seg.

Álcool 70% - 30 Seg.

Álcool 50% - 30 Seg.

Álcool 30% - 30 Seg.

Lavar em água corrente (3 lavagens).

Lavar em água destilada (3 lavagens).

2- Recuperação Antigênica:

Tanpão citrato, PH 6.0, por 40min / 97°C, em banho maria. Após os 40min, deixar esfriar por 20min a T/A.

Lavar em água corrente (3 lavagens).

Lavar em água destilada (3 lavagens).

3- Bloqueio da peroxidase endógena:

Metanol + Peróxido de Hidrogênio a 3% - 20min a T/A.

Lavar em água corrente (3 lavagens)

PBS 2x5min lavar em água destilada – (3 lavagens).

4- AC Primário: Anti-human p53 protein, DAKO, Clone DO-7

Diluição: 1:50 (Diluyente DAKO cod: S 3022)

Overnight 4°C

Retirar da geladeira e deixar chegar a temperatura ambiente. PBS 2x5min.

5- AC Secundário: KIT DAKO LSAB 30min a T/A.

PBS 2x5min.

6- Streptoavidina: KIT DAKO LSAB 30min a T/A.**7-Revelação:**

DAB – 24

DMSO – 10

H2O2 – 1

PBS - 1000

Lavar em água corrente e destilada, 5min cada.

Contra corar em hematoxilina de Gill 3min.

Lavar em água corrente e destilada (2 lavagens cada).

Álcool absoluto 2x3min.

Acetona 1min.

Xilol 2x3min.

Montar com bálsamo e laminula.

ANEXO XI

PROTOCOLO KI67

Controle positivo: carcinoma da mama

Controle negativo: IgG de camundongo não imune

1- Desparafenização

Xilol 3 x 10 mm.

Acetona – 5min.

Alcool absoluto – 2 x 30 Seg.

Álcool 70% - 30 Seg.

Álcool 50% - 30 Seg.

Álcool 30% - 30 Seg.

Lavar em água corrente (3 lavagens).

Lavar em água destilada (3 lavagens).

2- Recuperação Antigênica:

Tanpão citrato, PH 6.0, por 40min / 97°C, em banho maria. Após os 40min, deixar esfriar por 20min a T/A.

Lavar em água corrente (3 lavagens).

Lavar em água destilada (3 lavagens).

3- Bloqueio da peroxidase endógena:

Metanol + Peróxido de Hidrogênio a 3% - 20min a T/A.

Lavar em água corrente (3 lavagens)

PBS 2x5min lavar em água destilada – (3 lavagens).

4- AC Primário: Ki67, DAKO, Clone Ki-S5

Diluição: 1:200 (Diluyente DAKO cod: S 3022)

Overnight 4°C

Retirar da geladeira e deixar chegar a temperatura ambiente.

PBS 2x5min.

5- AC Secundário: KIT DAKO LSAB 30min a T/A.

PBS 2x5min.

6- Streptoavidina: KIT DAKO LSAB 30min a T/A.

7-Revelação:

DAB – 24

DMSO – 10

H2O2 – 1

PBS - 1000

Lavar em água corrente e destilada, 5min cada.

Contra corar em hematoxilina de Gill 3min.

Lavar em água corrente e destilada (2 lavagens cada).

Álcool absoluto 2x3min.

Acetona 1min.

Xilol 2x3min.

Montar com bálsamo e laminula.

ANEXO XII

PROTOCOLO CD44 V5 E V6

Controle positivo: epitélio normal do colo uterino

Controle negativo: IgG de camundongo não imune

1- Desparafenização

Xilol 3 x 10 mm.

Acetona – 5min.

Alcool absoluto – 2 x 30 Seg.

Álcool 70% - 30 Seg.

Álcool 50% - 30 Seg.

Álcool 30% - 30 Seg.

Lavar em água corrente (3 lavagens).

Lavar em água destilada (3 lavagens).

2- Recuperação Antigênica:

Tanpão citrato, PH 6.0, por 40min / 97°C, em banho maria. Após os 40min, deixar esfriar por 20min a T/A.

Lavar em água corrente (3 lavagens).

Lavar em água destilada (3 lavagens).

3- Bloqueio da peroxidase endógena:

Metanol + Peróxido de Hidrogênio a 3% - 20min a T/A.

Lavar em água corrente (3 lavagens)

PBS 2x5min lavar em água destilada – (3 lavagens).

4- AC Primário: Anti-human CD44v5 Serotec, Clone VFF-8; Anti-human CD44v6

5- Serotec, CloneVFF-7 Diluição: 1:800 (Diluyente DAKO cod: S 3022)

Overnight 4°C

Retirar da geladeira e deixar chegar a temperatura ambiente.

PBS 2x5min.

6- AC Secundário: KIT DAKO Envision 30min a T/A.

PBS 2x5min.

7- Revelação:

DAB – 24

DMSO – 10

H2O2 – 1

PBS - 1000

Lavar em água corrente e destilada, 5min cada.

Contra corar em hematoxilina de Gill 3min.

Lavar em água corrente e destilada (2 lavagens cada).

Álcool absoluto 2x3min.

Acetona 1min.

Xilol 2x3min.

Montar com bálsamo e laminula.

8- Reação positiva: membrana celular

ANEXO XIII

Esta Tabela mostra combinações projetadas a partir dos 60 casos estudados, aplicando o Modelo de regressão logística binária.

Combinações projetadas a partir dos 60 casos estudados.

| Marcadores | | | Chances | | | | | |
|-------------|------|--------|---------|---------|--------|---------|----------|--------|
| Média (P16) | Ki67 | CD44v6 | Normal | NIC1 | NIC2 | NIC3 | Ca. inv. | |
| * | 0 | 0 | 1 | 81,82% | 32,87% | 0,00% | 0,00% | 0,00% |
| | 0 | 0 | 2 | 0,00% | 21,93% | 0,00% | 0,00% | 0,00% |
| * | 0 | 0 | 3 | 0,00% | 8,67% | 0,00% | 0,00% | 0,00% |
| | 0 | 0 | 4 | 4,76% | 2,02% | 0,00% | 100,00% | 0,00% |
| | 0 | 0 | 5 | 7,77% | 0,00% | 0,00% | 100,00% | 0,00% |
| | 0 | 0 | 6 | 23,84% | 0,00% | 0,00% | 25,48% | 78,09% |
| * | 0 | 1 | 1 | 100,00% | 11,12% | 0,00% | 0,00% | 0,00% |
| * | 0 | 1 | 2 | 0,00% | 6,70% | 50,00% | 0,00% | 0,00% |
| | 0 | 1 | 3 | 9,02% | 2,37% | 100,00% | 0,00% | 0,00% |
| | 0 | 1 | 4 | 99,78% | 0,52% | 0,00% | 100,00% | 0,00% |
| | 0 | 1 | 5 | 99,87% | 0,00% | 0,00% | 100,00% | 0,00% |
| | 0 | 1 | 6 | 99,96% | 0,00% | 0,00% | 27,24% | 77,09% |
| * | 0 | 2 | 1 | 0,04% | 19,13% | 0,00% | 0,00% | 0,00% |
| * | 0 | 2 | 2 | 0,00% | 11,95% | 50,00% | 0,00% | 0,00% |
| | 0 | 2 | 3 | 0,00% | 4,39% | 100,00% | 0,00% | 0,00% |
| | 0 | 2 | 4 | 0,00% | 0,99% | 0,00% | 100,00% | 0,00% |
| * | 0 | 2 | 5 | 0,00% | 0,00% | 0,00% | 100,00% | 0,00% |
| | 0 | 2 | 6 | 0,00% | 0,00% | 0,00% | 28,46% | 74,01% |
| | 0 | 3 | 1 | 0,15% | 0,01% | 0,00% | 0,00% | 0,00% |
| | 0 | 3 | 2 | 0,00% | 0,00% | 100,00% | 0,00% | 0,00% |
| | 0 | 3 | 3 | 0,00% | 0,00% | 100,00% | 0,00% | 0,00% |
| | 0 | 3 | 4 | 0,00% | 0,00% | 0,00% | 100,00% | 0,00% |
| | 0 | 3 | 5 | 0,00% | 0,00% | 0,00% | 100,00% | 0,00% |
| | 0 | 3 | 6 | 0,01% | 0,00% | 0,00% | 37,66% | 65,22% |
| * | 1 | 0 | 1 | 0,00% | 77,29% | 0,00% | 0,00% | 0,00% |
| | 1 | 0 | 2 | 0,00% | 66,12% | 0,00% | 0,00% | 0,00% |
| | 1 | 0 | 3 | 0,00% | 39,75% | 64,06% | 0,00% | 0,00% |
| | 1 | 0 | 4 | 0,00% | 12,55% | 0,00% | 100,00% | 0,00% |
| | 1 | 0 | 5 | 0,00% | 0,01% | 0,00% | 100,00% | 0,00% |
| | 1 | 0 | 6 | 0,00% | 0,00% | 0,00% | 24,72% | 79,16% |
| | 1 | 1 | 1 | 5,08% | 46,51% | 0,00% | 0,00% | 0,00% |
| * | 1 | 1 | 2 | 0,00% | 33,28% | 100,00% | 0,00% | 0,00% |
| | 1 | 1 | 3 | 0,00% | 14,43% | 100,00% | 0,00% | 0,00% |
| | 1 | 1 | 4 | 0,06% | 3,54% | 0,00% | 100,00% | 0,00% |
| | 1 | 1 | 5 | 0,10% | 0,00% | 0,00% | 100,00% | 0,00% |

| Marcadores | | | Chances | | | | |
|-------------|------|--------|---------|--------|---------|---------|----------|
| Média (P16) | Ki67 | CD44v6 | Normal | NIC1 | NIC2 | NIC3 | Ca. inv. |
| 1 | 1 | 6 | 0,37% | 0,00% | 0,00% | 26,45% | 78,19% |
| * | 1 | 2 | 0,00% | 62,17% | 0,00% | 0,00% | 0,00% |
| * | 1 | 2 | 0,00% | 48,52% | 100,00% | 0,00% | 0,00% |
| * | 1 | 2 | 0,00% | 24,17% | 100,00% | 0,00% | 0,00% |
| 1 | 2 | 4 | 0,00% | 6,48% | 0,00% | 100,00% | 0,00% |
| 1 | 2 | 5 | 0,00% | 0,00% | 0,00% | 100,00% | 0,00% |
| 1 | 2 | 6 | 0,00% | 0,00% | 0,00% | 27,65% | 75,21% |
| 1 | 3 | 1 | 0,00% | 0,05% | 43,60% | 0,00% | 0,00% |
| 1 | 3 | 2 | 0,00% | 0,03% | 100,00% | 0,00% | 0,00% |
| 1 | 3 | 3 | 0,00% | 0,01% | 100,00% | 0,00% | 0,00% |
| 1 | 3 | 4 | 0,00% | 0,00% | 1,53% | 100,00% | 0,00% |
| 1 | 3 | 5 | 0,00% | 0,00% | 6,14% | 100,00% | 0,00% |
| 1 | 3 | 6 | 0,00% | 0,00% | 22,02% | 36,73% | 66,64% |
| * | 2 | 0 | 33,33% | 68,82% | 0,00% | 0,00% | 0,00% |
| 2 | 0 | 2 | 0,00% | 55,87% | 0,00% | 0,00% | 0,00% |
| 2 | 0 | 3 | 0,00% | 29,97% | 0,01% | 0,00% | 0,00% |
| 2 | 0 | 4 | 0,55% | 8,51% | 0,00% | 100,00% | 0,00% |
| 2 | 0 | 5 | 0,93% | 0,01% | 0,00% | 100,00% | 0,00% |
| 2 | 0 | 6 | 3,36% | 0,00% | 0,00% | 28,53% | 72,93% |
| 2 | 1 | 1 | 99,98% | 36,07% | 0,00% | 0,00% | 0,00% |
| * | 2 | 1 | 0,00% | 24,45% | 75,00% | 0,00% | 0,00% |
| 2 | 1 | 3 | 1,09% | 9,86% | 100,00% | 0,00% | 0,00% |
| 2 | 1 | 4 | 98,03% | 2,32% | 0,00% | 100,00% | 0,00% |
| 2 | 1 | 5 | 98,82% | 0,00% | 0,00% | 100,00% | 0,00% |
| 2 | 1 | 6 | 99,68% | 0,00% | 0,00% | 30,42% | 71,77% |
| * | 2 | 2 | 0,00% | 51,60% | 0,00% | 0,00% | 0,00% |
| * | 2 | 2 | 0,00% | 37,95% | 75,00% | 0,00% | 0,00% |
| * | 2 | 2 | 0,00% | 17,13% | 100,00% | 0,00% | 0,00% |
| 2 | 2 | 4 | 0,00% | 4,30% | 0,00% | 100,00% | 0,00% |
| * | 2 | 2 | 0,00% | 0,00% | 0,00% | 100,00% | 0,00% |
| * | 2 | 2 | 0,00% | 0,00% | 0,00% | 31,73% | 68,27% |
| 2 | 3 | 1 | 0,02% | 0,03% | 0,00% | 0,00% | 0,00% |
| * | 2 | 3 | 0,00% | 0,02% | 100,00% | 0,00% | 0,00% |
| 2 | 3 | 3 | 0,00% | 0,01% | 100,00% | 0,00% | 0,00% |
| * | 2 | 3 | 0,00% | 0,00% | 0,00% | 100,00% | 0,00% |
| * | 2 | 3 | 0,00% | 0,00% | 0,00% | 100,00% | 0,00% |
| * | 2 | 3 | 0,00% | 0,00% | 0,00% | 41,37% | 58,63% |
| * | 3 | 0 | 0,00% | 91,44% | 0,00% | 0,00% | 0,00% |
| 3 | 0 | 2 | 0,00% | 85,98% | 0,00% | 0,00% | 0,00% |
| 3 | 0 | 3 | 0,00% | 67,45% | 0,00% | 0,00% | 0,00% |
| 3 | 0 | 4 | 0,00% | 31,06% | 0,00% | 100,00% | 0,00% |
| 3 | 0 | 5 | 0,00% | 0,03% | 0,00% | 100,00% | 0,00% |
| 3 | 0 | 6 | 0,00% | 0,01% | 0,00% | 12,08% | 88,67% |

| Marcadores | | | Chances | | | | |
|-------------|------|--------|---------|--------|---------|---------|----------|
| Média (P16) | Ki67 | CD44v6 | Normal | NIC1 | NIC2 | NIC3 | Ca. inv. |
| 3 | 1 | 1 | 22,66% | 73,20% | 0,00% | 0,00% | 0,00% |
| 3 | 1 | 2 | 0,00% | 61,04% | 0,00% | 0,00% | 0,00% |
| 3 | 1 | 3 | 0,00% | 34,63% | 100,00% | 0,00% | 0,00% |
| 3 | 1 | 4 | 0,32% | 10,33% | 0,00% | 100,00% | 0,00% |
| 3 | 1 | 5 | 0,55% | 0,01% | 0,00% | 100,00% | 0,00% |
| 3 | 1 | 6 | 2,00% | 0,00% | 0,00% | 13,08% | 88,07% |
| 3 | 2 | 1 | 0,00% | 83,77% | 0,00% | 0,00% | 0,00% |
| * 3 | 2 | 2 | 0,00% | 74,75% | 0,00% | 0,00% | 0,00% |
| * 3 | 2 | 3 | 0,00% | 50,03% | 100,00% | 0,00% | 0,00% |
| 3 | 2 | 4 | 0,00% | 17,88% | 0,00% | 100,00% | 0,00% |
| 3 | 2 | 5 | 0,00% | 0,02% | 0,00% | 100,00% | 0,00% |
| * 3 | 2 | 6 | 0,00% | 0,00% | 0,00% | 13,79% | 86,21% |
| 3 | 3 | 1 | 0,00% | 0,16% | 0,00% | 0,00% | 0,00% |
| 3 | 3 | 2 | 0,00% | 0,09% | 46,89% | 0,00% | 0,00% |
| 3 | 3 | 3 | 0,00% | 0,03% | 100,00% | 0,00% | 0,00% |
| 3 | 3 | 4 | 0,00% | 0,01% | 0,00% | 100,00% | 0,00% |
| * 3 | 3 | 5 | 0,00% | 0,00% | 0,00% | 100,00% | 0,00% |
| * 3 | 3 | 6 | 0,00% | 0,00% | 0,00% | 19,54% | 80,46% |