



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM GENÉTICA

NATHÁLIA AMARAL NOGUEIRA

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE P16INK4A EM CARCINOMAS DE COLO
UTERINO**

Goiânia-GO
2016

NATHÁLIA AMARAL NOGUEIRA

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE P16INK4A EM CARCINOMAS DE COLO
UTERINO**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vera Aparecida Saddi

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Genética da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Genética.

Goiânia-GO
2016

N778a Nogueira, Nathália Amaral

Avaliação da expressão de P16INK4A em carcinomas de colo uterino [manuscrito] / Nathália Amaral Nogueira.-- 2016.

95 f.; il.; 30 cm

Texto em português com resumo em inglês.

Dissertação (mestrado) -- Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Programa de Pós-Graduação STRICTO SENSU em Genética, Goiânia, 2016

Inclui referências, f. 70-81

1. Colo uterino - Câncer - Aspectos genéticos. 2. Colo uterino - Câncer - Diagnóstico. I.Saddi, Vera Aparecida. II.Pontifícia Universidade Católica de Goiás. III. Título.

CDU: 618.146-006(043)



**PUC
GOIÁS**

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

Av. Universitária, 1069 ● Setor Universitário
Caixa Postal 86 ● CEP 74605-010
Goiânia ● Goiás ● Brasil
Fone: (62) 3946.1070 ● Fax: (62) 3946.1070
www.pucgoias.edu.br ● prope@pucgoias.edu.br

ATA COMPLEMENTAR Nº 119/2016

MESTRADO EM GENÉTICA DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS

DISCENTE: NATHALIA AMARAL NOGUEIRA

DEFENDIDA EM 14 DE MARÇO DE 2016 E aprovada COM CONCEITO... A.....

O título foi alterado não () sim _____

BANCA EXAMINADORA

Vera Aparecida Saddi

.....
Profa Dra. Vera Aparecida Saddi / PUC Goiás
(presidente-orientador)

Flávia

.....
Profa. Dra. Flávia Melo Rodrigues / PUC Goiás
(Membro interno)

Megmar

.....
Profa. Dra. Megmar Aparecida dos Santos Carneiro/ IPTESP/UFG
(membro externo)

“Gente simples, fazendo coisas pequenas, em lugares pouco importantes, consegue mudanças extraordinárias.”

(Provérbio africano – Autor desconhecido)

Dedico este trabalho...

Aos meus pais, Carlos Alberto Mohn Nogueira e Maria Lúcia do Amaral Nogueira, pelo incentivo aos estudos, apoio incondicional e todo empenho em tornar este sonho uma realidade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, nele deposito a minha fé e encontro direção.

À minha família, meu alicerce. Meus pais, que sempre me incentivaram a sonhar e a lutar para alcançá-los, que me deram equilíbrio nos momentos de tensão e me ampararam com sabedoria. Ao meu irmão, Felipe, a quem compartilho além dos genes a alma e os ideais.

Ao meu companheiro, Fulvio que apoia meus sonhos, me dá suporte para alcançá-los e torna as batalhas diárias mais fáceis pelo simples fato de estar ao meu lado.

Aos meus amigos, os de longa data e os que fiz em decorrência do mestrado, com os quais compartilho uma história repleta de momentos alegres, cheios de compaixão e com algumas angústias.

À professora Dr^a. Vera Aparecida Saddi, a quem tenho grande estima, pelo privilégio de sua orientação. Agradeço pela disposição, paciência, o carinho e o cuidado em transmitir seus conhecimentos de forma clara e precisa para elaboração do trabalho. Obrigada pela oportunidade.

Às integrantes do “quarteto fantástico”, Ana Lucia Munaro Tacca, Ana Karolina Lopes e Jodiê do Amaral Sodário, que enfrentaram juntas comigo todos os desafios do mestrado. Com vocês tudo é possível! Obrigada pela amizade e o carinho.

Ao Prof. Dr. Cesar Vilanova-Costa, pelo importante suporte estatístico ao trabalho. Agradeço por estar sempre pronto e disponível para auxiliar qualquer questão e esclarecer dúvidas, também pelos incentivos pessoais e pela amizade.

À Dr^a. Rita de Cássia de Alencar e toda equipe do Setor de Anatomia Patologia do Hospital Araújo Jorge, pela importante colaboração e fundamental contribuição na coleta de dados e análise patológica dos casos.

O Gustavo e a Rosana, estimados professores, sem os seus ensinamentos não seria possível desenvolver a parte técnica deste trabalho.

Aos queridos, Ricardo Amorim e Ana Paula Maia, vocês foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas de pesquisa, Jéssica Cáceres, Daniel Bastos, Keila Carvalho e Larisse Dalla que compartilharam seu tempo e conhecimento, contribuindo e influenciando o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores, funcionários e colegas do Programa de Mestrado em Genética, pela experiência, conhecimento e troca de informações durante esses dois anos de curso.

À PUC-GO pelas condições de desenvolvimento e estrutura propiciados na execução deste projeto. À Fundação de Amparo à Pesquisa de Goiás (FAPEG) pela bolsa de estudos concedida.

Aos pacientes que fizeram parte deste estudo, sem os quais não seria possível.

Aos integrantes da banca examinadora, que se disponibilizaram a participar desta, enriquecendo este trabalho com sugestões finais.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
2.1 Epidemiologia.....	18
2.2 Localização Anatômica do Útero	19
2.3 Classificação Histopatológica.....	23
2.4 História Natural	26
2.5 Fatores de Risco	30
2.6 Fatores Prognósticos.....	31
2.7 Ciclo Celular e Câncer do Colo de Útero	32
2.8 P16INK4a e lesões associadas ao HPV	38
3 OBJETIVOS.....	45
3.1 Objetivo Geral	45
3.2 Objetivos Específicos	45
4 METODOLOGIA.....	46
4.1 Aspectos éticos	46
4.2 Tipo de estudo e casuística	46
4.3 Seleção da amostra	46
4.4 Avaliação da expressão de p16INK4a.....	47
4.5 Avaliação Imuno-histoquímica.....	48
4.6 Análises estatísticas	49
5 RESULTADOS	51
5.1 Característica da amostra.....	51
5.1.1 Características sociodemográficas e clinicopatológicas das pacientes com câncer de colo uterino	52
5.2 Aspectos Prognósticos: Análise de sobrevida	57
6 DISCUSSÃO	64
7 CONCLUSÕES	69
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
APÊNDICE A - Ficha de coleta de dados.....	82
APÊNDICE B - Procedimento Operacional Padrão.....	83
APÊNDICE C - Ficha de avaliação imuno-histoquímica	92
ANEXO A- Parecer consubstanciado do CEP	93

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenho esquemático do colo do útero e a vagina.	20
Figura 2. Estrutura do epitélio da ectocérvice	21
Figura 3. Estrutura do epitélio da endocérvice.....	22
Figura 4. Descrição dos epitélios do colo uterino	23
Figura 5. Infecção por HPV de alto risco e suas possíveis consequências.....	27
Figura 6. Organização genômica do HPV	28
Figura 7. Proteínas CDKIs.....	34
Figura 8. Carcinogênese não relacionada ao HPV	35
Figura 9. Características adquiridas das células tumorais	36
Figura 10. Via da proteína Retinoblastoma.	38
Figura 11. Esquema representativo da ação da p16 sobre a proliferação celular em circunstâncias normais.....	40
Figura 12. Padrão de p16INK4a em lâminas com corte histológico de carcinoma de colo uterino.....	49
Figura 13. Fluxograma com o resumo do processo metodológico da pesquisa (delineamento experimental).....	50
Figura 14. Fluxograma da seleção de casos do estudo.....	51
Figura 15. Análise de sobrevida global em 60 meses para os casos de carcinoma de colo uterino.....	57
Figura 16. Sobrevida em 60 meses em função do tipo histológico dos carcinomas de colo uterino.....	58
Figura 17. Sobrevida em 60 meses em função da extensão dos carcinomas de colo uterino...	59
Figura 18. Sobrevida em 60 meses em função da presença de metástase linfonodal nos carcinomas de colo uterino	60
Figura 19. Sobrevida em 60 meses em função da presença de metástases à distância.	61
Figura 20. Sobrevida em 60 meses em função do estadiamento clínico.	62
Figura 21. Análise da sobrevida em 60 meses dos carcinomas de colo uterino em função da expressão de p16INK4a.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. TNM e FIGO - estadiamento dos carcinomas de colo uterino	25
Tabela 2. Estudos que avaliaram a expressão de p16INK4a em carcinomas cervicais.....	43
Tabela 3. Análise descritiva das características sociodemográficas de mulheres diagnosticadas com câncer de colo uterino.....	53
Tabela 4. Análise descritiva do tratamento administrado às mulheres diagnosticadas com câncer de colo uterino.....	54
Tabela 5. Análise descritiva das características clinicopatológicas dos carcinomas de colo uterino.....	55
Tabela 6. Análise univariada das possíveis associações entre a hipoexpressão ($\leq 50\%$) e hiperexpressão ($> 50\%$) de p16INK4a e os aspectos clinicopatológicos em mulheres com carcinoma de colo uterino.....	56

LISTA DE ABREVIACOES

AC	Adenoescamoso
ACCG	Associação de Combate ao Câncer de Goiás
ADC	Adenocarcinoma
AIDS	do inglês: <i>Acquired immunodeficiency syndrome</i>
APC	do inglês: <i>Anaphase promoting complex</i>
BAX	do inglês: <i>Bcl2 associated protein X</i>
Ca	Câncer
CDK	Quinase dependente de ciclina
CDKI	Inibidor de quinase dependente de ciclina
CEC	Carcinoma escamoso cervical
CEP	Comitê de tica em Pesquisa
CpG	Citosina e guanina separada por um único fosfato
DNA	cido Desoxirribonucléico
dp	Desvio padrão
E1	Oncoproteína viral precoce 1
E2	Oncoproteína viral precoce 2
E2F	Fator de transcrição
E6	Oncoproteína viral precoce 6
E7	Oncoproteína viral precoce 7
Fase G1	Fase pré-ntese de DNA do ciclo celular
Fase G2	Fase pré-mitose do ciclo celular
Fase M	Fase de mitose do ciclo celular
Fase S	Fase de síntese de DNA do ciclo celular
FIGO	Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
HAI	Hospital Araújo Jorge
HIV	do inglês: <i>Human immunodeficiency virus</i>
HPV	Papilomavírus humano
HSIL	Lesão precursora de alto grau
HTA	Histerectomia
IARC	Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer
IHQ	Imunohistoquímica
INCA	Instituto Nacional do Câncer

JEC	Junção escamocolunar
kDa	Unidade de massa atômica
Ki67	Antígeno de proliferação celular
L1	Oncoproteína viral tardia 1
L2	Oncoproteína viral tardia 2
LSIL	Lesão precursora de baixo grau
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
OMS	Organização Mundial de Saúde
p16INK4a	Proteína 16 inibidora de quinase 4a
P53	Proteína 53
PB	Pares de bases
PBS	Tampão fosfato
pRb	Proteína retinoblastoma
SAP	Setor de Anatomia Patológica
SUS	Sistema Único de Saúde
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
TNM	Estadiamento clínico

RESUMO

Nos países em desenvolvimento, o câncer de colo uterino é responsável por grande porcentagem de mortes em mulheres de meia idade e apresenta altas taxas de incidência, especialmente devido à falta de prevenção eficiente de lesões precursoras ou de câncer inicial. Biomarcadores podem aumentar a acurácia e a efetividade de programas de rastreamento, diagnóstico e tratamento das lesões precursoras do câncer. Dentre os marcadores relacionados às alterações da proliferação celular, destaca-se p16INK4a, cuja expressão pode sugerir a presença de células transformadas, ainda que as lesões apresentem morfologia aparentemente normal, e traduzir a evolução mais rápida das células neoplásicas. O papel prognóstico de p16INK4a no câncer de colo uterino não é claro. O efeito da hiperexpressão da p16INK4a na sobrevida de pacientes com câncer de colo uterino tem sido investigado e os resultados são conflitantes. O principal objetivo deste estudo foi investigar o potencial papel prognóstico de p16INK4a em carcinomas de colo uterino. A casuística consistiu de 161 pacientes com câncer de colo uterino confirmados histologicamente e assistidos no Hospital Araújo Jorge, em Goiânia-GO, no período de 2006-2007. A avaliação da expressão de p16INK4a foi feita por meio de reação imuno-histoquímica. Os resultados foram comparados pelo teste do Chi-quadrado ou teste exato de Fisher e as análises de sobrevida pelos testes de Kaplan-Meier e Log-rank. Os resultados demonstraram a hiperexpressão de p16INK4a em 145 casos (90,0%), enquanto a hipoexpressão foi observada em 16 casos (10,0%). Nenhuma associação estatisticamente significativa foi observada entre a expressão de p16INK4a e os aspectos clinicopatológicos dos carcinomas de colo uterino avaliados. A sobrevida global para o grupo foi de 69,0%. Quando a sobrevida foi avaliada em relação à expressão de p16INK4a, observou-se que os casos com hiperexpressão apresentaram sobrevida de 70,3%, comparados aos de hipoexpressão que apresentaram sobrevida de 56,2%. A diferença entre os grupos não foi estatisticamente significativa. Com relação ao estadiamento clínico, observou-se que os casos com estágio I e II apresentaram melhor sobrevida (71,9%) em relação àqueles com estágio III e IV (54,8%) ($p=0,04$), traduzindo o melhor prognóstico dos casos diagnosticados mais precocemente. Nossos resultados não confirmaram a associação entre a expressão de p16INK4a e o prognóstico dos tumores avaliados.

Palavras-Chave: Câncer de colo uterino; p16INK4a; prognóstico.

ABSTRACT

In developing countries, uterine cervical cancer is responsible for a large percentage of deaths in middle-aged women, and presents high rates of incidence, especially due to the lack of efficient screening of precursor lesions and cancer. Biomarkers can increase the accuracy and effectiveness of screening programs, diagnosis and treatment of cervical cancer precursor lesions. Among the markers related to cell proliferation changes, p16INK4a excels. P16INK4a expression may suggest the presence of transformed cells, in the lesions seemingly normal morphology, and it also predicts the faster development of neoplastic cells. The prognostic role of p16INK4a in cervical cancer is not clear. The effect of p16INK4a expression in the survival of cervical cancer patients has been investigated and the results are conflicting. The main objective of this study was to investigate the potential prognostic role of p16INK4a in cervical carcinomas. The series comprising 161 patients attended on Araújo Jorge Hospital - Goiânia, Goiás, Brazil - from 2006 to 2007, with histologically confirmed cervical cancer, assessed for p16INK4a expression by means of immunohistochemistry. The results were compared by Chi-square test or Fisher's exact test and survival analysis by Kaplan-Meier and Log-rank tests. Overexpression of p16INK4a was observed in 145 (90.0%) of the cases. No statistically significant association was observed between p16INK4a expression and clinical pathological aspects of cervical carcinomas. The overall survival for the group was 69.0%. When survival was evaluated in relation to p16INK4a expression, cases with overexpression showed a better survival rate (70.3%), towards those with low expression (56.2%), despite the difference between groups was not statistically significant. When compared in relation to clinical staging, cases with stage I and II showed a better survival (71.9%), compared to those with stage III and IV (54.8%) ($p= 0.04$), translating the best prognosis of cases diagnosed earlier. Our results do not confirm the association between the p16INK4a expression and prognosis of uterine cervical cancer.

Keywords: uterine cervical cancer; p16INK4a; prognosis.

1 INTRODUÇÃO

O câncer de colo uterino é o quarto tumor mais incidente dentre os que afetam as mulheres no mundo, sendo responsável por grande porcentagem de mortes na meia idade, principalmente em países em desenvolvimento (OMRAN; ALSHEEHA, 2014).

Estudos mostraram que o Papilomavírus humano (HPV) é descrito uma causa necessária para o desenvolvimento do carcinoma de colo uterino e que a maioria das mulheres em todo mundo serão infectadas pelo HPV em algum momento da vida (WALBOOMERS et al., 1999; BOSCH et al., 2008; AYRES et al., 2010). Os principais tipos de HPV de alto risco, nas diferentes regiões geográficas, são o HPV 16 e 18 (TORSANELLO et al., 2013). De acordo com o tipo histológico, a Organização Mundial de Saúde (OMS) classifica os tumores do colo uterino associados ao HPV em carcinomas escamosos, adenocarcinomas e carcinomas adenoescamosos (IARC, 2016).

A infecção pelo HPV é considerada como uma das infecções sexualmente transmissíveis mais comuns no planeta (TOTA et al., 2011). Estudos mostraram a incidência de diferentes tipos de HPV de acordo com diferentes regiões geográficas (BOSCH; SANJOSÉ, 2003; BOSCH et al., 2008; AYRES et al., 2010). Em 2012, a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) lançou uma estimativa de 266.000 mortes por câncer de colo uterino no mundo, sendo que 87% desses óbitos ocorreram em países em desenvolvimento (GLOBOCAN, 2016; ICO, 2016). De acordo com Instituto Nacional do Câncer (INCA), no Brasil, em 2016, serão 16.340 novos casos de câncer do colo do útero, sendo este o terceiro tipo de câncer mais incidente entre as mulheres (INCA, 2015). Entretanto, no Centro-Oeste, o câncer de colo uterino passa a ser o segundo tipo de câncer mais incidente e são esperados 1.560 novos casos para a região em 2016 (INCA, 2015). O câncer é a segunda causa de morte nos países em desenvolvimento (JEMAL; BRAY; FERLAY, 2011).

O cenário epidemiológico do câncer foi alterado pelo desenvolvimento dos conceitos sociais e sexuais através do tempo. Bosch et al. (2008) evidencia um novo comportamento sexual entre as mulheres de 40 anos, aumentando assim a faixa etária para a prevalência de carcinoma de colo uterino, de 35–74 anos de idade (BOSCH et al., 2008). Nem todas as mulheres infectadas pelo HPV irão desenvolver câncer de colo uterino, pois existem vários fatores de risco envolvidos nesse processo (MUÑOZ et al., 2006). Dentre tais fatores, alta paridade, tabagismo, uso de contraceptivos orais por longo período, imunossupressão, comportamento sexual, número de parceiros/tempo de vida sexual dos parceiros, início

precoce de vida sexual, carga viral, nutrição, uso de camisinha, histórico de verrugas genitais e co-infecção-HPV/HIV/Clamídia representam os mais importantes (WAGGONER, 2003; MUÑOZ et al., 2006; TOTA et al., 2011).

O prognóstico dos tumores do colo uterino depende de aspectos clínicos e moleculares. Os fatores clínicos incluem idade, estágio da doença, volume do tumor, disseminação linfática e invasão vascular (TAVASSOLI; DEVILEE, 2003). Os fatores moleculares envolvem as alterações que o HPV causa no ciclo celular, com expressão de biomarcadores funcionais passíveis de serem usados para avaliar o potencial de uma neoplasia intraepitelial cervical (NIC) para a progressão ou regressão (BAAK et al., 2006). Em conjunto esses fatores designam o perfil clínico molecular do tumor, em particular, tornando possível interpretar dinamicamente a lesão tumoral, fortalecendo a possibilidade de se estabelecer um prognóstico para a paciente (CHO; KIM; KIM, 2002; BAAK et al., 2006). No que diz respeito ao câncer de colo uterino e às lesões precursoras associadas ao HPV, o marcador molecular p16INK4a vem sendo estudado. A proteína p16 é claramente um supressor de tumor, cujo papel na célula parece limitar a proliferação celular, sendo sua expressão geralmente baixa nas células do epitélio cervical normais (SCHAFER, 1998; WITKIEWICZ et al., 2011). Estudos mostraram que p16INK4a tem significância como fator prognóstico progressão de lesões precursoras do colo uterino e que poderia ser utilizada como marcador substituto para o diagnóstico precoce do carcinoma de colo uterino (ALFSEN et al., 2003; BAHANASSY et al., 2007). Entretanto, seu papel no prognóstico do câncer de colo uterino ainda não está claro. Alguns autores apontam baixos níveis de expressão de p16INK4a em pacientes com câncer de colo uterino (VAN DE PUTTE et al., 2003; FENG et al., 2007) e que a proteína está raramente mutada em tumores do colo uterino, sendo necessário desenvolver estudos mais aprofundados nesse contexto (CHO; KIM; KIM, 2002).

A história natural do HPV contribui bastante para definir estratégias de prevenção do câncer de colo uterino. Na etiologia do carcinoma de colo uterino invasivo, vários tipos de HPV estão associados ao risco e já são definidos como carcinogênicos (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68) (DOORBAR et al., 2012). Entretanto, ainda é evidente a necessidade de identificar marcadores capazes de traduzir infecções persistentes em mulheres que poderão levar ao desenvolvimento de câncer de colo uterino.

Uma vez que as principais alterações celulares induzidas pelo HPV estão relacionadas à proliferação celular, a expressão de p16INK4a pode ser considerada funcionalmente importante no câncer de colo uterino, a fim de identificar tumores com comportamento mais agressivo e com prognóstico mais sombrio (KIM; ZHAO, 2005; CHEAH et al., 2012).

Nesse sentido, o presente estudo é proposto, visando a avaliação imuno-histoquímica de p16INK4a em carcinomas de colo uterino, com o objetivo de investigar o potencial prognóstico desse marcador. A investigação do papel prognóstico de p16INK4a no câncer de colo uterino, bem como das possíveis associações entre esse marcador e os fatores clinicopatológicos dos tumores do colo uterino certamente contribuirão para o conhecimento do processo de carcinogênese do colo uterino, permitindo medidas terapêuticas mais precisas e mais vantajosas para as pacientes.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Epidemiologia

O câncer de colo uterino é o quarto tumor mais incidente dentre os que afetam as mulheres no mundo, sendo responsável por grande porcentagem de mortes na meia idade, principalmente nos países em desenvolvimento (SON et al., 2012; OMRAN; ALSHEEHA, 2014). As maiores taxas de incidência para os carcinomas de colo uterino são observadas na África do Sul, Índia e América do Sul (GOMPEL et al., 2013).

As altas taxas de incidência nos países em desenvolvimento se devem às falhas de rastreamento, evitando a possível identificação de lesões precursoras ou do câncer inicial (JEMAL; BRAY; FERLAY, 2011). As principais causas associadas às falhas de prevenção são a baixa escolaridade, o status socioeconômico, a baixa renda familiar e a dificuldade de acesso à assistência médica, que impedem ou dificultam a realização de exames citológicos (ZEFERINO, 2008).

As áreas de alto risco na África Subsaariana, América Latina e Sul da Ásia apresentam altas taxas de transmissão de HPV e do vírus da imunodeficiência humana (HIV), refletindo um risco elevado de desenvolvimento do carcinoma de colo uterino (ARBYN et al., 2011). Nos países em desenvolvimento, o diagnóstico do câncer de colo uterino ocorre, na grande maioria das vezes, em estádios tardios. Isso se deve à falta de programas de triagem eficientes e ao acesso reduzido a tratamentos eficientes (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2015).

O câncer é a segunda causa de morte nos países em desenvolvimento (JEMAL; BRAY; FERLAY, 2011). Essa taxa só cresce, sendo resultado do envelhecimento da população, de seu crescimento e do estilo de vida (JEMAL; BRAY; FERLAY, 2011).

Estudos demonstraram que o HPV é uma causa necessária para o desenvolvimento do câncer de colo uterino (WALBOOMERS et al., 1999; TORSANELLO et al., 2013) e afirmam que a maioria das mulheres, em algum momento da vida, será infectada por um tipo de HPV ou por vários (AYRES et al., 2010; CIESIELSKA et al., 2012).

O câncer de colo uterino ocorre principalmente na faixa etária de 35-50 anos, quando uma infecção persistente, adquirida no início da vida sexual, associada à exposição a fatores de risco, leva ao processo de tumorigênese (MENDONÇA et al., 2010). Contudo, o cenário epidemiológico foi alterado pelo desenvolvimento dos conceitos sociais e sexuais através do tempo. Estudos evidenciam um novo comportamento sexual entre as mulheres de 40 anos, aumentando a faixa etária para a prevalência do carcinoma de colo uterino para 35-75 anos de

idade (SONG et al., 2007; BOSCH et al., 2008). Sahasrabuddhee, Luhn e Wentzensen (2011), defendem a necessidade de uma triagem mais ativa em países em desenvolvimento, que abranja a população de baixa renda, sugerindo o tratamento, em casos de alterações citológicas, na mesma consulta do diagnóstico, evitando a perda de seguimento e conferindo eficácia e economia para as pacientes (SAHASRABUDDHEE; LUHN; WENTZENSEN, 2011; ROELENS et al., 2012).

2.2 Localização Anatômica do Útero

O útero consiste em duas partes básicas: o corpo e o colo. É um órgão muscular e está localizado na cavidade pélvica da mulher. O colo apresenta-se oco no centro, formando o canal cervical, que tem formato cilíndrico e promove a comunicação entre as cavidades uterina e vaginal. O canal do colo do útero é a porção que se estende do óstio do útero (externo) ao óstio histológico interno do útero (Figura 1) (LEPPERT, 1995).

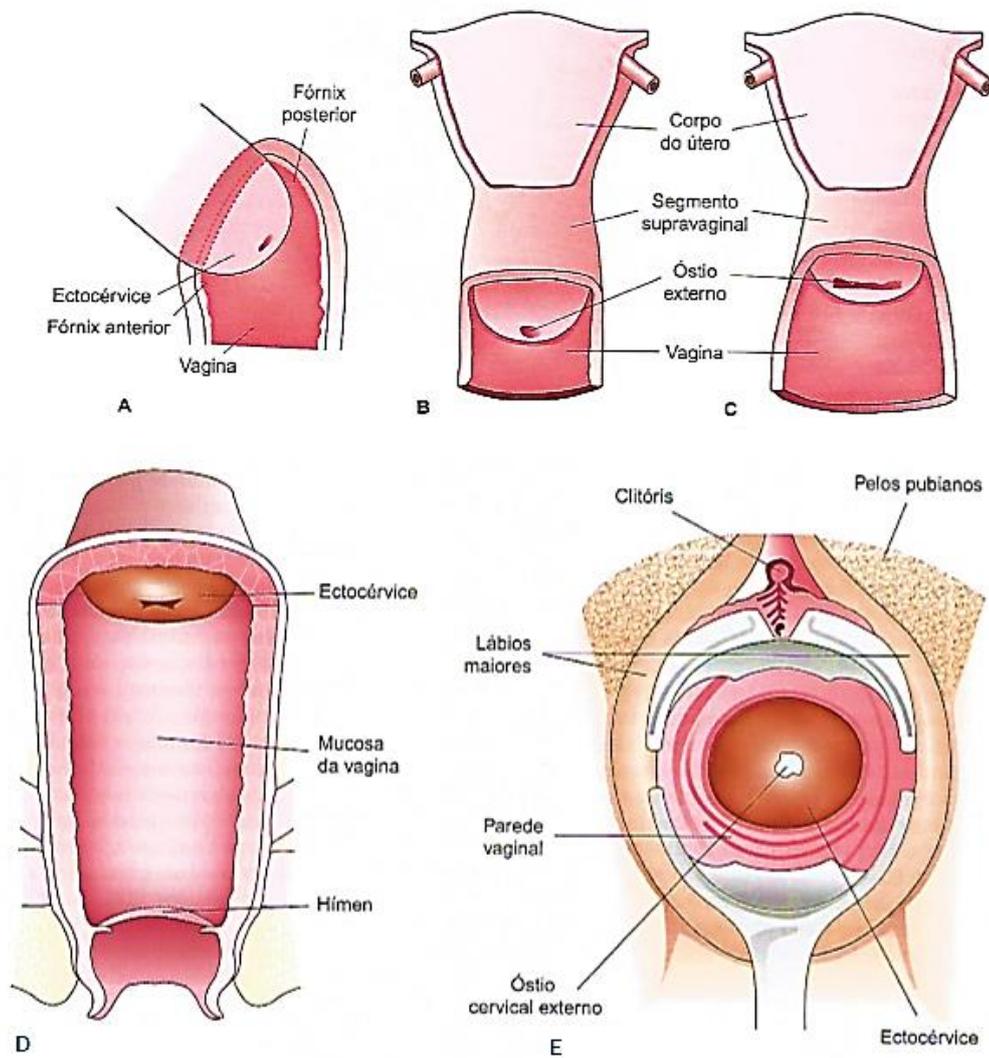


Figura 1. Desenho esquemático que mostra o colo do útero e a vagina. A. Angulação do útero em relação à vagina. B. estrutura do colo do útero em mulher virgem. C. Estrutura do colo do útero em múltipara. D. Corte longitudinal com as rugas e a ectocérvice visíveis. E. Vista frontal da ectocérvice durante o exame especular (Adaptado de SIMÕES et al., 2014).

O colo do útero é composto por dois epitélios principais, o epitélio escamoso e o epitélio glandular. No epitélio escamoso normal, a atividade de divisão celular está localizada nas camadas basais, que consistem de células indiferenciadas com uma vida útil limitada, chamadas de células de transição (BODILY; LAIMINS, 2011). Nas células basais, uma célula filha se torna uma nova célula basal ao mesmo tempo em que as outras migram para longe da camada basal e começam a se diferenciar. Ao se diferenciar, a célula deixa o ciclo celular e sofre uma série complexa de alterações na expressão dos genes (KIM; ZHAO, 2005). São produzidas queratinas de alto peso molecular pelos queratinócitos, até o envelope nuclear se romper e as células cheias de queratina se tornarem sacos vazios, resultando na morte da célula e descamação (Figura 2) (ERICKSON; ALVAREZ; HUH, 2013).

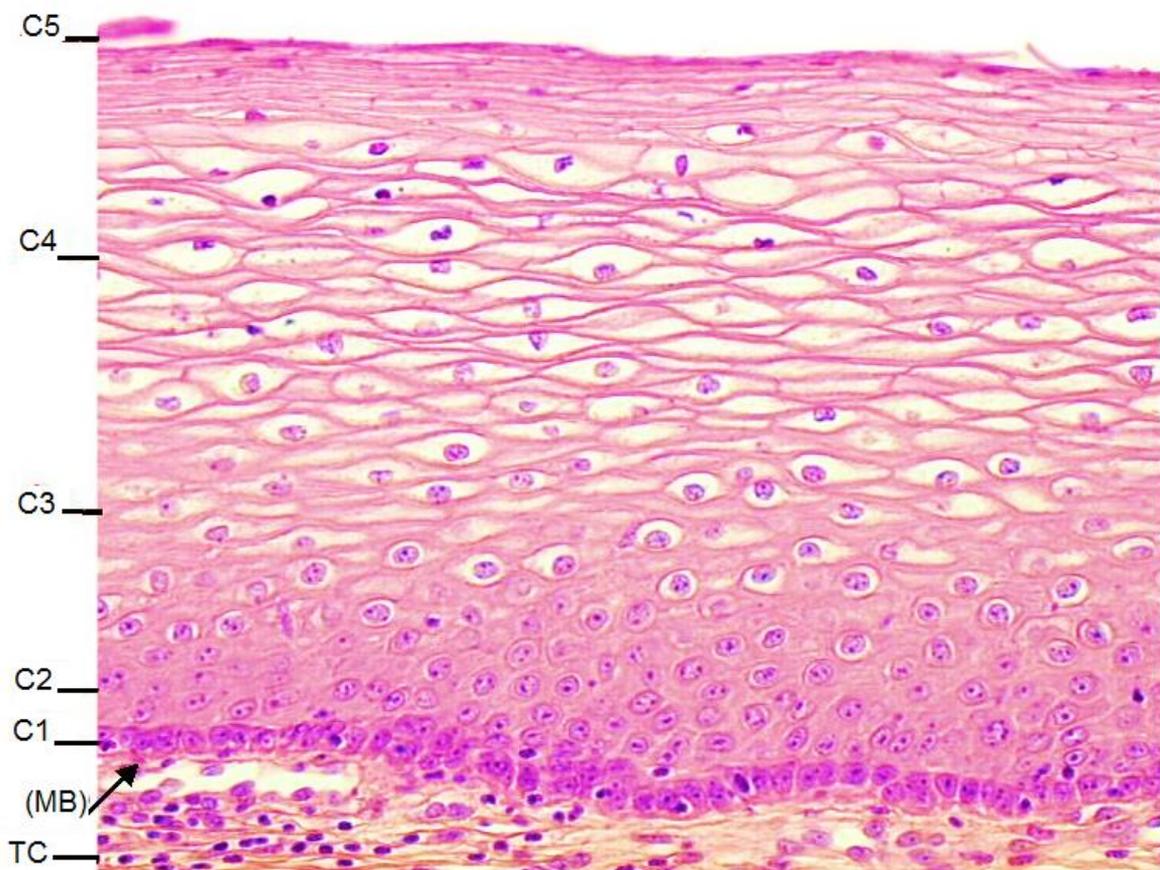


Figura 2. Estrutura do epitélio da ectocérvice: TC = tecido conjuntivo, MB = membrana basal, C1 = células basais (1 camada), C2 = células parabasais (2 camadas), C3 = células intermediárias (cerca de 8 camadas), C4 = células superficiais (5 ou 6 camadas) e C5 = células esfoliantes (Adaptado de IARC, 2016).

O epitélio glandular é composto por uma única camada de células colunares altas. O tamanho destas células varia durante o ciclo menstrual e na fase proliferativa, as células estão razoavelmente menores, com citoplasma opaco e núcleo esférico na posição central (KOSS; GOMPEL, 2006). Na fase secretora, as células se encontram distendidas pela presença de

muco, tornando-se maiores e com citoplasma mais claro; os núcleos se deslocam para a periferia das células e apresentam contornos levemente irregulares. As glândulas endocervicais possuem configuração simples, tubular e penetram no estroma da cérvix. Seu tamanho e profundidade de penetração são variáveis (Figura 3) (SIMÕES et al., 2014).

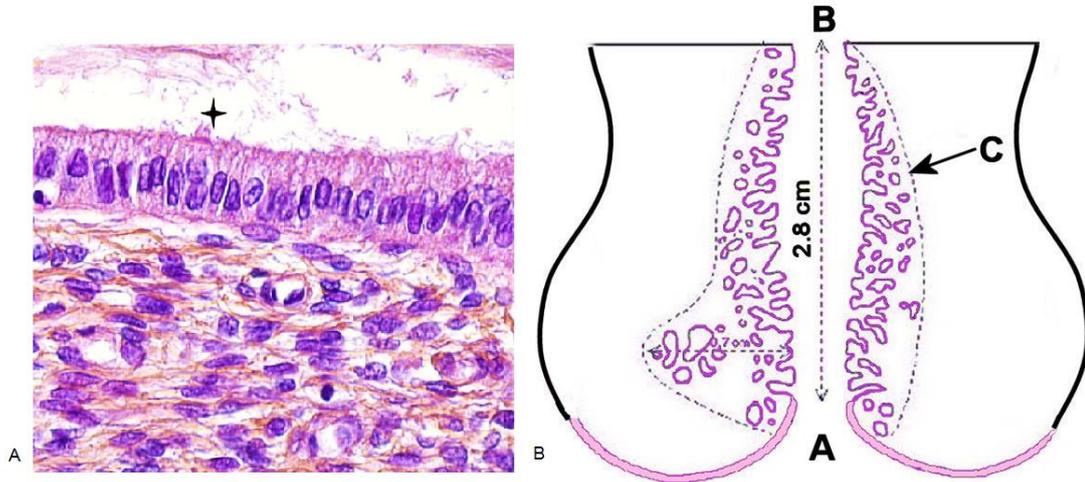


Figura 3. Estrutura do epitélio da endocérvice. A. Epitélio da endocérvice normal, composto por uma camada de mucina com algumas células ciliadas (+); B. Distribuição das glândulas endocervicais. (A= orifício externo; B= istmo e C= limites do campo glandular) (Adaptado de IARC, 2016).

A transição de células escamosas para glandulares ocorre em uma região do orifício cervical, conhecida como zona de transformação ou junção escamocolunar (JEC) (Figura 4). A maioria das displasias cervicais e cânceres invasivos surgem a partir desta área (MARTINS et al., 1999). O reconhecimento da origem das células em relação às camadas do epitélio estratificado escamoso ou glandular é fundamental para as avaliações citológicas (convencional e hormonal) e histológicas (LEVINE et al., 2009).

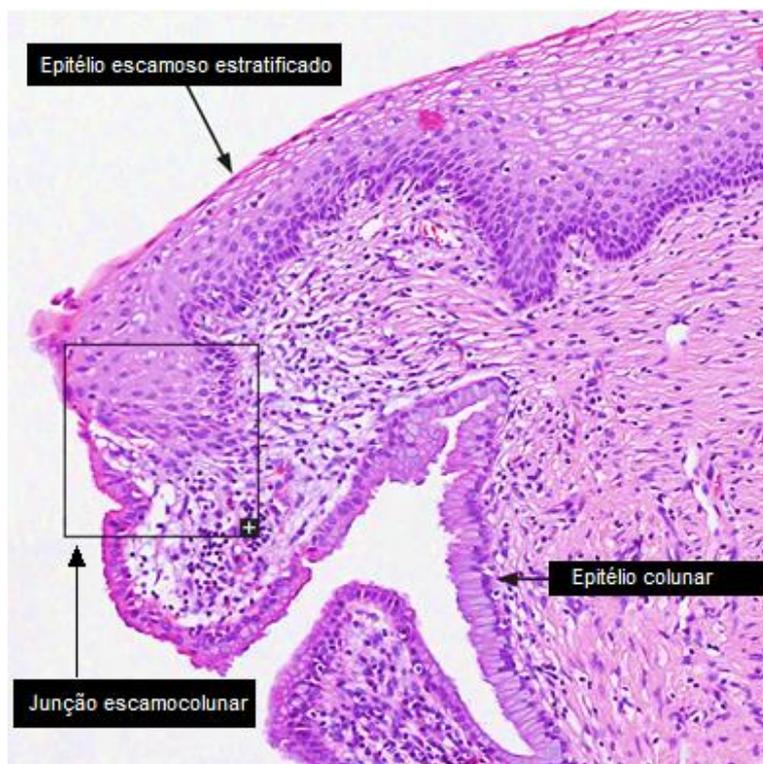


Figura 4. Descrição do epitélio do colo uterino (Adaptado de The Human Protein Atlas, 2016).

Essa zona é particularmente importante no estudo de eventos neoplásicos do colo uterino. Teoricamente, a zona de transformação está localizada na região do orifício externo da cérvix (FOCCHI et al., 2014). No entanto, sua verdadeira posição varia segundo a idade da mulher. Naquelas muito jovens, o epitélio endocervical é habitualmente encontrado na superfície ectocervical. Por volta dos 30 anos de idade, a zona de transformação passa a assumir uma posição mais cranial e, na menopausa, ela geralmente se encontra no interior do canal endocervical (KOSS; GOMPEL, 2006).

2.3 Classificação Histopatológica

De acordo com o tipo histológico, a Organização Mundial de Saúde (OMS) classifica os tumores cervicais em carcinomas escamosos, adenocarcinomas e carcinomas adenoescamosos (IARC, 2016).

As neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC) representam as lesões precursoras do carcinoma de colo uterino, limitadas ao epitélio e são classificadas em três graus de acordo com o comprometimento do epitélio, incluindo NIC 1, NIC 2 e NIC 3 ou Carcinoma *in situ* (KHAN; SMITH-MCCUNE, 2014). A NIC1 é caracterizada por uma atipia leve, que pode incluir coilocitose, já a NIC2 se apresenta como uma atipia nuclear distinta tanto na parte superior quanto inferior das camadas epiteliais, enquanto na NIC 3 são encontradas

anormalidades nucleares em grande porção do epitélio ou em toda espessura do epitélio (TAVASSOLI; DEVILEE, 2003). Uma nova abordagem, baseada no sistema Bethesda, mais utilizada por citologistas, distingue entre duas categorias, a lesão intraepitelial de baixo grau (LSIL) e a lesão intraepitelial de alto grau (HSIL). Se comparados com a classificação da OMS, LSIL relata para NIC 1 enquanto HSIL relata para NIC 2 e 3 (SOLOMON; NAYAR, 2005).

O carcinoma de células escamosas consiste em um carcinoma invasivo do epitélio escamoso, composto por vários graus de diferenciação. O carcinoma de células escamosas microinvasivo apresenta invasão inicial do estroma, do qual ainda não foi definida a extensão com precisão, e possui um baixo risco de metástase linfonodal (TAVASSOLI; DEVILEE, 2003).

O adenocarcinoma *in situ* é uma lesão normalmente situada nas glândulas, as quais são substituídas por epitélio maligno. O adenocarcinoma microinvasivo consiste de uma neoplasia glandular mínima, na qual a invasão estromal possui extensão mínima, atenuando o risco de metástase linfonodal. O adenocarcinoma invasor constitui um carcinoma que mostra diferenciação glandular e que invade a camada basal do epitélio (LAX, 2011).

Histologicamente, o tipo mais frequente de carcinoma de colo uterino é o carcinoma de células escamosas, seguido pelo adenocarcinoma que representa cerca de 20% de todos os carcinomas de colo uterino (BODNER et al., 2011). Tanto o carcinoma de células escamosas como o adenocarcinoma se desenvolvem a partir de lesões precursoras distintas (GIEN; BEAUCHEMIN; THOMAS, 2010). O tipo adenoescamoso é um carcinoma constituído pela presença de elementos epiteliais escamosos e glandulares malignos. Representa cerca de 5 a 20% de todos os carcinomas (TAVASSOLI; DEVILEE, 2003).

O uso de características histopatológicas como parâmetros de prognóstico demonstra ser uma ferramenta eficiente no tratamento do câncer de colo uterino (SILVA-FILHO, 2009). O tipo do tumor, o grau histológico, a invasão vascular e a profundidade são importantes fatores prognósticos quando usados individualmente ou como parte de um sistema de pontuação multifatorial (SINGH; ARIF, 2004). Porém, o estadiamento clínico (TNM) representa o principal sistema usado para definição do tratamento dos carcinomas de colo uterino (SILVA-FILHO, 2009). O Sistema TNM, tem por base a avaliação de três componentes para descrever a extensão anatômica da doença: T- a extensão do tumor primário; N- a ausência ou presença de metástase em linfonodos regionais; M- a ausência ou presença de metástase à distância (Tabela 1) (INCA, 2012).

O estágio no momento do diagnóstico pode ser um reflexo não somente da taxa de crescimento e extensão da neoplasia, mas também do tipo de tumor e da relação tumor-hospedeiro (XIE et al., 2012). O estágio clínico é essencial para selecionar e avaliar o tratamento, enquanto o estágio histopatológico fornece dados mais precisos para avaliar o prognóstico e calcular os resultados finais (SILVA-FILHO, 2009).

A incidência de casos de carcinomas de células escamosas tem diminuído de acordo com o estabelecimento de sistemas de triagem citológica, ao mesmo tempo que a incidência de adenocarcinomas tem aumentado (MULLER et al., 2008). Esta diferença se dá pela dificuldade em identificar lesões precursoras em glândulas, pelo fato da endocérvice não ser tão visível e acessível quanto a ectocérvice no exame Papanicolau, podendo atrasar o diagnóstico e o tratamento e influenciam na evolução dos diferentes tipos de carcinomas (ANDRADE, 2008).

Tanto o adenocarcinoma quanto o adenoescamoso, tumores que afetam células glandulares, refletem um pior prognóstico para paciente se comparados aos carcinomas de células escamosas (SILVA-FILHO, 2009).

Tabela 1. TNM e FIGO - estadiamento dos carcinomas de colo uterino

TNM	FIGO ¹	Colo Uterino
TX		O tumor primário não pode ser avaliado
T0		Não há evidência de tumor primário
Tis	-	Carcinoma “ <i>in situ</i> ” (carcinoma pré-invasivo) neoplasia intraepitelial cervical grau III (NICIII)
T1	I	Carcinoma confinado à cérvix (extensão ao corpo deve ser desprezada)
T1a	IA	Carcinoma invasivo, diagnosticado somente pela microscopia. Invasão estromal com uma profundidade máxima de 5 mm, medida desde a base do epitélio e uma disseminação horizontal de 7 mm ou menos
T1a1	IA1	Invasão estromal de até 3 mm em profundidade e com 7 mm ou menos de extensão horizontal
T1a2	IA2	Invasão estromal com mais de 3 mm e até 5 mm em profundidade e com uma extensão horizontal de 7 mm ou menos
T1b	IB	Lesão clinicamente visível, limitada ao colo, ou lesão microscópica maior do que T1a/IA2
T1b1	IB1	Lesão clinicamente visível com 4 cm ou menos em sua maior dimensão
T1b2	IB2	Lesão clinicamente visível com mais de 4 cm em sua maior dimensão
T2	II	Tumor que invade além do útero, mas não atinge a parede pélvica ou o terço inferior da vagina

T2a	IIA	Tumor sem invasão de paramétrio
T2a1	IIA1	Lesão clinicamente visível com 4 cm ou menos em sua maior dimensão
T2a2	IIA2	Lesão clinicamente visível com mais de 4 cm em sua maior dimensão
T2b	IIB	Tumor com invasão de paramétrio
T3	III	Tumor que se estende à parede pélvica, compromete o terço inferior da vagina, causa hidronefrose ou exclusão renal
T3a	IIIA	Tumor que compromete o terço inferior da vagina
T3b	IIIB	Tumor que se estende à parede pélvica, causa hidronefrose ou exclusão renal
T4	IVA	Tumor que invade a mucosa vesical ou retal, ou que se estende além da pelve verdadeira
M1	IVB	Metástase à distância

N – Linfonodos regionais

NX Os linfonodos regionais não podem ser avaliados

N0 Ausência de metástase em linfonodo regional

N1 Metástase em linfonodo regional

M - Metástase à distância

M0 Ausência de metástase à distância

M1 Metástase à distância (inclui metástase para linfonodo inguinal e doença intraperitoneal, exceto metástase para a serosa pélvica). Exclui metástase para vagina, serosa pélvica e anexos

¹A Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO) não mais inclui o Estádio 0 (Tis).

2.4 História Natural

O câncer do colo do útero é uma doença com grandes chances de ser evitada e já está bem estabelecida sua associação ao HPV. Um método de prevenção para o desenvolvimento do câncer de colo uterino disponível é a vacina profilática contra o HPV (GHITTONI et al., 2015). Essas vacinas consistem em partículas semelhantes a vírus (VLPs), que não contêm DNA e gatilho viral, mas possuem capsídeos montados gerando uma resposta de anticorpos que protege contra a infecção (BODILY; LAIMINS, 2011). A vacina protege contra a infecção dos tipos de HPV 16, 18, 6 e 11, os tipos mais comuns em infecções pelo mundo (BEGLIN; MELAR-NEW; LAIMINS, 2009). Para entender melhor a história natural da

doença, é necessário conhecer bem a relação do HPV com o sistema imune e o processo da doença (ROSINI; ZAPPACOSTA, 2012).

O histórico do carcinoma de colo uterino é caracterizado por fases pré-malignas bem definidas (Figura 5) (CID ARREGUI et al., 2012). O HPV está intimamente relacionado à iniciação do câncer de colo uterino. A infecção persistente pelo vírus pode levar à neoplasia intraepitelial, que progride para o câncer invasor (BODILY; LAIMINS, 2011; DUGUE et al., 2013; ERICKSON; ALVAREZ; HUH, 2013; GADDUCCI et al., 2013).

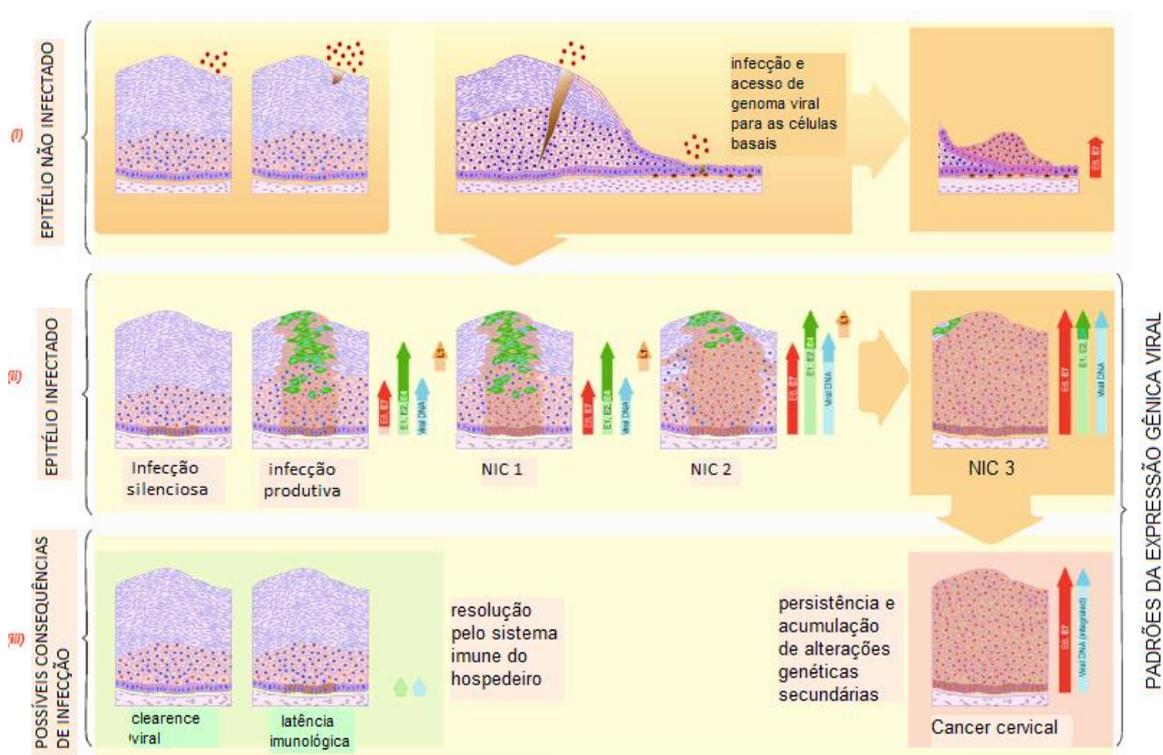


Figura 5. Infecção por HPV de alto risco e suas possíveis consequências (Adaptado de BOSH et al., 2013).

A infecção pelo HPV é considerada a mais comum das infecções sexualmente transmissíveis no planeta (TOTA et al., 2011). Os HPVs compõem uma família de pequenos vírus de DNA de fita dupla, com genoma de 8000 pares de bases (pb) de tamanho (DOORBAR et al., 2012). Já foram identificados mais de 200 tipos de HPV pelo mundo. Estes são divididos em HPV de alto risco, considerados carcinogênicos, HPV de risco intermediário, considerados possíveis agentes carcinogênicos e HPV de baixo risco, geralmente não associados às malignidades (BODILY; LAIMINS, 2011; STANLEY, 2012).

O genoma do HPV pode ser dividido em três regiões distintas, uma região de codificação que contém os genes precoces (E1, E2, E4, E5, E6 e E7), uma região que contém os genes tardios (L1 e L2) e uma região não codificante (URR) que contém a maior parte dos

elementos reguladores envolvidos na replicação do DNA viral e transcrição dos genes virais (Figura 6) (TOMMASINO, 2014).

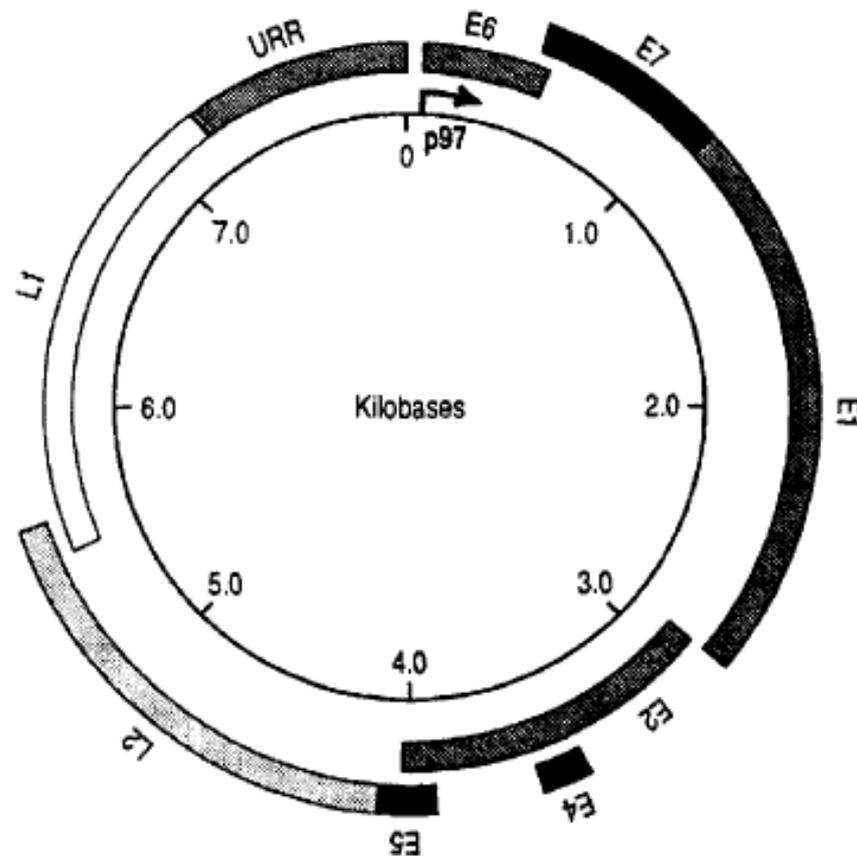


Figura 6. Organização genômica do HPV (Adaptado de PARK; FUJIWARA; WRIGHF, 1995).

A região de genes precoce consiste de seis áreas de leitura abertas (do inglês open reading frames - ORFs). E6 e E7 codificam oncoproteínas críticas para a replicação viral, bem como a imortalização e transformação da célula hospedeira (DUENSING; MÜNGER, 2004). E1 e E2 também são críticas para a replicação viral, E1 codifica duas proteínas separadas exigidas para replicação do DNA extracromossomal e a conclusão do ciclo de vida viral (YANG, 2013). A E2 codifica duas proteínas separadas que, em conjunto com E1, são necessários para a replicação do DNA extracromossomal (LEHOUX; D'ABRAMO; ARCHAMBAULT, 2009). A proteína E4 tem papel importante na maturação e replicação do vírus e é expressa em estágios posteriores da infecção, quando os vírions estão sendo montados (BODILY; LAIMINS, 2011). A proteína E5 interage com receptores da membrana celular que podem estimular a proliferação celular (GHITTONI et al., 2015).

A Região que contém os genes tardios abrange duas ORFs separadas que codificam as proteínas que formam o capsídeo viral (FREITAS; COIMBRA; LEITÃO, 2014). A ORF da

L1 codifica a principal proteína do capsídeo viral, e é altamente conservada entre as diferentes espécies de papilomavírus (LONGWORTH; LAIMINS, 2004). A L2 tem variações de sequência consideravelmente maiores entre os tipos de HPV. A transcrição a partir dos genes tardios ocorre quando os virions estão completos para serem montados estruturalmente (MOTOYAMA et al., 2004).

A URR é um segmento de DNA de aproximadamente 400 pares de bases adjacente à origem de replicação viral que contém um complexo conjunto de sítios de ligação para diferentes ativadores e repressores de transcrição (PARK; FUJIWARA; WRIGHF, 1999). A região não codificante regula a transcrição das regiões precoces e tardias assim como controla a produção de proteínas virais e partículas infecciosas (LEHOUX; D'ABRAMO; ARCHAMBAULT, 2009).

No colo do útero, o HPV infecta as células da camada basal, principalmente da zona de transformação, que apresentam relativamente um baixo número de cópias. Quando as células deixam a camada basal do epitélio, o HPV inicia a replicação do DNA viral. Durante esta fase, o genoma do HPV é amplificado para mais de 1000 cópias por célula (LEHOUX; D'ABRAMO; ARCHAMBAULT, 2009). Após esta etapa, a expressão de genes tardios é iniciada e as partículas virais são produzidas e liberadas (EGAWA et al., 2015).

Os cânceres associados ao HPV são geralmente causados por um grupo de papilomavírus do gênero Alpha, que se referem aos HPVs de alto risco (DOORBAR et al., 2015). O DNA do HPV pode ser identificado em 99,8% de todos os cânceres cervicais (WALBOOMERS, 1999), sendo os tipos HPV 16 e HPV 18 os mais frequentes (FORAN; BRENNAN, 2015).

As infecções causadas por HPV de alto risco, comumente, duram de 12 a 18 meses e são eventualmente eliminadas pelo sistema imune (ODUNSI; PEJOVIC; ANDERSON, 2011; BOSCH et al., 2013). A incidência dessa infecção tem picos antes dos 25 anos e declina como infecções assintomáticas e são eliminadas pelo sistema imune do hospedeiro (DOORBAR, 2016), não persistindo tempo suficiente para causar desregulação na expressão gênica e acúmulo de erros genéticos secundários (DOORBAR et al., 2012). Entretanto, o DNA do HPV pode permanecer, mesmo após a regressão da lesão, se mantendo em uma subcamada das células basais do epitélio em estado de latência (DOORBAR, 2013).

Eventualmente, existem casos em que o sistema imune falha em eliminar a ação do vírus e a infecção se torna persistente a longo prazo (RIBEIRO et al., 2015). Eventuais rupturas da membrana basal do epitélio são importantes na definição do caráter invasivo das alterações epiteliais malignas. As células malignas precisam atravessar a membrana basal para

que o câncer seja caracterizado como invasivo (KOSS; GOMPEL, 2006). O intervalo de tempo entre o pico da infecção por HPV e o pico de incidência do câncer ocorre entre duas a quatro décadas e nesse período outros fatores de risco podem influenciar a carcinogênese (EGAWA et al., 2015).

2.5 Fatores de Risco

Nem todas as mulheres infectadas pelo HPV desenvolverão tumor do colo do útero, pois existem outros fatores de risco envolvidos nesse processo. Além do HPV, outros cofatores modificam o risco para a mulher, como a alta paridade, o uso de contraceptivos orais por longo período, que estimulam a proliferação celular e a transcrição dos genes E6 e E7 (CIESIELSKA et al., 2012), o tabagismo, a imunossupressão, o comportamento sexual, o início precoce de vida sexual, a carga viral, a nutrição, o número de parceiros/tempo de vida sexual dos parceiros, o uso de camisinha, o histórico de verrugas genitais e a co-infecção HPV/HIV/Clamídia/Herpes representam os mais importantes (WAGGONER, 2003; CIBULA et al., 2010; TOTA et al., 2011; DUGUE et al., 2013; GOMPEL et al., 2013; KUKU et al., 2015).

Uma dieta saudável e bons hábitos de vida que envolva a prática de exercícios podem desempenhar um papel protetor no desenvolvimento do câncer de colo uterino, bem como o consumo de nutrientes e antioxidantes, que contribuem com o bom desempenho e a manutenção da saúde (AGGARWAL, 2014).

O tabaco altera inúmeros mecanismos no organismo da mulher, incluindo a diminuição da resposta imune especialmente no colo uterino, e promovendo o aparecimento de danos e mutações no DNA. Tais ações tornam o tabagismo um importante fator de risco para o câncer de colo uterino (CAMPANER; SANTOS; GALVÃO, 2007; ROURA et al., 2014). Mulheres com imunossupressão ocasionada por HIV/AIDS ou com órgãos transplantados também apresentam um aumento no risco de desenvolvimento de câncer por causa do seu status de imunossupressão (DUGUE et al., 2013).

Os riscos relacionados ao comportamento sexual, como sexo em idade precoce, alta paridade, número de parceiros e comportamento sexual do parceiro estão associados com o aumento da probabilidade de infecção pelo HPV, com a forma como é adquirida e também com a possibilidade de múltiplas infecções com diferentes HPVs de alto risco e consequente persistência e progressão para lesões neoplásicas (RIBEIRO et al., 2015).

De forma paralela, a baixa escolaridade e o baixo nível social compreendem a classificação de risco comportamental, que está associada à presença de anormalidades citológicas, principalmente em adolescentes. Por falta de conhecimento ou condições financeiras, as adolescentes não procuram tratamento adequado e as infecções tornam-se persistentes (FIGUEIREDO ALVES et al., 2013; LONGATTO-FILHO et al., 2015).

Sabe-se que o estrógeno desempenha mudanças importantes no corpo da mulher e no colo do útero não é diferente, causando variações de expressão de certos genes do HPV e consequentemente estimulando a proliferação de células do colo uterino por meio de efeitos dos hormônios sobre os genes virais e através de mecanismos mediados por receptores (CIBULA et al., 2010; CIESIELSKA et al., 2012). Mulheres que usam contraceptivos orais são mais suscetíveis à exposição ao HPV do que as mulheres que usam métodos contraceptivos de barreira ou não tem relações sexuais (CIBULA et al., 2010).

Embora a transmissão de partículas virais tenha sido documentada em várias localizações anatômicas, o colo do útero é o local mais comum de infecção pelo HPV, que tem como alvo as células basais do epitélio que se proliferam ativamente. As células infectadas não sofrem diferenciação terminal e o genoma viral começa a reprodução assim que entra na célula. Então as células migram para a camada epitelial acima da camada basal e liberam partículas de HPV, que podem infectar um novo hospedeiro ou o próprio tecido adjacente (BODILY; LAIMINS, 2011; ERICKSON; ALVAREZ, HUH, 2013).

2.6 Fatores Prognósticos

São considerados fatores prognósticos para o câncer de colo uterino o estadiamento clínico, o tipo histológico, o tamanho tumoral, o grau de diferenciação, a invasão linfovascular, a profundidade da invasão estromal, a presença de metástases linfonodais, o acometimento das margens cirúrgicas, a idade, o estado nutricional e a saúde geral da paciente (SILVA-FILHO, 2009; NAKAGAWA et al., 2011). A determinação do prognóstico de uma paciente acontece de acordo com os fatores complexos e interativos que atuam de forma conjunta na evolução da doença (XIE et al., 2012).

O estadiamento clínico tumoral, de acordo com a Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO), representa o fator prognóstico mais importante no câncer do colo do útero, envolvendo a sua disseminação local e à distância (ZARCHI et al., 2010; TEKE et al., 2015). O tamanho tumoral tem sido considerado relevante para mulheres nos estádios I e II. O tipo histológico influencia na evolução prognóstica da paciente, os tumores

de células escamosas apresentam um melhor prognóstico, mas o tipo histológico não define o tratamento isoladamente (GIEN; BEAUCHEMIN, THOMAS, 2010).

O grau de diferenciação ainda não foi comprovado como um fator prognóstico independente (SILVA-FILHO, 2009). A invasão linfovascular está associada à metástase nos linfonodos pélvicos, ao acometimento parametrial e da vagina. As margens cirúrgicas, em casos de mulheres submetidas à histerectomia em que há acometimento dos paramétrios ou vagina, representam a possibilidade de uma recidiva (XIE et al., 2012).

Pacientes com bom estado geral tendem a responder melhor ao tratamento, se recuperando mais rapidamente do que as pacientes imunossuprimidas (DUGUE et al., 2013). A nutrição é outro fator que influencia o bem estar geral e consequente melhoria do quadro. A ingestão de nutrientes e antioxidantes contribui com a manutenção da saúde em geral (AGGARWAL, 2014).

A idade pode estar relacionada ao desenvolvimento do tumor, levando em conta que os tumores relacionados ao HPV de alto risco demoram cerca de 20 anos para se desenvolver, afetando mulheres mais velhas que apresentam a JEC mais interiorizada e de difícil acesso no exame citológico (BAALBERGEN et al., 2004). As mulheres mais jovens com tumores não relacionados ao HPV tendem a ter um pior prognóstico, atentando-se para o fato que desenvolveram uma tumorigênese por danos nos mecanismos de controle do ciclo celular e sem a ação de um agente de risco externo (JANICEK; AVERETTE, 2001; RODRÍGUEZ et al., 2008).

Além desses fatores prognósticos bem definidos, existem outros candidatos, como os fatores envolvidos na regulação do ciclo celular, que podem fornecer informações adicionais (BODNER et al., 2011). Em conjunto os fatores clínicos e moleculares designam o perfil clínico molecular do tumor, sendo possível interpretar dinamicamente a lesão tumoral, fortalecendo a possibilidade de se estabelecer um prognóstico para a paciente (LORINCZ, 2014).

2.7 Ciclo Celular e Câncer do Colo de Útero

O ciclo celular pode ser conceituado como o intervalo entre uma divisão celular e outra. Em seres eucariontes, a divisão celular ocorre em quatro fases, G1, S, G2 e M. A fase G1 representa o intervalo entre a mitose e uma nova duplicação do DNA, na qual a célula se

desenvolve, inicia a ativação de uma série de genes, aumenta a quantidade de suas organelas e integra os sinais do microambiente (SCHAFER, 1998). Na fase S, ocorre a ativação dos complexos replicativos e a duplicação do DNA nuclear, quando cada cromossomo será composto por duas cromátides. O G2 é o intervalo entre o final da síntese e o início da mitose. Neste ponto a célula verifica a existência de erros no DNA, preparando para a fase seguinte. A fase M, que compreende a divisão do núcleo seguida da citocinese, é o processo pelo qual a célula divide o seu citoplasma gerando duas células filhas independentes, com o mesmo número de cromossomos da célula que lhes deu origem (BONELLI et al., 2014).

A cadeia de eventos que leva à divisão celular é em geral dependente da ligação de fatores de crescimento e receptores celulares, seguida da ativação de mecanismos de transdução de sinais envolvendo proteínas sinalizadoras (FERRAZ et al., 2012). A progressão do ciclo celular é regulada por proteínas, chamadas ciclinas que formam um complexo com proteínas chamadas quinases dependentes de ciclinas (CDK), que regulam a fosforilação das proteínas envolvidas na progressão do ciclo (Figura 7) (REED, 2001). As CDKs são expressas ao longo do ciclo celular, enquanto que os níveis de ciclinas são limitados por regulação da transcrição de genes que codificam ciclinas e a degradação dessas proteínas mediada por ubiquitina (STEWART; WESTFALL; PIETENPOL, 2003).

A ubiquitina é um polipeptídeo que pode ser ligado covalentemente à lisinas em diversas proteínas, via formação de um isopeptídeo ligado com o seu terminal-C carboxílico. As enzimas que transferem ubiquitina para proteínas marcadas são conhecidas como ubiquitina-proteína ligases. Na fase G1 do ciclo celular, atua a APC^{CDH1}, que é regulada negativamente pela fosforilação mediada por CDK. A APC^{CDH1} é ativada na saída da mitose, é responsável pela degradação da ciclina A, ciclina B e securina, e previne o reacúmulo na fase G1 (REED, 2001).

O gene Rb tem como produto a proteína Rb (pRb), que atua no controle da proliferação celular, especificamente na transição da fase G1 para a S. A pRb na forma ativa se encontra ligada ao fator de transcrição E2F, que estimula a transcrição de vários genes envolvidos na fase S. A ação de E2F permanece bloqueada enquanto estiver ligada a pRb, representando assim um ponto de checagem da fase G1. Os complexos ciclina-CDK causam a fosforilação da pRb, que por sua vez se torna inativa e se desliga do fator E2F, dando continuidade ao ciclo celular (HENLEY; DICK, 2012).

Existem também, proteínas que exercem controle negativo sobre o ciclo celular, chamadas de inibidores de CDK (CKIs), que interagem com as CDKs, bloqueando a sua atividade, atuando como inibidor da proliferação celular (figura 7) (OBEXER et al., 2011).

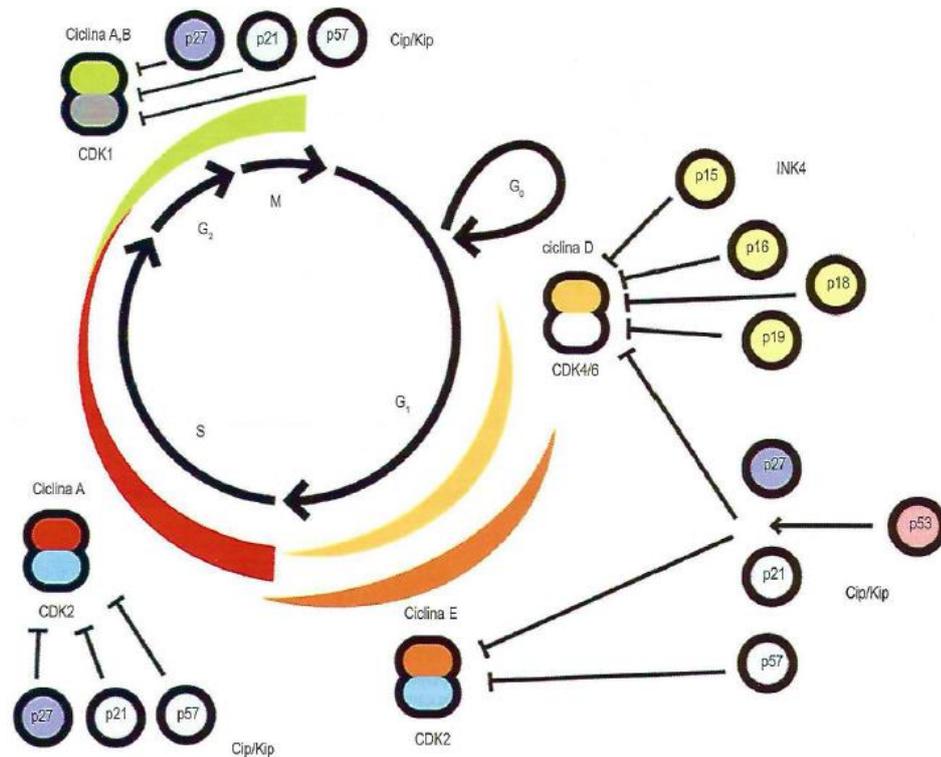


Figura 7. Proteínas CDKIs (inibidores que controlam a atividade de complexos CDK-ciclina). A família INK4 (p15, p16, p18 e p19) inibe a CDK4/6-ciclina e a família CIP/KIP (p21, p27, p57) inibe vários complexos de CDKs-ciclinas (Adaptado de TAJARA, 2010).

Outro gene que atua no controle do ciclo celular é o gene supressor de tumor p53. Atua em uma das principais vias de controle, no reparo do DNA e na indução da morte celular programada, a apoptose (VERMEULEN; VAN BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003). A p53 impede que células com anormalidades no DNA completem o ciclo celular, ao ativar a transcrição dos genes p16, GADD45 e BAX. Pela ação da CDKI p16INK4a, o ciclo é interrompido, dando a oportunidade de reparo aos danos causados no DNA, por meio do produto do gene GADD45. Se o reparo não for suficiente, o gene BAX induz apoptose (FERRAZ et al., 2012). Em resposta ao stress, as células desenvolveram um mecanismo de controle, denominado ponto de checagem, que regula a progressão do ciclo celular (STEWART; WESTFALL; PIETENPOL, 2003).

Na célula neoplásica, as alterações em genes que atuam nos pontos de checagem tornam autônoma a transição de uma fase para a seguinte, menos dependente de sinais externos e insensível a controles internos (Figura 8). Em virtude das inúmeras interações entre sinais da maquinaria do ciclo celular, uma única mutação pode afetar diferentes padrões, tais como adesão, resposta a drogas genotóxicas, diferenciação e morte celular (TAJARA, 2010).

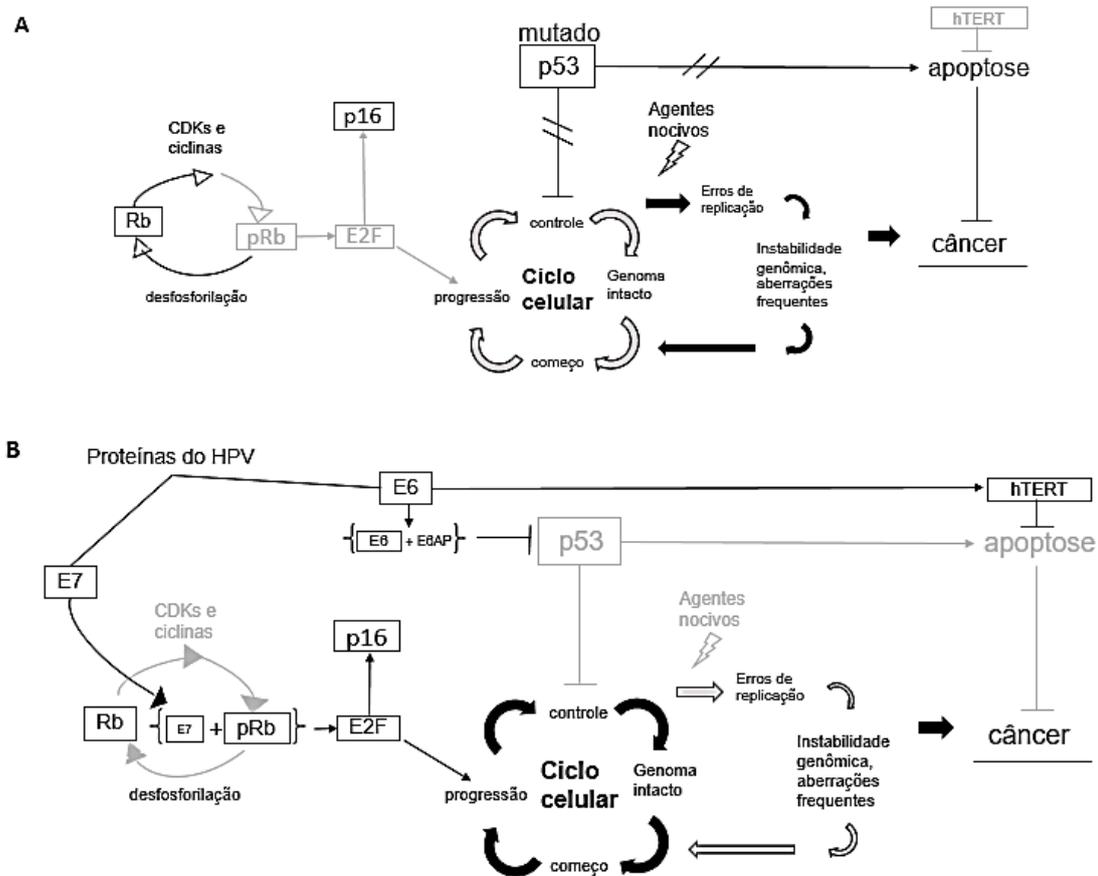


Figura 8. Carcinogênese não relacionada ao HPV. A: p16INK4a não é ativado e a fosforilação de Rb é desbloqueada. A progressão do ciclo celular não é inibida pela p53 mutada e o mecanismo de apoptose não pode ser iniciado. Carcinogênese relacionada ao HPV. B: A ligação de E7 para pRb leva à ativação de E2F o que induz a expressão de p16INK4a. A proteína E6 é responsável pela degradação de p53. A presença de agentes nocivos para carcinogênese relacionada ao HPV não é imprescindível, mas pode ocorrer em adição (Adaptado de WITTEKINDT et al., 2012).

No câncer, ocorrem alterações importantes no controle da divisão celular, causando uma proliferação celular descontrolada. Dessa forma, duas classes de genes, proto-oncogenes e genes supressores de tumor estão mais sujeitas às mutações. Estes genes atuam em diferentes níveis ao longo das vias que estimulam a proliferação celular e a inibição da progressão do ciclo celular (VERMEULEN; VAN BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003).

Segundo Hanahan e Weinberg (2000), para que ocorra o desenvolvimento do câncer são adquiridas seis capacidades biológicas durante as fases de tumorigênese. São elas: a capacidade de evadir à apoptose, a auto-suficiência de sinais de crescimento, a insensibilidade aos fatores anti-crescimento, a capacidade de invasão de tecido adjacente e metástase, o potencial replicativo ilimitado e a indução de angiogênese (Figura 9) (HANAHAAN; WEINBERG, 2000). Em conjunto, essas características causam a instabilidade

do genoma, levando a mutações de genes que controlam o ciclo celular e consequentes alterações nas funções das proteínas codificadas por eles (HANAHAN; WEINBERG, 2011). As proteínas p16INK4a, p53 e Rb são exemplos bem conhecidos e importantes, pois a modificação da atividade desses membros da maquinaria do ciclo celular leva ao aumento da proliferação celular de maneira descontrolada, caracterizando o processo de carcinogênese (TAJARA, 2010).

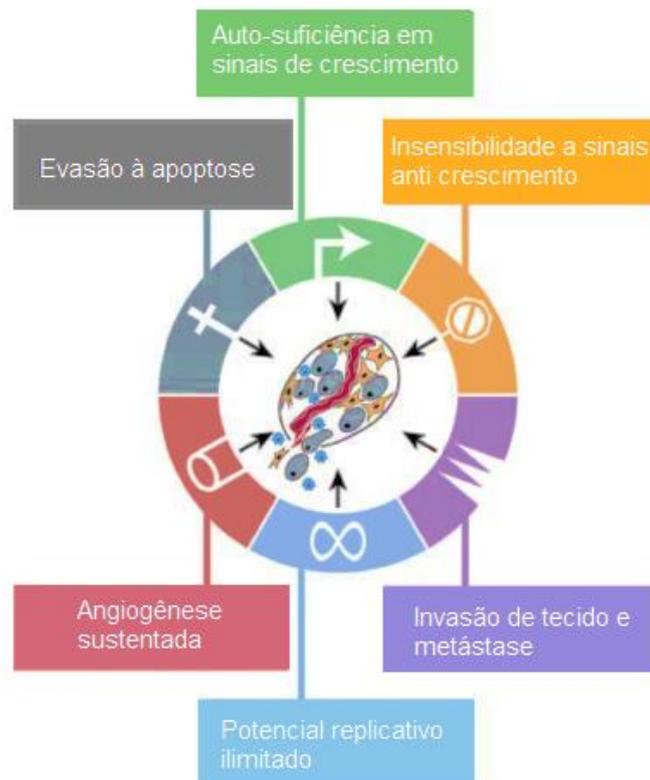


Figura 9. Capacidades adquiridas das células tumorais. Conjunto de capacidades funcionais adquiridas durante o desenvolvimento de um câncer (Adaptado de HANAHAN; WEINBERG, 2000).

Alterações das CDKIs são bem conhecidas em câncer. O gene *CDKN2A*, que codifica a proteína p16INK4a é silenciado em vários tipos de tumor por deleção homozigota, metilação de seu promotor e mutações de ponto (REED, 2001).

De maneira adjacente, agentes externos podem causar infecções que levam à carcinogênese. Os HPVs exploram a maquinaria celular da célula hospedeira para seu próprio benefício. São completamente adaptados aos tecidos naturais dos seus hospedeiros e à diferenciação das células epiteliais ou mucosas que infectam (CID ARREGUI et al., 2012). Quando partículas infecciosas entram em contato com o tecido do indivíduo e o infectam por

meio de pequenas fissuras comuns ao epitélio, um novo ciclo de replicação viral é iniciado(MUÑOZ et al., 2006).

O ciclo de replicação viral dentro do epitélio começa com a replicação do genoma do vírus a um número elevado de cópias e mantém por um período essa persistência viral, considerada pelo sistema imunológico como uma infecção (CID ARREGUI et al., 2012). As proteínas virais E1 e E2 são essenciais para a replicação do DNA viral. Uma vez que as células basais são empurradas para o compartimento suprabasal, elas perdem a capacidade de se dividir, iniciam o programa de diferenciação e se tornam mais superficiais(BOSCH; SANJOSÉ, 2007; GENOVÉS et al., 2014). Os HPVs replicados aproveitam a descamação das células epiteliais, que ocorre naturalmente em consequência da migração às camadas superficiais, e são liberados no ambiente adjacente como novas partículas virais (CACCIÒ, 2005).

As proteínas E6 e E7, que influenciam no processo de replicação do vírus, interagem com um número variado de proteínas celulares, induzindo a proliferação e posteriormente a imortalização das células no processo de carcinogênese (BODILY; LAIMINS, 2011). A proteína E6 interage com a molécula p53, a chave de controle do ciclo celular. A proteína E7 interage com a proteína pRb, uma molécula atuante do controle do ciclo celular, liberando o fator de transcrição E2F, que desencadeia a expressão de proteínas responsáveis pela replicação do DNA, evitando a parada nos pontos de checagem e a regulação do ciclo celular (Figura 10) (CHOW; BROKER; STEINBERG, 2010). Essa atividade constante das proteínas E6 e E7 leva ao aumento da instabilidade genômica, ao aumento de mutações em oncogenes, à perda do controle de crescimento celular e finalmente ao desenvolvimento de um tumor (WHITE et al., 2012; CHEN et al., 2014).

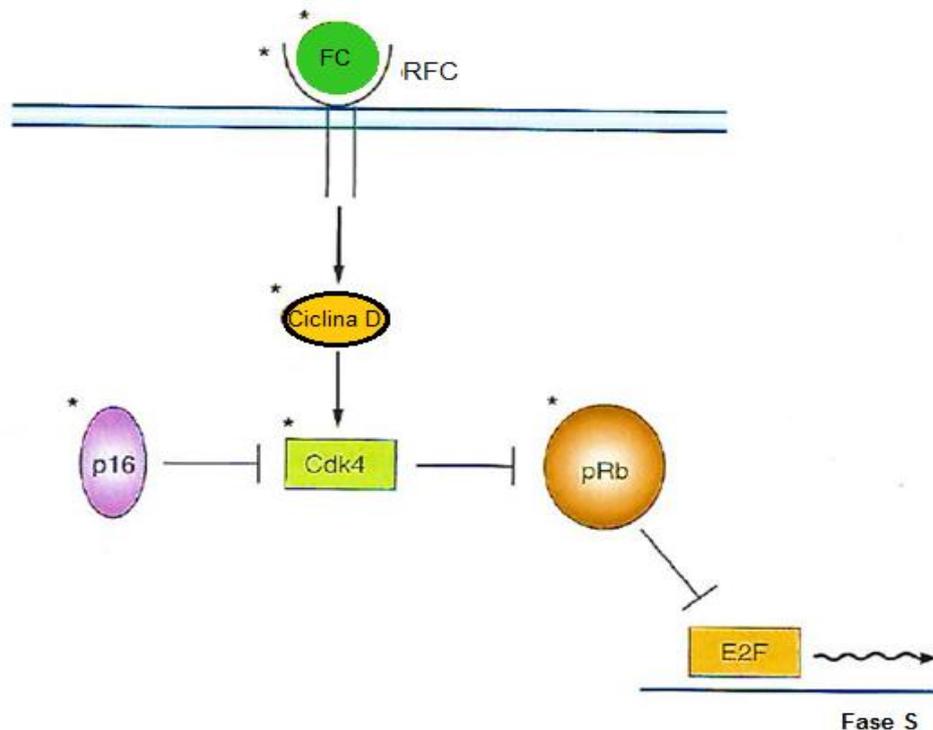


Figura 10. Via da proteína Retinoblastoma. pRb é um regulador negativo crítico do ciclo celular controlado por fatores de crescimento (FC), sinalizando as vias da progressão celular. Uma das principais funções de pRb é interagir com a família dos fatores de transcrição E2F e por recrutamento deco-repressores, mantém muitos genes que codificam proteínas que são importantes para a progressão do ciclo celular em estado hermeticamente reprimido. Fatores de crescimento e mitógenos sinalizam as vias livres dessa expressão por simular o acúmulo de ciclinas do tipo D no receptor de ocupação. Os resultados da ativação das CDK 4 e CDK6 levam à fosforilação de pRb e concomitante inativação das suas funções repressivas. P16 é um inibidor de CDK da família INK4 que regula negativamente esta via, inibindo a CDK 4. Deve ser notado que todos os elementos marcados por asterisco foram encontrados mutados ou desregulados, ou os dois, em cânceres humanos. FC, receptores de FC (RFCs) e ciclinas do tipo D são frequentemente hiperexpressos ou desregulados. P16/INK4a é frequentemente não expresso ou hipoexpresso. Versões mutantes de CDK4 que não podem se ligar ao p16/INK4a tem sido identificadas em cânceres humanos. O gene que codifica pRb é frequentemente mutado em câncer (Adaptado de REED, 2001).

2.8 P16INK4a e lesões associadas ao HPV

Biomarcadores podem aumentar a acurácia e a efetividade de programas de rastreamento, diagnóstico e tratamento das lesões precursoras do câncer de colo uterino. Dentre os marcadores relacionados às alterações da proliferação celular, destaca-se p16INK4a (FERRAZ et al., 2012). O locus INK4b-ARF-INK4a no cromossoma 9p21 contém o gene INK4a que codifica a proteína p16, com um peso molecular de 16kDa (OBEXER et al., 2011). P16INK4a é um gene supressor de tumor, cuja proteína inibe o complexo CDK4-ciclina D. P16INK4a representa a principal barreira para o aumento da proliferação celular, quando ocorrem alterações na sinalização de controle do ciclo celular (SCHAFER, 1998).

O gene p16 está alterado em uma grande porcentagem de tumores humanos (VERMEULEN; VAN BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003). A proteína p16INK4a é um inibidor específico de CDK4-ciclina D, que impede a fosforilação da proteína pRb e mantém as células em G1. As células tumorais, que apresentam p16INK4a mutado, deletado ou metilado, escapam o ponto de checagem que precede a síntese do DNA (fase S) e aumentam a proliferação celular (VERMEULEN; VAN BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003).

As alterações frequentes no locus INK4b-ARF-INK4a em tumores podem ser ativadas em resposta à sinalização oncogênica aberrante. Nas lesões precursoras do câncer de colo uterino, associadas à infecção transcricionalmente ativa do HPV, a proteína p16INK4a é induzida, na tentativa de limitar a progressão para o câncer (POPOV; GIL, 2010).

A infecção transcricionalmente ativa pelo HPV resulta em um aumento da expressão de p16INK4a. Por meio da ligação da proteína E7 com pRb, o fator de transcrição E2F é liberado e parece induzir a transcrição de p16INK4a. Essa hiperexpressão pode ser resultante de uma tentativa improdutiva de bloquear o ciclo celular, frente à degradação de pRb (Figura 11) (CONESA-ZAMORA et al., 2013). Assim, esta hiperexpressão de p16INK4a está relacionada à infecção pelo HPV de alto risco e pode ser utilizada como marcador da infecção transcricionalmente ativa pelo HPV com expressão aumentada de oncogenes virais que induzem a desregulação do ciclo celular (KIM; ZHAO, 2005; TORNESELLO et al., 2013).

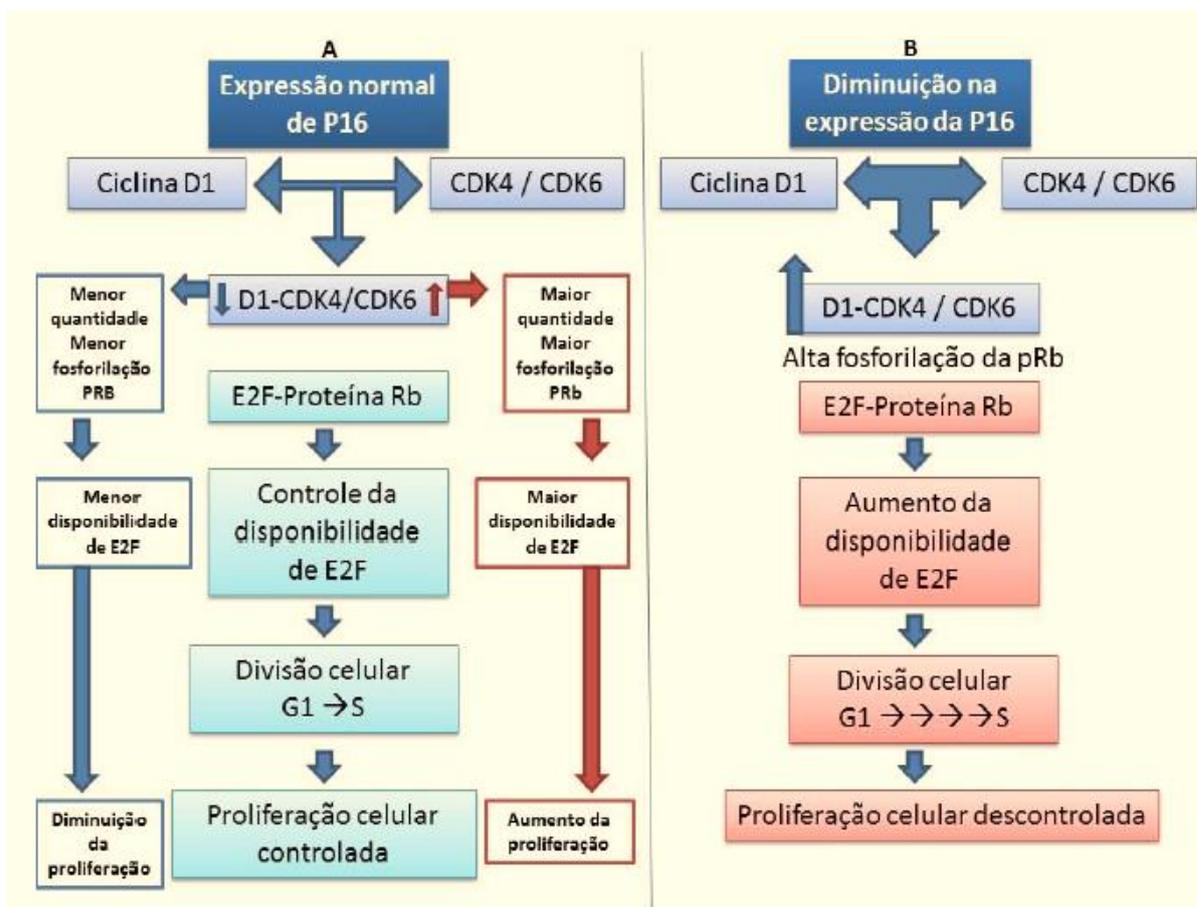


Figura 11. Esquema representativo da ação da p16 sobre a proliferação celular em circunstâncias normais (A) e quando há alteração na expressão desta proteína (B). Fonte: PETITO, 2014.

O câncer de colo uterino é o melhor exemplo do entendimento de como uma infecção viral pode levar à malignidade (SANJOSE et al., 2013). A infecção pelo HPV de alto risco interfere no funcionamento de proteínas celulares e também na expressão celular de produtos de vários genes (MCGRAW, 2014). A desregulação do ciclo celular é um passo necessário para o processo de carcinogênese e a expressão aumentada de proteínas reguladoras do ciclo revelam potenciais marcadores moleculares tumorais (ALFSEN et al., 2003).

Ensaio imunohistoquímico demonstraram que a proteína p16INK4a é altamente expressa em células displásicas do colo do útero (HUANG et al., 2014). P16INK4a não é expresso no epitélio normal e em tumores não associados ao HPV, é comumente inativado, por deleção, mutação ou metilação, agindo como um inibidor da proliferação celular (BODNER et al., 2011; WENG et al., 2012). Este biomarcador parece ser eficaz em demarcar distintamente as lesões da mucosa normal e anormal associadas à infecção pelo HPV transcricionalmente ativa (KEATING et al., 2001). A coloração predominante de p16INK4a em lesões e carcinomas cervicais está intimamente correlacionada com a infecção pelo HPV (MILDE-LANGOSCH et al., 2001). Vários tipos de HPV de alto risco podem agir alterando o

complexo pRb-E2F, ligando e inativando pRb e liberando o fator de transcrição E2F. Consequentemente, afetando a via Rb-p16INK4a, levando a uma hiperexpressão de p16INK4a (BENEVOLO et al., 2006; KURSHUMLIU et al., 2009).

Imunoensaios com p16INK4a permitem a identificação precisa de pequenas lesões de câncer de colo uterino e NICs em secções de biópsia (BODNER et al., 2011). A expressão de p16INK4a pode ser um preditor de progressão rápida e pode sugerir a presença de células transformadas, ainda que as lesões apresentem morfologia aparentemente normal (MULLER et al., 2008). O teste de detecção de p16INK4a ajuda a identificar e definir o diagnóstico de lesões em casos nos quais a histopatologia não está clara (ELEUTÉRIO-JUNIOR et al., 2007).

O papel prognóstico de p16INK4a no câncer de colo uterino ainda não é claro. Alguns estudos descreveram uma associação entre a hiperexpressão de p16INK4a e os aspectos de melhor prognóstico (Tabela 2), como estadio clínico mais precoce (MASOUDI et al., 2006; MULLER et al., 2008), tamanho ou profundidade da lesão (ALFSEN et al., 2003; VAN DE PUTTE et al., 2003), idade ao diagnóstico (ALFSEN et al., 2003; SCHWARZ et al., 2011) e presença de metástases linfonodais (MASOUDI et al., 2006; SON et al., 2012). Entretanto, nenhum estudo conseguiu demonstrar associação com a presença de metástase à distância. Além disso, outros estudos avaliaram a expressão de p16INK4a em diferentes tipos histológicos de cânceres cervicais, tecido normal e lesões préneoplásicas (FENG et al., 2007; CHEAH et al., 2012; WENG et al., 2012) e não demonstraram associações significativas com fatores prognósticos (Tabela 2).

O efeito da hiperexpressão de p16INK4a na sobrevida de pacientes com câncer de colo uterino também tem sido investigado e os resultados são conflitantes (ALFSEN et al., 2003; VAN DE PUTTE et al., 2003; MASOUDI et al., 2006; BODNER et al., 2011; SCHWARZ et al., 2011). Schwarz e colaboradores (2011) avaliaram a sobrevida de pacientes com carcinoma de colo uterino em estágio avançado tratadas com radioterapia, em relação à expressão de p16INK4a. Os resultados sugerem que pacientes com carcinoma de colo uterino com tumores p16INK4a-positivos apresentam uma melhor resposta à radioterapia do que aquelas com tumores p16INK4a-negativos (SCHWARZ et al., 2011).

Os resultados apresentados por Masoudi e colaboradores (2006) sugerem que a perda da expressão de p16INK4a, durante a progressão tumoral, conduz a um comportamento mais agressivo, demonstrando também ser um indicador prognóstico em pacientes linfonodo-

negativos (MASOUDI et al., 2006). Um estudo que investigou exclusivamente adenocarcinomas (BODNER et al., 2011) demonstrou que a expressão de p16INK4a não influenciou na sobrevida global, nem na sobrevida livre de doença das pacientes. Contudo, outro estudo demonstrou que a hiperexpressão de p16INK4a estava associada fortemente com uma menor sobrevida geral ($p < 0.001$) em adição à invasão vascular, infiltração do corpo do útero, idade ao diagnóstico e o modo de tratamento (ALFSEN et al., 2003).

Os principais estudos que empregaram metodologia de imuno-histoquímica para avaliar a expressão de p16INK4a e sua relação com o câncer de colo uterino estão sumarizados na Tabela 2.

Tabela 2. Estudos que avaliaram a expressão de p16INK4a em carcinomas cervicais

Referência/ País de origem	Tipo de estudo	Nº de casos e tipo histológico do câncer	Localização Subcelular de p16INK4a	Cut-off	Metodologia utilizada (anticorpo)	Resultados
ALFSEN et al., 2003/ Noruega	Retrospectivo (1976-1980 e 1986-1990)	224 ADC	Núcleo	>50%	Imuno-histoquímica – anticorpo p16 ^{INK4a/ MTS1} da Neomarkers (diluição 1:50)	A baixa expressão de p16INK4a foi associada com maior estágio FIGO ($p=0,01$), pacientes mais velhas do que 55 anos ($p=0,01$) e profundidade de invasão ($p=0,003$). Em análise multivariada, alta expressão de p16INK4a, foi um forte preditor de pobre prognóstico ($p<0,001$).
VAN DE PUTTE et al., 2003/ Noruega	Retrospectivo (1987-1993)	221 CEC	Núcleo	<50%	Imuno-histoquímica – p16 (1:100, 0,2µg IgG ₁ /ml, Neomarkers, CA, USA)	A hipoexpressão de p16INK4a foi associada com tumores maiores, com profundidade da invasão estromal, metástase linfonodal e invasão parametrial; profundidade da invasão, metástase linfonodal, extensão e invasão vascular foram associadas significativamente com sobrevida ($p<0,1$).
MASOUDI et al., 2006/ Alemanha	Retrospectivo (1992-1996)	130 CEC	Não detectado	Não detectado	TMA/ imuno- histoquímica. p16 (clone 16PO4) Neomarkers Laboratories, Fremont, CA, USA: 1:1000 diluição)	Status de linfonodos ($p<0,0001$), estágio do tumor ($p=0,0355$) e invasão estromal ($p=0,0354$) foram significativamente associados como preditores da sobrevida livre de recidiva; Em análise multivariada, a perda da expressão de p16INK4a foi considerada estatisticamente significativa como preditor na diminuição da sobrevida livre de doença ($p=0,0198$); em análise multivariada, p16INK4a ($p=0,060$) representou indicador prognóstico, independente de status linfonodal e de profundidade de invasão e estágio do tumor.
FENG et al., 2007/ USA	Retrospectivo (não informado)	20epitélionormal, 20 NIC e 20 CEC	Predominante no núcleo	0-100%	TMA / Imuno- histoquímica - Anticorpo p16 (Biocare Médico; 1: 100)	Não avaliaram a relação com HPV e com prognóstico (TNM, sobrevida).

MULLER et al., 2008/ Suíça	Retrospectivo (1992-2000)	101 ADC	Núcleo e citoplasma	<50%	Imuno-histoquímica - Kit CINtec® Histologia (Código No. K5336, Dako Cytomation, Glostrup, Dinamarca) clone E6H4	Uma correlação negativa significativa entre os níveis de expressão p16INK4a ($p=0,001$) e grau histológico; Correlação altamente significativa entre a infecção pelo HPV e níveis mais elevados de coloração p16INK4a ($p=0,001$), similar para os diferentes tipos de HPV. Não avaliou prognóstico.
BODNER et al., 2011/ Áustria	Retrospectivo (1994-2006)	39 ADC	Núcleo e citoplasma	>50%	Imuno-histoquímica - Anticorpo monoclonal de rato contra a p16 ativada (diluição 1:100; 0,2 lg de IgG1 / ml Neomarkers, CA, EUA.)	A expressão de p16INK4a, não influenciou na sobrevida livre de doença dos pacientes ($p=0,62$) nem na sobrevida global dos pacientes ($p=0,46$); Não encontrou nenhuma relação estatisticamente significativa entre o prognóstico e a expressão de p16INK4a nem quanto a idade, histologia, grau tumoral, linfonodos, estágio clínico e recidivas.
SCHWARZ et al., 2011/ USA	Retrospectivo (1998-2007)	126 CEC	Núcleo e citoplasma	>1%	TMA IHQ: p16 (MTM Laboratories [Westborough, MA]; monoclonal 1:1 diluição)	Encontraram associação estatisticamente significante entre status de p16INK4a e a idade da paciente ao diagnóstico ($p=0,01$).
CHEAH et al., 2012/ Malásia	Retrospectivo (2006-2008)	29 NIC I, 27 NIC II e NIC III e 53 CEC	Núcleo e citoplasma	>75%	Imuno-histoquímica - Anticorpo (clone E6H4) fornecido no kit CINTEC Histologia (REF 9511, mtm laboratories AG, Heidelberg, Germany)	Expressão de p16INK4a significativamente baixa ($p<0,05$) em NIC I comparada com NIC II, NIC III e CEC, enquanto não houve diferença entre NIC III e CEC.
SON et al., 2012/ Korea	Retrospectivo (não informado)	35 CEC, 26 NIC II/III, 10 NIC I, 15 metaplasia escamosa e 20 epitélio normal	Núcleo e citoplasma	<5%	Imuno-histoquímica - anticorpo p16 (clone: E6H4) DaKo, Germany; diluição 1:30.	A expressão de p16INK4a foi alta nas pacientes mais velhas (>55 anos) do que nas mais jovens, mas não houve diferença na expressão de p16INK4a de acordo com metástase linfonodal e o estágio do carcinoma.
WENG et al., 2012/ China	Retrospectivo (2003-2007)	30 neoplasia cervical e 20 mucosa cervical normal	Núcleo e citoplasma	>10%	Imuno-histoquímica - mouse anti-human p16 MCAB (1:50 diluição; Shangai Long Islind Biotech Co., Ltda.)	A expressão de p16INK4a foi mais alta em CEC do que em neoplasia cervical e mucosa cervical normal ($p=<0,01$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre neoplasia cervical e mucosa cervical normal ($p=>0,05$)

ADC: adenocarcinoma; CEC: carcinoma escamoso; TNM: estadiamento clínico; HPV: papilomavírus humano; NIC: neoplasia intraepitelial cervical; IHQ: Imunohistoquímica

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar o potencial papel prognóstico de p16INK4a em carcinomas de colo uterino.

3.2 Objetivos Específicos

Avaliar, por meio de imuno-histoquímica, a expressão de p16INK4a nos casos selecionados de carcinomas de colo uterino.

Investigar as possíveis associações entre a expressão de p16INK4a e os aspectos clínicos e histopatológicos dos carcinomas de colo uterino.

Estimar a sobrevida em cinco anos das pacientes com tumores do colo uterino.

Avaliar a expressão de p16INK4a na sobrevida das pacientes com carcinomas do colo de uterino.

4 METODOLOGIA

4.1 Aspectos éticos

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa da Associação ao Câncer em Goiás – CEP/ACCG, com parecer número CAAE 13580613.5.0000.0031 (ANEXO A).

4.2 Tipo de estudo e casuística

Estudo epidemiológico, retrospectivo e analítico, que utilizou dados clinicopatológicos, sociodemográficos e detecção imuno-histoquímica de p16INK4a em carcinomas de colo uterino. Blocos de parafina contendo espécimes tumorais foram obtidos de 161 pacientes diagnosticadas no Hospital Araújo Jorge (HAJ), em Goiânia, no ano de 2006.

O Hospital Araújo Jorge (HAJ), a primeira e a maior unidade operacional da Associação de Combate ao Câncer em Goiás (ACCG), é uma unidade de saúde privada e filantrópica, atendendo em média 80% dos pacientes pelo Sistema Único de Saúde (SUS). O HAJ está no grupo dos maiores e melhores hospitais brasileiros especializados em cancerologia. Atendendo pacientes de todas as idades, oferecendo tratamento para todos os tipos de câncer com os mais modernos recursos da atualidade, sendo considerado uma referência no tratamento do câncer no Centro-Oeste, que também atende pacientes de outras regiões brasileiras.

4.3 Seleção da amostra

O tamanho amostral foi calculado de acordo com a equação $(n = \frac{n_0 \times N}{n_0 + N})$ onde n é o tamanho amostral, n_0 é um sobre erro, que será de 5%, e N é o tamanho populacional que será o número de casos de câncer de colo uterino previstos para o período apurado, em Goiás. Uma lista de todos os casos de carcinomas de colo uterino com diagnóstico histopatológico no ano de 2006, no Setor de Anatomia Patológica (SAP) do HAJ, foi inicialmente levantada. Uma pré-seleção de 241 prontuários foi realizada e a partir dos critérios de inclusão, revisados por meio de uma ficha de coleta de dados (APÊNDICE A), foram selecionados 193 casos. A partir do levantamento dos blocos de parafina dos espécimes tumorais, foram selecionados

161 casos (Figura 14) para a realização de análises imuno-histoquímicas (IHQ) de p16INK4a. Para estudos de sobrevida foram selecionadas pacientes com seguimento de até 60 meses, com óbito registrado, independente da causa.

Os critérios de inclusão foram: paciente com diagnóstico histopatológico de carcinoma de colo uterino concluído, dados sóciodemográficos e clinicopatológicos disponíveis nos prontuários, blocos de parafina contendo tumor disponíveis e suficientes para análise, blocos disponíveis anteriores à radioterapia e pacientes com seguimento mínimo de 60 meses.

Lâminas preparadas a partir de cada bloco foram coradas com hematoxilina-eosina também usadas para imuno-histoquímica com o anticorpo anti-p16INK4a. Todos os casos foram avaliados por uma patologista do Setor de Anatomia Patológica do Hospital Araújo Jorge a fim de definir a classificação histológica precisa dos tumores. Os tumores foram classificados de acordo com critérios da Organização Mundial de Saúde para carcinomas de colo uterino. Os dados epidemiológicos, clínicos e patológicos coletados dos respectivos prontuários e dos laudos histopatológicos incluíram idade, estadiamento clínico, tamanho da lesão, comprometimento de linfonodos regionais, metástases à distância, subtipo histológico, localização e seguimento da paciente. O grupo foi investigado para a expressão de p16INK4a, aspectos clínicos e histopatológicos, bem como para a sobrevida das pacientes.

4.4 Avaliação da expressão de p16INK4a

Para a análise imuno-histoquímica de p16INK4a usou anticorpo monoclonal (CINtec® p16 Histology; diluição 1:1) e o método de imunoperoxidase associada a polímeros (Kit comercial Novolink-Novocastra Max Polymer Detection System – Leica). Foi utilizado o protocolo do laboratório de Imunohistoquímica do Setor de Anatomia Patológica do Hospital Araújo Jorge (APÊNDICE B). A análise imuno-histoquímica para p16INK4a foi realizada para 161 amostras. Os cortes de tumores de colo uterino, montados em lâminas silanizadas, foram desparafinizados em xilol, em temperatura controlada e depois reidratados numa série de lavagens em álcool (100%, 80% e 50%, respectivamente). Em seguida, submetidos à recuperação antigênica pelo calor úmido, em panela de pressão elétrica (Britânia/ panela de pressão elétrica 5l), durante 7 minutos, utilizando o citrato 10mM/pH6,0. Após a recuperação antigênica, as lâminas foram mantidas à temperatura ambiente para resfriamento por cerca de 20 minutos e lavadas em água corrente. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito em peróxido de hidrogênio 10V a 3% durante 10 minutos, e em seguida, as lâminas foram lavadas com água corrente e enxaguadas com tampão fosfato (PBS). Após o bloqueio, as

lâminas foram incubadas a 4°C, durante a noite, com o anticorpo primário. Após a incubação com o anticorpo primário, as lâminas foram lavadas em água corrente e PBS e incubadas durante 30 minutos com o anticorpo secundário, novamente lavado em água corrente e PBS e incubadas por 30 minutos com o polímero contendo cerne de dextran. Depois de uma nova lavagem com água corrente e PBS, a reação foi revelada com tetra-hidroclorato de 3-3'diaminobenzidina, por 5 minutos, e as lâminas levemente contracoradas com hematoxilina de Harris. Em seguida, as lâminas foram desidratadas em álcool e xilol e montadas com lamínula usando Entellan Novo (Merk). Um controle positivo foi incluído em cada reação realizada, um caso de carcinoma escamoso invasor provado previamente ser positivo para p16INK4a. Todas as reações foram processadas nas mesmas condições ambientais.

4.5 Avaliação Imuno-histoquímica

A avaliação foi realizada por uma patologista do Setor de Anatomia Patológica do Hospital Araújo Jorge, utilizando uma ficha de avaliação para cada amostra (APÊNDICE C). A análise da expressão de p16INK4a foi feita utilizando o índice de marcação da respectiva proteína nas células tumorais. Ocorreu em duas etapas, primeiro, o número de células positivas foi estabelecido semi-quantitativamente em todas as lâminas. A lâmina inteira foi rastreada para áreas positivas e foi estimada a proporção de células positivas para a área total do tumor (ALFSEN et al., 2003). Quando havia dúvida sobre o índice de marcação, $\leq 50\%$ de células ou $> 50\%$, o número de núcleos corados foi contado para esclarecer a questão. Os números de campos foram estimados dependendo do tamanho da seção e das áreas coradas (BODNER et al., 2011). A intensidade da coloração nuclear e o número de núcleos corados foram registrados separadamente. A intensidade de coloração foi registrada como 1 (negativo), 2 (fraco), 3 (moderado) e 4 (forte) (MULLER et al., 2008; WENG et al., 2012). Quando presentes, os padrões de coloração focal e citoplasmática também foram registrados (Figura 12).

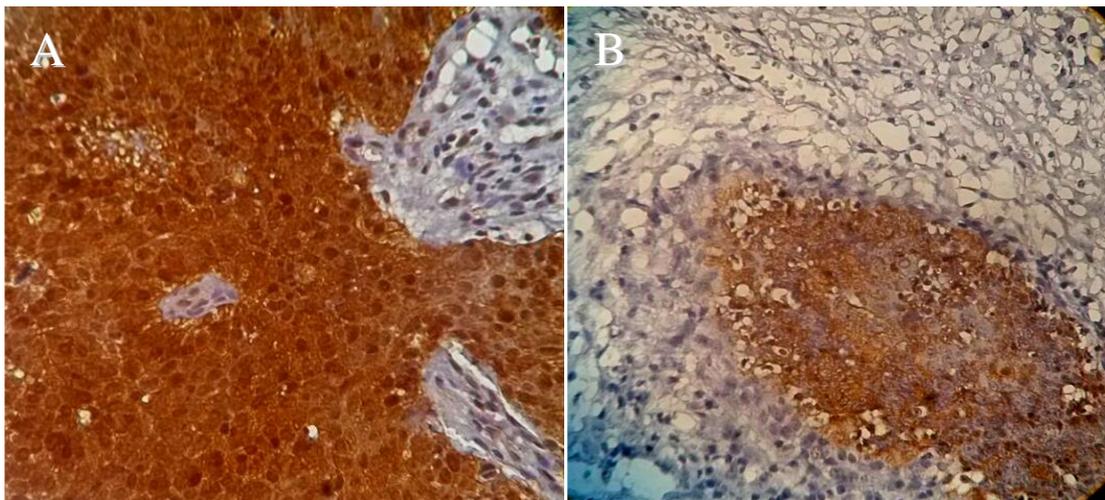


Figura 12. Padrão de p16INK4a em lâminas com corte histológico de carcinoma de colo uterino. A. Expressão >50%. B. Expressão ≤50%.

Os níveis de expressão da proteína foram definidos como hiperexpressão e hipoexpressão, com um ponto de corte de 50% de núcleos corados para p16INK4a (VAN DE PUTE et al., 2003; SON et al., 2012). A contagem de núcleos foi obrigatória e os resultados foram classificados como – (0%, negativo), + (coloração positiva em 10-40% das células tumorais), ++ (coloração positiva em 41-50% das células tumorais) e +++ (coloração positiva em >50% das células tumorais) (SCHWARZ et al., 2012). A marcação de p16INK4a foi considerada positiva, se tanto a expressão nuclear quanto citoplasmática estava presente (MASOUDI et al., 2006; VOSMIK et al., 2014).

4.6 Análises estatísticas

Análise das possíveis associações entre a expressão de p16INK4a e os aspectos clínicos e epidemiológicos dos tumores: dados demográficos, clínicos e patológicos foi realizada para o grupo com câncer de colo uterino. As possíveis associações entre a expressão dos marcadores, a sobrevida e o prognóstico e tais fatores foram investigadas, utilizando análise univariada.

Foi empregada análise de sobrevida univariada usando testes de log-rank e foram ilustrados com gráficos de Kaplan-Meier. A Figura 13 apresenta o desenho do estudo.

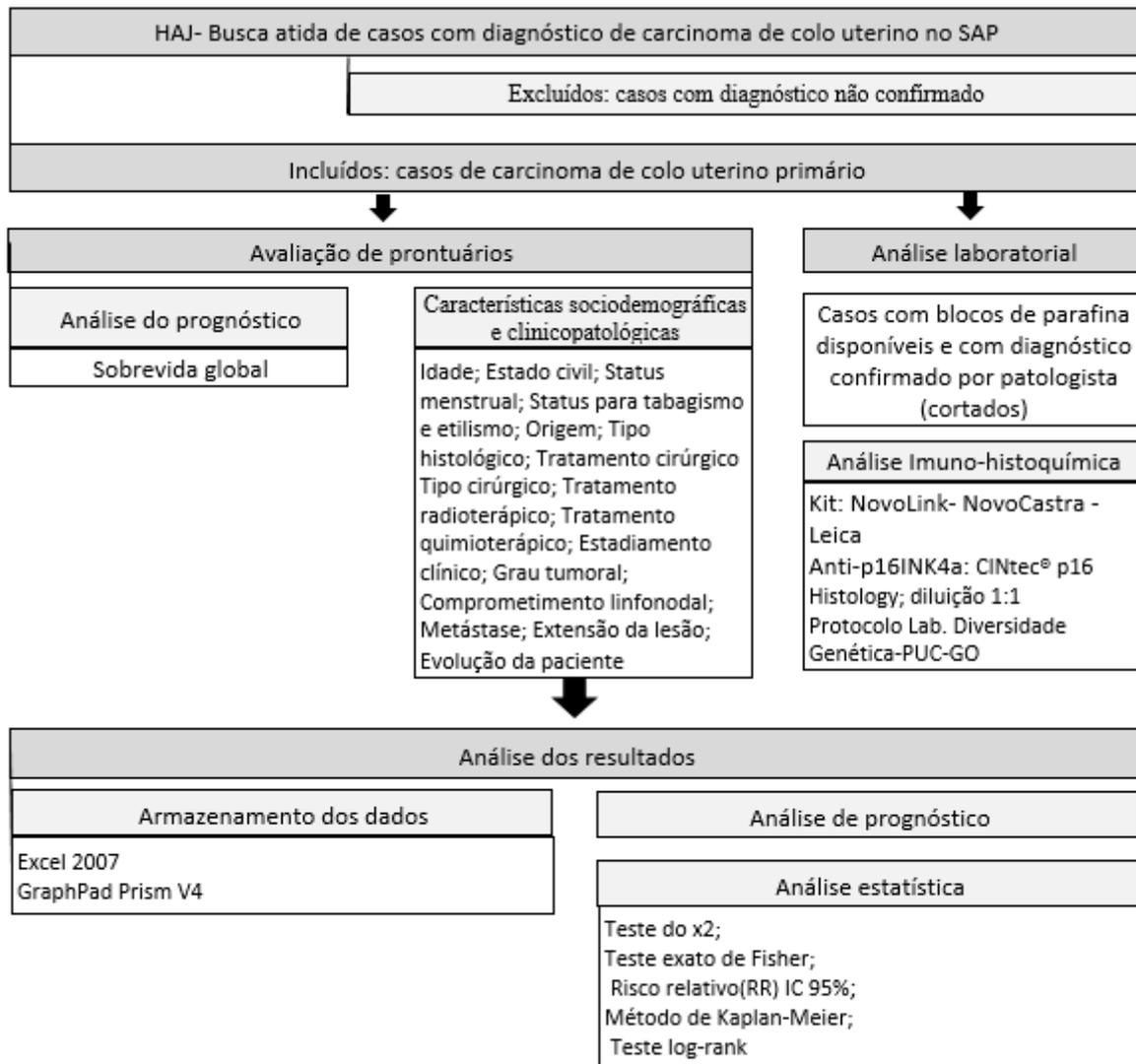


Figura 13. Fluxograma com o resumo do processo metodológico da pesquisa (delineamento experimental).

5 RESULTADOS

5.1 Característica da amostra

A amostra foi selecionada a partir de 241 casos de carcinomas de colo uterino, diagnosticados em 2006, no Setor de Anatomia Patológica em uma unidade de referência em câncer de Goiânia-GO, conforme descrito na Figura 14. Foram incluídos 161 casos de carcinomas de colo uterino com material biológico suficiente para análise de p16INK4 por meio de imuno-histoquímica.

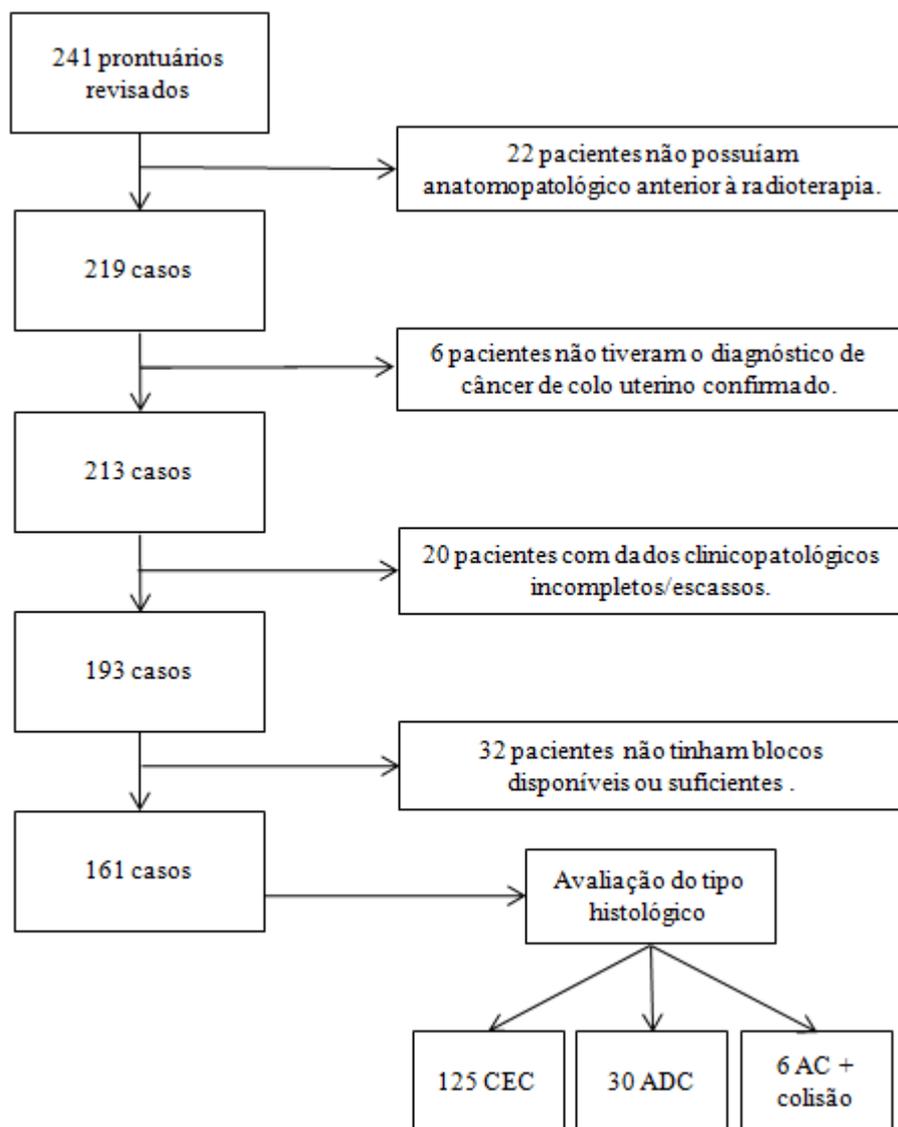


Figura 14. Fluxograma da seleção de amostras para o estudo.

5.1.1 Características sociodemográficas e clinicopatológicas das pacientes com câncer de colo uterino

O intervalo de seguimento das pacientes que compõem o grupo variou de 1 a 147 meses, e a média de meses foi de 74 meses ($\pm 103,2$). Os dados sociodemográficos das pacientes estão descritos na Tabela 3. A idade das mulheres que compõe o grupo de estudo variou de 26 a 88 anos e a média de idade foi 51,4 anos ($\pm 15,04$). Dessas mulheres, 81 (50,31%) tinham menos de 50 anos. A maioria das mulheres era casada (41,61%). O hábito de fumar foi relatado por 40,99% das mulheres e o hábito de consumir bebidas alcoólicas por 8,70%. Mulheres com idades entre 41 e 60 anos somaram quase a metade dos casos de câncer de colo uterino neste estudo e 50,31% foram diagnosticadas com câncer enquanto ainda estavam na menacme. A maioria das pacientes (64,60%) residia no interior do estado e veio à capital para receber tratamento.

Tabela 3. Análise descritiva das características sociodemográficas de mulheres diagnosticadas com câncer de colo uterino.

Variável	n	%
Idade ao diagnóstico		
Abaixo de 31	13	8,07
31---40	30	18,63
41---50	38	23,60
51---60	33	20,50
61---70	27	16,77
71---80	17	10,56
Acima de 80	3	1,86
Estado civil		
Solteira	39	24,22
Casada	67	41,61
Outros	53	32,92
Não informado	2	1,24
Fumante		
Sim	66	40,99
Não	78	48,45
Não informado	16	9,94
Masca fumo	1	0,62
Etilista		
Sim	14	8,70
Não	115	71,43
Não informado	32	19,88
Status menstrual		
Menacme	81	50,31
Menopausa	80	49,69
Origem		
Goiânia	47	29,19
Outras cidades do estado de Goiás	104	64,60
Outros estados	9	5,59
Não informado	1	0,62

O tratamento do câncer de colo uterino incluiu principalmente cirurgia e radioterapia (Tabela 4). A maioria das mulheres com câncer de colo uterino foi submetida a algum tipo de cirurgia durante o tratamento, sendo a histerectomia radical o procedimento mais frequente (27,33%). Quanto ao tratamento radioterápico, a combinação radioterapia externa + braquiterapia foi utilizada em 38,51% das pacientes. O tratamento quimioterápico no câncer de colo uterino apresenta baixa efetividade, sendo usado somente nos casos metastáticos. No presente estudo, o tratamento quimioterápico foi utilizado em 12,42% dos casos.

Tabela 4. Análise descritiva do tratamento administrado às mulheres diagnosticadas com câncer de colo uterino.

Variável	n	%
Tratamento cirúrgico		
Sim	105	65,22
Não	56	34,78
Tipo cirúrgico		
Conização	14	8,70
Histerectomia total	12	7,45
Histerectomia radical	44	27,33
Cone + HTA total	10	6,21
Cone+ HTA radical	25	15,53
Tratamento radioterápico		
Radioterapia externa somente	19	11,80
Braquiterapia somente	3	1,86
Ambas	62	38,51
Nenhum	77	47,83
Tratamento quimioterápico		
Sim	20	12,42
Não	141	87,58

Cone: conização; HTA: histerectomia

As características clinicopatológicas das pacientes com câncer de colo uterino são descritas na Tabela 5. O tipo histológico mais comum foi o carcinoma escamoso, 77,64% dos casos, seguido dos adenocarcinomas (18,63%). Quanto ao grau histológico, os tumores G1 + G2 compreenderam 51,55% dos casos. Quanto à extensão da lesão, 75,16% dos casos eram classificados como TI e TII. Ao final de 60 meses, 67,08% das mulheres estavam vivas. O comprometimento metastático de linfonodos foi observado em 3,73% das mulheres e 11,80% tiveram metástase à distância, durante o período avaliado.

Tabela 5. Análise descritiva das características clinicopatológicas dos carcinomas de colo uterino.

Variável	N	%
Tipo histológico		
Ca escamoso	125	77,64
Adenocarcinoma	30	18,63
Adenoescamoso e colisão	6	3,73
Extensão da lesão		
Tis	5	3,11
I e II	121	75,16
III e IV	31	19,25
Não Avaliado	4	2,48
Grau tumoral		
GI + GII	83	51,55
GIII	38	23,60
Gx	40	24,84
Comprometimento linfonodal		
Nx	14	8,70
N0	140	86,96
N1	6	3,73
Mestástase		
Mx	1	0,62
M0	141	87,58
M1	19	11,80
Estadiamento clínico		
Tis	5	3,11
I e II	121	75,16
III e IV	31	19,25
Não avaliado	4	2,48
Evolução do paciente		
Viva	108	67,08
Óbito	53	32,92

Ca: câncer; Tis: carcinoma *in situ*

A hiperexpressão de p16INK4a foi observada em 145 casos (90,0%), enquanto a hipoexpressão foi observada em 16 casos (10,0%). Nenhuma associação estatisticamente significativa foi observada entre a expressão de p16INK4a e os aspectos clinicopatológicos dos carcinomas de colo uterino avaliados (Tabela 6).

Tabela 6. Análise univariada das possíveis associações entre a hipoexpressão ($\leq 50\%$) e hiperexpressão ($>50\%$) de p16INK4a e os aspectos clinicopatológicos em mulheres com carcinoma de colo uterino.

Parâmetro	p16INK4a $\leq 50\%$ n=16 (10,0%)	p16INK4a $>50\%$ n=145 (90,0%)	N¹	P
Idade				
≤ 50 anos	6 (37,5%)	75 (51,7%)	81	0,305
>50 anos	10 (62,5%)	70 (48,3%)	80	
Extensão da lesão				
Tis	0 (0%)	5 (3,44%)	5	0,4904
TI e TII	11 (68,7%)	110 (75,8%)	121	
TIII e TIV	5 (31,3%)	26 (17,9%)	31	
Não avaliado	0 (0%)	4 (2,76%)	4	
Metástase Linfonodal				
N0	13 (81,3%)	127 (87,6%)	140	0,547
N1	1 (6,25%)	5 (3,45%)	6	
Metástase à distância				
M0	14 (87,5%)	127 (87,6%)	141	0,5125
M1	1 (6,25%)	18 (12,4%)	19	
Grau histológico				
Gx	3 (18,7%)	37 (25,5%)	40	0,3562
G1 +G2	9 (56,3%)	74 (51,0%)	83	
G3	4 (25%)	34 (23,4%)	38	
Estadiamento clínico				
Tis	0 (0%)	5 (3,44%)	5	0,4904
I e II	11 (68,7%)	110 (75,8%)	121	
III e IV	5 (31,3%)	26 (17,9%)	31	
Não avaliado	0 (0%)	4 (2,76%)	4	
Tipo histológico				
Carcinoma escamoso	10 (62,5%)	115 (79,3%)	125	0,1256
Adenocarcinoma e Adenoescamoso	6 (37,5%)	30 (20,7%)	36	

¹Alguns casos não apresentaram todas as informações analisadas pelo teste estatístico. Uma vez que apresentaram a maioria das informações os dados foram avaliados como um todo.

5.2 Aspectos Prognósticos: Análise de sobrevida

Os principais aspectos prognósticos do carcinoma de colo uterino foram avaliados em função da sobrevida. A sobrevida global em 60 meses para o grupo estudado foi de 69,0% (figura 15).

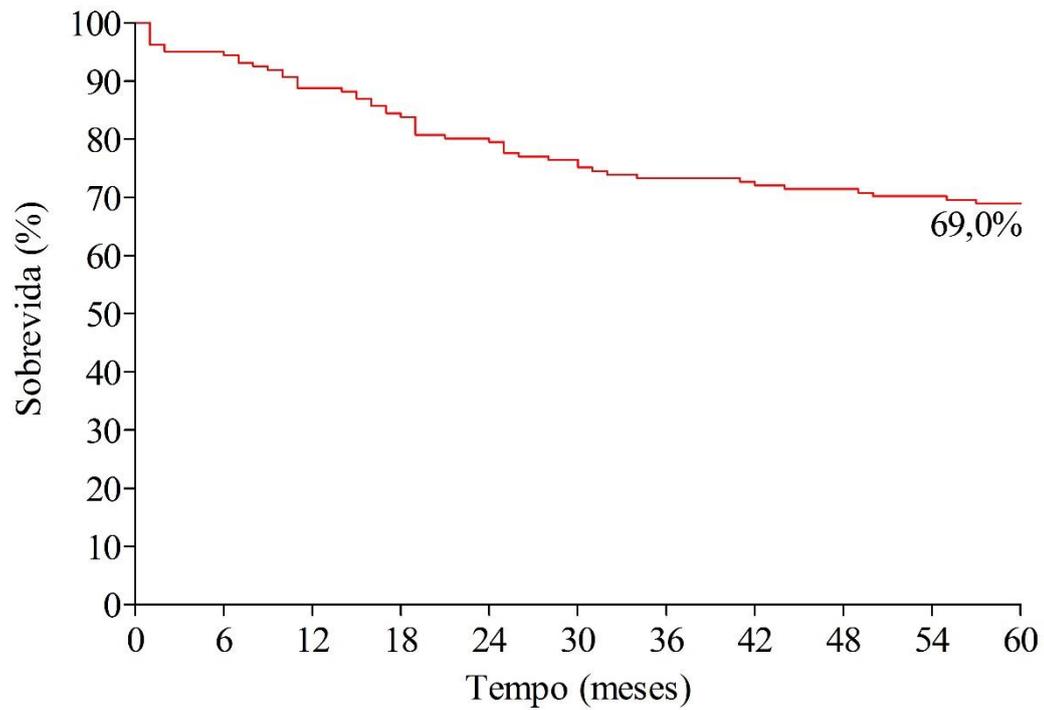


Figura 15. Análise de sobrevida global em 60 meses para as mulheres diagnosticadas com carcinoma de colo uterino.

A sobrevida em 60 meses para carcinomas escamosos foi de 67,2% e para adenocarcinoma + adenoescamoso foi igual a 75% ($p=0,42$) (Figura 16).

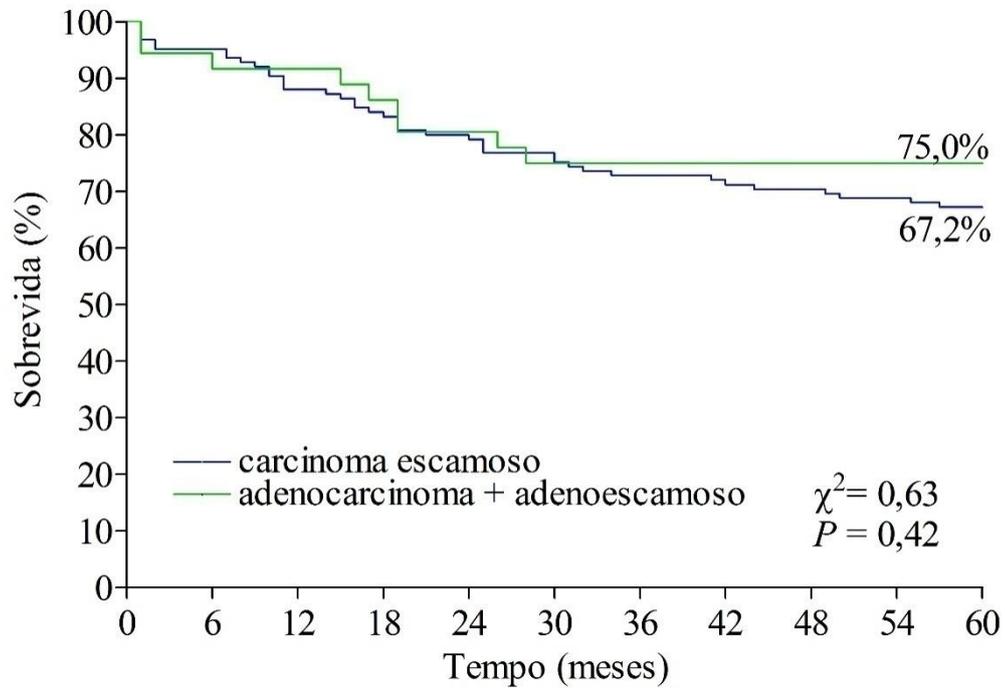


Figura 16. Sobrevida em 60 meses para as mulheres diagnosticadas com carcinoma do colo em função do tipo histológico do tumor.

A sobrevida em 60 meses para os tumores TI e TII (71,9%) foi maior que para os tumores TIII e TIV (54,8%) ($p=0,04$) (Figura 17).

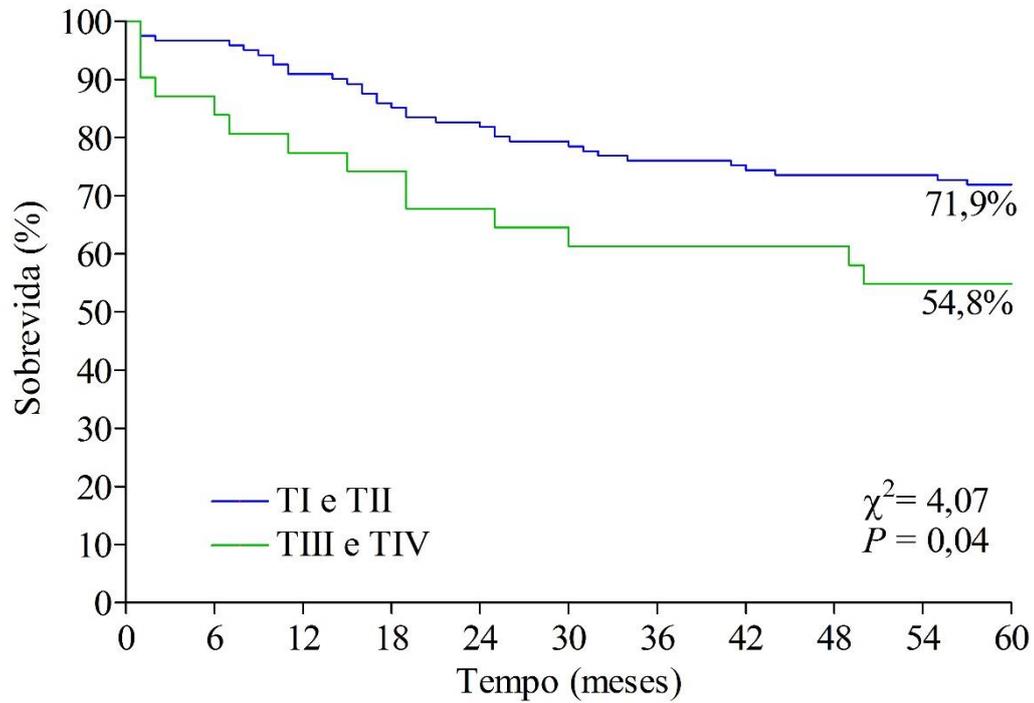


Figura 17. Sobrevida em 60 meses para as mulheres diagnosticadas com carcinoma de colo uterino em função da extensão tumoral.

A sobrevida em 60 meses para as mulheres diagnosticadas com carcinoma de colo uterino com metástase linfonodal foi de 50,0% e para aquelas com carcinomas não-metastáticos foi igual a 70,9% ($p=0,21$) (Figura 18).

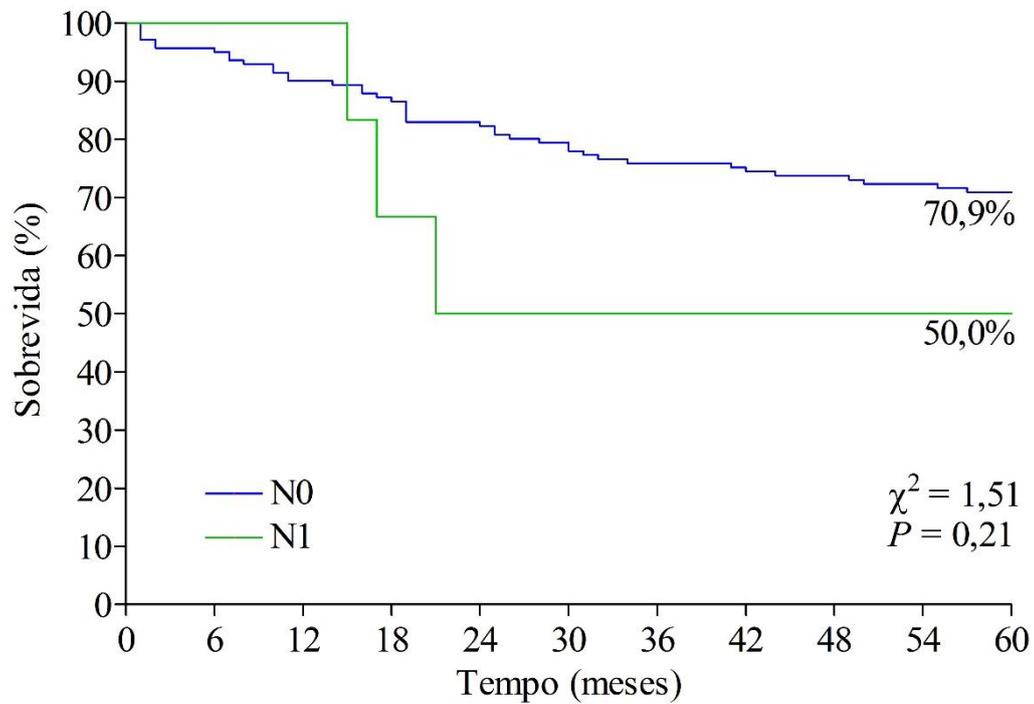


Figura 18. Sobrevida em 60 meses para as mulheres diagnosticadas com carcinoma de colo em função da presença de metástase linfonodal.

A sobrevida em 60 meses para as mulheres com carcinomas de colo uterino metastáticos foi de 68,4% e para as mulheres com carcinomas não-metastáticos foi igual a 69,5% ($p=0,84$) (Figura 19).

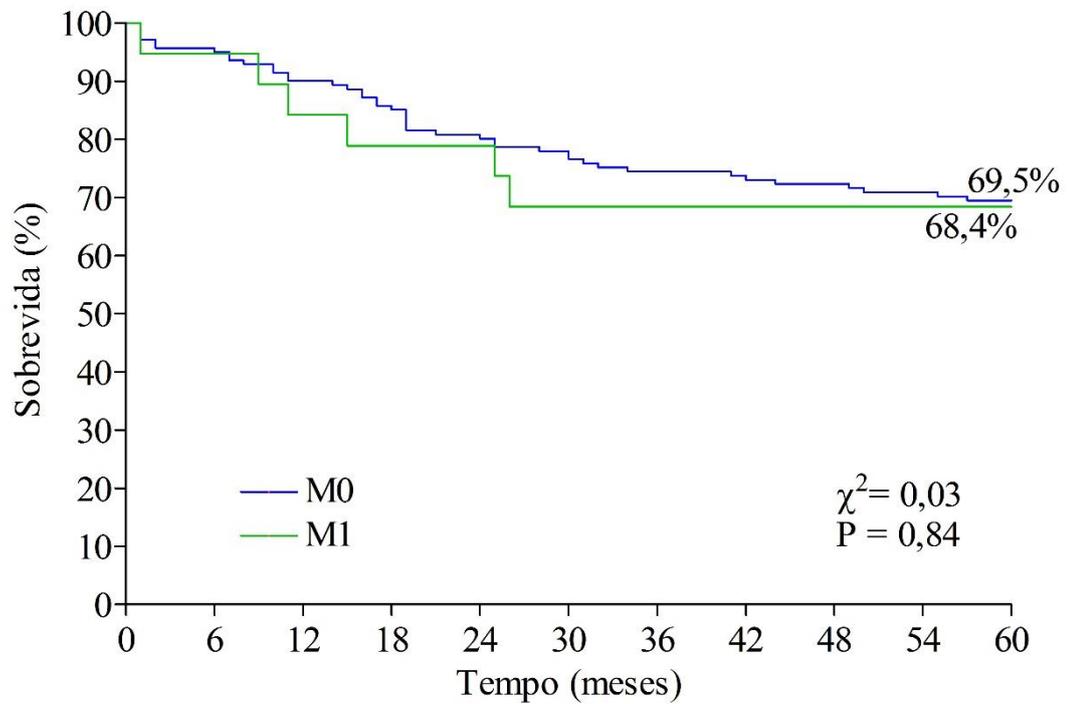


Figura 19. Sobrevida em 60 meses para as mulheres diagnosticadas com carcinoma de colo uterino em função da presença de metástases à distância.

A sobrevida em 60 meses para os carcinomas em estágio I e II (71,9%) foi maior que para aqueles em estágio III e IV (54,8%) ($p=0,04$) (Figura 20).

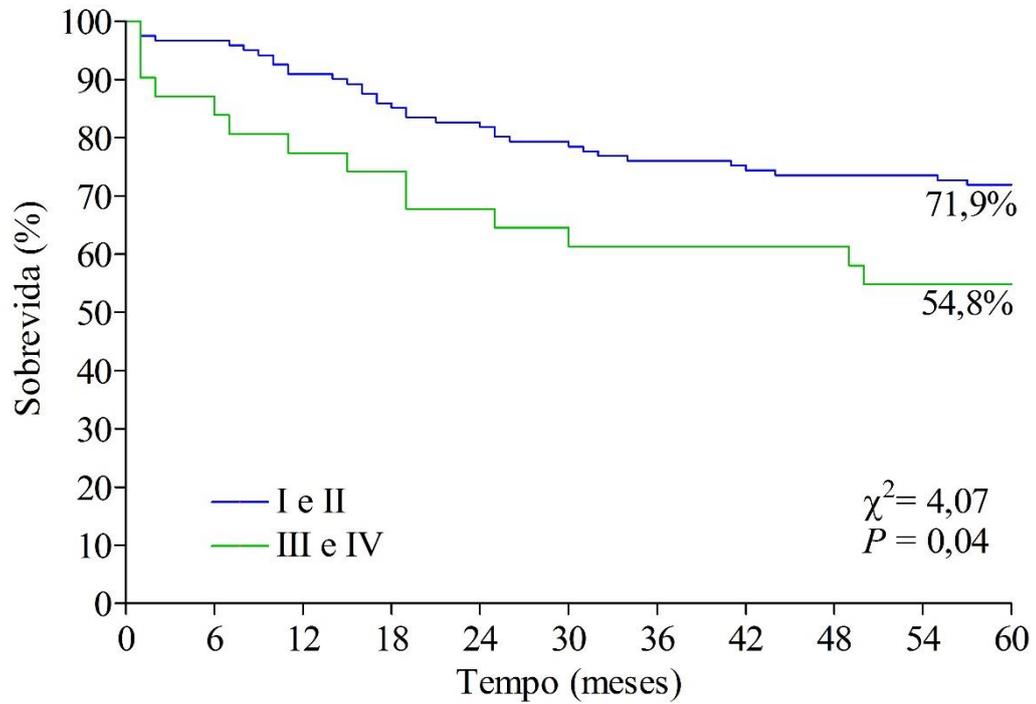


Figura 20. Sobrevida em 60 meses para as mulheres diagnosticadas com carcinoma de colo uterino em função do estadiamento clínico.

A sobrevida em 60 meses para os carcinomas de colo uterino com hiperexpressão de p16INK4a foi de 70,3% e para aqueles com hipoexpressão de p16INK4a foi igual a 56,25% ($p=0,17$) (Figura 21).

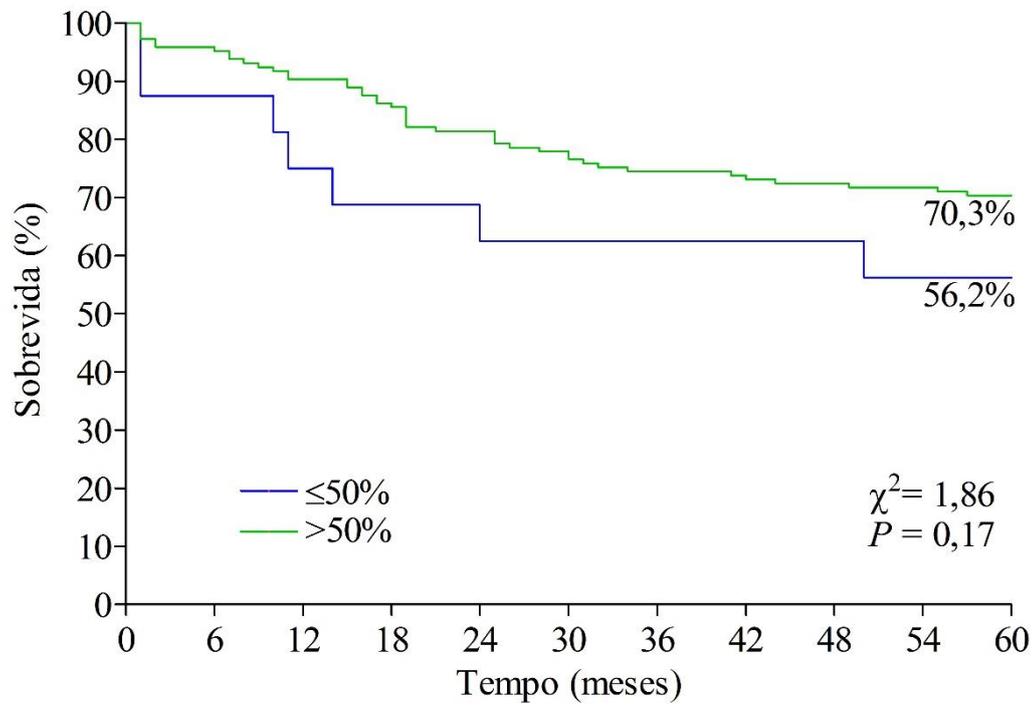


Figura 21. Análise da sobrevida em 60 meses para as mulheres diagnosticadas com carcinoma de colo uterino em função da expressão de p16INK4a.

6 DISCUSSÃO

Os principais fatores prognósticos para o câncer de colo uterino incluem o estadiamento clínico, o tipo histológico, o tamanho tumoral e a presença de metástases linfonodais e à distância (NAKAGAWA et al., 2011). Entretanto, parte dos tumores diagnosticados em estádios iniciais evolui de forma agressiva, invadindo estruturas adjacentes ao colo uterino e comprometendo a sobrevida das pacientes (SILVA-FILHO, 2009). Estudos moleculares buscam identificar marcadores tumorais capazes de prever o prognóstico dos cânceres do colo uterino e no presente estudo, um desses marcadores, p16INK4a, foi investigado. De acordo com nossos resultados, os tumores com hiperexpressão de p16INK4a apresentaram sobrevida em cinco anos de 70,3%, enquanto que os tumores com hipoexpressão de p16INK4a apresentaram sobrevida de 56,2%, porém, as diferenças entre os dois grupos não foram estatisticamente significativas.

Normalmente, em células epiteliais, a proteína p16INK4a é pouco expressa (BODNER et al., 2011). Na maioria dos tumores, p16INK4a encontra-se inativada por mutações de ponto, deleções ou metilação da região promotora (WENG et al., 2012). Já em células infectadas por HPV de alto risco, o aumento da expressão de p16INK4a está associado à degradação e inativação da pRb por ação da oncoproteína viral E7. A degradação de pRb, libera E2F, um fator de transcrição ubíquo, que aumenta a expressão de vários genes (REED, 2001), dentre eles, p16INK4a, por meio de mecanismos de demetilação mediados por KDM6B. (MCLAUGHLIN-DUBRIN; CRUM; MÜNGER, 2011; MCLAUGHLIN-DUBRIN; PARK; MUNGER, 2013).

A infecção produtiva por HPV pode levar a um padrão ordenado de replicação do genoma viral e à expressão de genes virais necessários à montagem e liberação de novas partículas de vírus nas camadas mais superiores do epitélio (BOSH et al., 2013). Em contrapartida, a infecção persistente por HPV de alto risco pode levar à expressão desregulada dos genes virais, elevando o risco de integração do genoma viral na célula hospedeira e de progressão para o câncer. Na maioria dos casos, as infecções por HPV são resolvidas espontaneamente pela resposta imune das células do hospedeiro (ODUNSI; PEJOVIC; ANDERSON, 2011). A infecção transformante pelo HPV ocorre quando há expressão persistente de genes virais, seguida da integração do DNA viral ao genoma do hospedeiro, podendo levar ao acúmulo de alterações genéticas secundárias e desenvolvimento do câncer. A infecção transcricionalmente ativa por HPV de alto risco resulta no aumento da expressão

da oncoproteína E7 que, ao inativar a proteína pRb, termina aumentando os níveis de p16INK4a (BOSH et al., 2013).

Hipoteticamente, a hiperexpressão de p16INK4a, poderia representar um mecanismo de defesa da célula, frente à infecção transcricionalmente ativa por HPV de alto risco. Uma vez que p16INK4a é um inibidor de CDK4, que promove a fosforilação de pRb, liberando E2F, sua hiperexpressão poderia representar uma alça de retroinibição de CDK4, na tentativa de inibir a fosforilação de pRb. Frente à degradação de pRb induzida pela oncoproteína E7, a hiperexpressão de p16INK4a traduz um estado de transcrição ativa dos genes virais, porém seus efeitos repressivos são improdutivos e sua ação no prognóstico tumoral não está clara.

Os estudos que avaliaram a expressão de p16INK4a e os aspectos prognósticos dos carcinomas de colo uterino apresentaram resultados conflitantes. Alguns estudos demonstraram uma associação significativa entre a baixa expressão de p16INK4a e melhor sobrevida da paciente (ALFSEN et al., 2003; VN DE PUTTE et al., 2003; MASOUDI et al., 2006). Por outro lado, outros estudos não puderam comprovar tal associação (BODNER et al., 2011; SCHWARZ et al., 2011; CHEAH et al., 2012; SON et al., 2012).

Duas meta-análises avaliaram a hiperexpressão de p16INK4a em pacientes com carcinoma de colo uterino e o prognóstico destes tumores (HUANG et al., 2014; LIN et al., 2014). Em uma delas, não houve associação significativa entre a expressão de p16INK4a e a sobrevida geral (RR 0.66, 95% CI 0.32-1.37; $p=0.26$), com heterogeneidade significativa ($I^2=80\%$, $p<0.0001$), além da expressão de p16INK4a não ter sido associada aos parâmetros clínicos, como TNM, grau histológico ou tipo histológico (HUANG et al., 2014). O contrário foi observado em outro estudo, onde a hiperexpressão de p16INK4a foi associada significativamente com a sobrevida geral (95% CI: 0,21-0,72, $p=0,002$), com heterogeneidade entre os estudos ($I^2=58\%$, $p_h=0,05$) (LIN et al., 2014). Quanto aos parâmetros clínicos, a hiperexpressão de p16INK4a foi fortemente correlacionada com metástase linfonodal ($p=0,01$), porém, não foi estatisticamente associada ao TNM, grau histológico, tamanho do tumor ou invasão vascular (LIN et al., 2014).

Os nossos resultados se assemelham aos achados da meta-análise desenvolvida por Huang e colaboradores (2014), em que nenhuma associação significativa foi encontrada em relação à hiperexpressão de p16INK4a e a sobrevida geral das pacientes, porém, nossos achados diferem de ambas, quanto à associação de p16INK4a ao TNM e à extensão da lesão. Tais diferenças podem ser justificadas levando-se em conta a falta de padronização de parâmetros dos estudos. O valor de *Cut-off* para a hiperexpressão de p16INK4a entre os estudos publicados variou de 0 a 100%, enquanto em nosso estudo o *cut-off* foi de 50%,

impedindo uma comparação adequada entre os estudos. Quanto aos tipos histológicos avaliados, três estudos avaliaram a expressão de p16INK4a em carcinomas escamosos (VAN DE PUTTE et al., 2003; MASOUDI et al 2006; SCHWARZ et al., 2011), três em adenocarcinomas (ALFSEN et al., 2003; MULLER et al., 2008; BODNER et al., 2011) e quatro estudos avaliaram a expressão em epitélio normal, NIC 1, NIC 2, NIC 3 e carcinomas escamosos (FENG et al., 2007; CHEAH et al., 2012; SON et al., 2012; WENG et al., 2012).

Entre os estudos analisados, somente Muller e colaboradores (2008) utilizou anticorpo de Kit CINtec®, o mesmo utilizado em nossas análises. Os demais utilizaram clones de um único epítipo anti-p16INK4a. O sistema CINtec® é um coquetel imunohistoquímico composto de anticorpos anti-p16INK4a que demonstra uma especificidade maior para detecção de p16INK4a e associada à presença do HPV de alto risco (EDGERTON; COHEN; SIDDIQUI, 2011).

No presente estudo, não foi possível demonstrar uma associação entre a expressão de p16INK4a e o prognóstico do câncer de colo uterino ($p=0,17$). A hiperexpressão de p16INK4a nas células tumorais pode ter um possível efeito protetor, significando uma tentativa de reparo e senescência das células afetadas por HPV transcricionalmente ativo (LIN et al., 2014), sendo considerada, assim, um fator de melhor prognóstico. Contudo, em nosso estudo, não foi observada associação significativa entre a sobrevida das pacientes diagnosticadas com carcinoma de colo uterino e os níveis de expressão de p16INK4a. Entretanto, um outro estudo de nosso grupo, ainda não publicado, realizado com os mesmos casos de carcinomas de colo uterino, encontrou genótipos virais de HPVs de alto risco em 90% dos casos. Essa elevada frequência de infecção por HPV de alto risco pode ser a explicação da ausência de correlação existente entre a hiperexpressão de p16INK4a encontrada em nosso estudo.

Ainda sobre o prognóstico dos carcinomas de colo uterino, dentre as variáveis analisadas para o estágio clínico, somente a invasão de estruturas adjacentes esteve associada à sobrevida ($p=0,04$). Já o comprometimento linfonodal ($p=0,21$) e a presença de metástase à distância ($p=0,84$) não apresentaram associações significativas. Já está bem estabelecido que o estágio clínico é essencial para selecionar e avaliar o tratamento das pacientes com câncer de colo uterino (SILVA-FILHO, 2009). No presente estudo, a maioria das pacientes (75%) estava em estágio I e II e não apresentava metástase linfonodal e nem à distância, o que poderia traduzir um bom prognóstico. A sobrevida global foi de 69%, refletindo o melhor prognóstico dos tumores diagnosticados em estágios iniciais. Quando a sobrevida foi avaliada

em função da extensão da doença, observou-se que os estádios III e IV apresentavam sobrevida mais reduzida, refletindo o pior prognóstico em tumores mais avançados e a necessidade de prevenção para detecção precoce do câncer de colo uterino (JEMAL; BRAY; FERLAY, 2011).

A principal faixa etária acometida pelo câncer de colo uterino está entre 35-50 anos (SONG et al., 2007; MENDONÇA et al., 2010), no entanto, em nosso trabalho a faixa etária mais prevalente foi a de 40 a 60 anos. Este aumento na faixa etária pode estar relacionado ao início de vida sexual mais tardiamente, bem como às mudanças no comportamento sexual das mulheres, que muitas vezes iniciam atividade sexual com outros parceiros na faixa de 40 anos (BOSCH et al., 2008; RIBEIRO et al., 2015).

A proporção de carcinomas escamosos, adenocarcinomas e carcinomas adenoescamosos neste estudo está de acordo com o descrito na literatura (BODNER et al., 2011). Em conjunto, os adenocarcinomas e os carcinomas adenoescamosos somaram mais de 20% dos casos. Normalmente, um pior prognóstico, e conseqüente menor sobrevida, são observados em carcinomas que afetam as células glandulares, devido a fatores como a dificuldade em identificar as lesões precursoras em glândulas cervicais e também devido a maior resistência dos tumores ao tratamento radioterápico (ANDRADE, 2008; SILVA-FILHO, 2009). Entretanto, essa característica não foi observada neste estudo, em que a sobrevida para os carcinomas de células glandulares foi maior (75%) que a de carcinomas escamosos (67,2%), apesar da diferença não ter sido estatisticamente significativa ($p=0,42$). Em outros estudos que avaliaram somente adenocarcinomas, associações significativas foram encontradas entre o comprometimento linfonodal e a sobrevida da paciente (ALFSEN et al., 2003; BODNER et al., 2011).

Algumas limitações foram identificadas no desenvolvimento deste estudo, como o tamanho amostral e a falta de informações nos prontuários. Quanto ao tamanho amostral, não foi possível seguir a amostra populacional calculada estatisticamente, tornando ao final do trabalho, uma amostra por conveniência. Além disso, diversos estudos trabalharam com um número menor de carcinomas invasores e com maior número de lesões precursoras .

Estudos futuros sobre a expressão de p16INK4a devem ser realizados utilizando um grupo controle. Um grupo controle ideal, composto por amostras de epitélio normal, geralmente negativas para a expressão de p16INK4a, pode assim demonstrar a relação da hiperexpressão de 16INK4a e a infecção transcricionalmente ativa de HPV de alto risco.

Novos estudos com uma quantidade de casos proporcionais de carcinomas escamosos e adenocarcinomas de colo uterino, a utilização de outros marcadores prognósticos e a associação com diferentes marcadores que atuam no controle do ciclo celular elucidariam melhor a questão. Além disso, a combinação de marcadores prognósticos já identificados como o Ki67, um antígeno de proliferação celular e componentes da maquinaria do controle celular como p53 e pRb podem dar suporte a um diagnóstico mais completo e assim uma análise de prognóstico mais adequada para os carcinomas de colo uterino.

7 CONCLUSÕES

- ✓ Uma associação significativa entre a expressão de p16INK4a e o prognóstico do câncer de colo uterino não foi demonstrada nesse estudo.
- ✓ A hiperexpressão de p16INK4a em carcinomas de colo uterino foi observada em 145 casos (90%) e a hipoexpressão em 16 casos (10%).
- ✓ Associações significativas entre a expressão de p16INK4a e os aspectos clínicos e patológicos dos carcinomas de colo uterino não foram detectadas nesta análise.
- ✓ A sobrevida em cinco anos para as pacientes com carcinomas de colo uterino foi de 69%.
- ✓ Dentre os aspectos prognósticos avaliados, a extensão do tumor e o estadiamento clínico estiveram significativamente associados ao prognóstico das pacientes.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGGARWAL, P. Cervical cancer: Can it be prevented? **World Journal of Clinical oncology**, Out (5)(4): 775–780. 2014.
- ALFSEN, G. C.; REED, W.; SANDSTAD, B.; KRISTENSEN, G. B.; ABELER, V. M. The Prognostic Impact of Cyclin Dependent Kinase Inhibitors p21 WAF1, p27Kip1, and p16INK4/MTS1 in Adenocarcinomas of the Uterine Cervix: An Immunohistochemical Evaluation of Expression Patterns in Population-Based Material from 142 Patients with Internat. **Cancer**, Nov (98)(9): 1880–1889. 2003.
- ANDRADE, L. A. L. D. A. Diagnóstico Histológico das Neoplasias Glandulares Intra-epiteliais e invasivas. In: COELHO, R. F. G. *et al.* **Câncer do colo do útero**. São Paulo. Tecmedd. 2008.
- ARBYN, M.; CASTELLSAGUÉ, X.; SANJOSÉ, S.; BRUNI, L.; SARAIYA, M.; BRAY, F.; FERLAY, J. Worldwide burden of cervical cancer in 2008. **Annals of Oncology**, Dez (22)(12): 2675–2686. 2011.
- AYRES, A. R. G.; SILVA, G. A. Prevalência de infecção do colo do útero pelo HPV no Brasil: revisão sistemática. **Revista de Saúde Pública**, Out (44)(5). 2010.
- BAAK, J. P. A.; KRUSE, A. –J.; ROBBOY, S. J.; JANSSEN, E. A. M.; VAN DIERMEN, B.; SKALAND, I. Dynamic behavioural interpretation of cervical intraepithelial neoplasia with molecular biomarkers. **Journal of Clinical Pathology**, Out (59)(10): 1017-1028. 2006.
- BAALBERGEN, A.; EWING-GRAHAM, P. C.; HOP, W. C.; STRUIJK, P.; HELMERHORST, T. J. Prognostic factors in adenocarcinomas of the uterine cervix. **Gynecologic Oncology**, Jan (92)(1): 262-7. 2004.
- BAHANASSY, A. A.; ZEKRI, A. R. N.; SALEH, M.; LOTAYEF, M.; MONEIR, M.; SHAWKI, O. The possible role of cell cycle regulators in multistep processo f HPV-associated cervical carcinoma. **BCM Clinical Pathology**, Maio (24): 4. 2007.
- B EGLIN M.; MELAR-NEW, M.; LAIMINS, L. Human Papillomaviruses and the Interferon Response. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, Jun (29)(9): 629-635. 2009.
- BENEVOLO, A.; MOTTOLESE, M.; MARANDINO, F.; VOCATURO, G.; SINDICO, R.; PIPERNO, G.; MARIANI, L.; SPERDUTI, I.; CANALINI, P.; DONNORSO, R. P.; VOCATURO, A. Immunohistochemical expression of p16(INK4a) is predictive of HR-HPV infection in cervical low-grade lesions. **Modern Pathology**, Mar (19)(3): 384-91. 2006.
- BODILY, J.; LAIMINS, L. A. Persistence of human papillomavírus infections: keys to malignant progression. **Trends in Microbiology**, Jan (19)(1): 33–39. 2011.
- BODNER, K.; LAUBICHLER, P.; KIMBERGER, O.; CZERWENKA, K.; ZEILLINGER, P.; BODNER-ADLER, B. Expression of p16 protein and epidermal growth factor receptor in patients with adenocarcinoma of the uterine cervix: an immunohistochemical analysis. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, Mar (283)(3): 611–616. 2011.

- BONELLI, P.; TUCCILLO, F. M.; BORRELLI, A.; SCHIATTARELLA, A.; BUONAGURO, F. M. CDK/CCN and CDKI alterations for cancer prognosis and therapeutic predictivity. **BioMed Research International**, Jan (2014): 15. 2014.
- BOSCH, F. X., BROKER, T. R.; FORMAN, D.; MOSCICKI, A. B.; GILLISON, M. L.; DOORBAR, J.; STERN, P. L.; STANLEY, M.; ARBYN, M.; POLJAK, M.; CUZICK, J.; CASTLE, P. E.; SCHILLER, J. T.; MARKOWITZ, L. E.; FISHER, W. A.; CANFELL, K.; DENNY, L. A.; FRANCO, E. L.; STEBEN, M.; KANE, M. A.; SCHIFFMAN, M.; MEIJER, C. J.; SANKARANARAYANAN, R.; CASTELLSAGUÉ, X.; KIM, J. J.; BROTONS, M.; ALEMANY, L.; ALBERO, G.; DIAZ, M.; SANJOSÉ, S. Comprehensive control of human papillomavirus infections and related diseases. **Vaccine**, Dez (31)(31): SUPPL. 7:H1-31. 2013.
- BOSCH, F. X.; SANJOSÉ, S. Chapter 1: human papillomavirus and cervical cancer- burden and assessment of causality. **Journal of the National Cancer Institute Monographs**, (31):3-13. 2003.
- BOSCH, F. X.; SANJOSÉ, S. The epidemiology of human papillomavirus infection and cervical cancer. **Disease markers**, (23)(4): 213–27. 2007.
- BOSCH, F.X.; BURCHELL, A. N.; SCHIFFMAN, M.; GIULIANO, A. R.; SANJOSE, S.; BRUNI, L.; TORTOLERO-LUNA, G.; KJAER, S. K.; MUÑOZ, N. Epidemiology and Natural History of Human Papillomavirus Infections and Type-Specific Implications in Cervical Neoplasia. **Vaccine**, Ago (19)(26)SUPPL. 10: K1-16. 2008.
- CACCIÒ, S. M. Molecular epidemiology of human cryptosporidiosis. **Parasitologia**, Jun(47)(2): 185–192. 2005.
- CAMPANER, A. B.; SANTOS, R. E.; GALVÃO, M. A. L. Importância do tabagismo na carcinogênese do colo uterino. **Femina**, Nov (35)(11): 713-717. 2007.
- CHEAH, P. L.; LOOI, L.-M.; TEOH, K.-H.; MUN, K. -S.; NAZARINA, A. R. p16INK4a is a useful marker of human papillomavirus integration allowing risk stratification for cervical malignancies. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, (13)(2): 469–472. 2012.
- CHEN, Y.; WILLIAMS, V.; FILIPPOVA, M.; FILIPPOV, V.; DUERKSEN-HUGHES, P. Viral Carcinogenesis: Factors Inducing DNA Damage and Virus Integration. **Cancers**, Dez (6)(4): 2155–2186. 2014.
- CHO, N. H.; KIM, Y. T.; KIM, J. W. Alteration of cell cycle in cervical tumor associated with human papillomavirus: cyclin-dependent kinase inhibitors. **Yonsei Medical Journal**, Set (43)(6): 722-728. 2002.
- CHOW, L. T.; BROKER, T. R.; STEINBERG, B. M. The natural history of human papillomavirus infections of the mucosal epithelia. **Apms**, Jun (118)(6-7): 422–49. 2010.
- CIBULA, D.; GOMPEL, A.; MUECK, A. O.; LA VECCHIA, C.; HANNAFORD, P. C.; SKOUBY, S. O.; ZIKAN, M.; DUSEK, L. Hormonal contraception and risk of cancer. **Human Reproduction Update**, Nov-Dez (16)(6): 631–650. 2010.

CID ARREGUI, A.; GARIGLIO, P.; KANDA, T.; DOORBAR, J. ONCOGENIC HUMAN PAPILOMAVIRUSES: High-Risk Human Papillomaviruses: Towards a Better Understanding of the Mechanisms of Viral Transformation, Latency and Immune-Escape. **The Open Virology Journal**, Dez (6):160–162. 2012.

CIESIELSKA, U.; NOWINSKA, K.; PODHORSKA- OKOLÓW, M.; DZIEGIEL, P. The role of human papillomavirus in the malignant transformation of cervix epithelial cells and the importance of vaccination against this virus. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, (21)(2): 235–244. 2012.

CONESA-ZAMORA, P. Role of cell cycle biomarkers in human papillomavirus related uterine lesions. **Current Pharmaceutical Design**, (19)(8): 1412-24. 2013.

DOORBAR, J. Latent papillomavirus infections and their regulation. **Current Opinion in Virology**, Ago (3)(4): 416-21. 2013.

DOORBAR, J. Model systems of human papillomavirus-associated disease. **The Journal of Pathology**, Jan (238)(2): 166-79. 2016.

DOORBAR, J.; EGAWA, N.; GRIFFIN, H.; KRANJEC, C.; MURAKAMI, I. Human papillomavirus molecular biology and disease association. **Reviews in Medical Virology**, Mar (25): SUPPL. 1: 2-23. 2015.

DOORBAR, J.; QUINT, W.; BANKS, L.; BRAVO, I. G.; STOLER, M.; BROKER, T. R.; STANLEY, M. A. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. **Vaccine**, Nov (20)(30): SUPPL.5: F55-70. 2012.

DUENSING, S.; MÜNGER, K. Mechanisms of genomic instability in human cancer: insights from studies with human papillomavirus oncoproteins. **International Journal of Cancer**, Mar (109)(2): 157-162. 2004.

DUGUE, P.-A.; REBOLJ, M.; GARRED, P.; LYNGE, E. Immunosuppression and risk of cervical cancer. **Expert Review Anticancer Therapy**, Jan (13)(1): 29–42. 2013.

EDGERTON, N.; COHEN, C.; SIDDIQUI, M. T. Evaluation of CINtec PLUS® test as an adjunctive test in ASC-US diagnosed SurePath® preparations. **Diagnosis in Cytopathology**, Jan (41)(1):35-40. 2013.

EGAWA, N.; EGAWA, K.; GRIFFIN, H.; DOORBAR, J. Human Papillomaviruses; Epithelial Tropisms, and the Development of Neoplasia. **Viruses**, Jul (7)(7): 3863–3890. 2015.

ELEUTÉRIO-JUNIOR, J.; GIRALDO, P. C.; GONÇALVES, A. K.; CAVALCANTE, D. I.; ALMEIDA- FERREIRA, F. V.; MESQUITA, S. M. Prognostic markers of high- grade squamous intraepithelial lesions: the role of p16INK4a and high-risk human papillomavirus. **Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica**, (86)(1): 94-8. 2007.

ERICKSON, B. K.; ALVAREZ, R. D.; HUH, W. K. 2013. Human papillomavirus: What every provider should know. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, Mar (208)(3):169–175. 2013.

FENG, W.; XIAO, J.; ZHANG, Z.; ROSEN, D. G.; BROWN, R. E.; LIU, J.; DUAN, X. Senescence and apoptosis in carcinogenesis of cervical squamous carcinoma. **Modern Pathology**, Set (20)(9): 961-0. 2007.

FERRAZ, L. C.; SANTOS, A. B. R.; DISCACCIATI, M. G. Ciclo celular , HPV e evolução da neoplasia intraepitelial cervical : seleção de marcadores biológicos. **Journal of the Health Sciences Institute**, (30)(2):107–111. 2012.

FIGUEIREDO ALVES, R. R.; TURCHI, M. D.; SANTOS, L. E.; GUIMARÃES, E. M.; GARCIA, M. M.; SEIXAS, M. S.; VILLA, L. L.; COSTA, M. C.; MOREIRA, M. A.; ALVES, M. D. E. F. Prevalence, genotype profile and risk factors for multiple human papillomavirus cervical infection in unimmunized female adolescents in Goiânia, Brazil: a community-based study. **BMC Public Health**, Nov (4)(13): 1041. 2013.

FOCCHI, G. R. A.; SIMÕES, M. J.; SIMÕES, R. S.; SOARES, J. M. Jr.; BARACAT, E. C.; FOCCHI, J. Histologia do trato genital inferior. In: VALENTE, N. **Patologia do trato genital inferior: diagnóstico e tratamento**. 2ª.ed. São Paulo: Santos, cap. 4, p. 32-38, 2014.

FORAN, C.; BRENNAN, A. Prevention and nearly detection of cervical cancer in the UK. **British Journal of Nursing**, Jun (24)(10):S22-4. 2015.

FREITAS, A. C.; COIMBRA, E. C.; LEITÃO, M. C. G. Molecular targets of HPV oncoproteins: Potential biomarkers for cervical carcinogenesis. **Biochimica et Biophysica**, Abr (1845)(2):91-103. 2014.

GADDUCCI, A.; GUERRIERI, M. E.; GRECO, C. Tissue biomarkers as prognostic variables of cervical cancer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, Maio (86)(2): 104-129. 2013.

GENOVÉS, J.; ALAMEDDA, F.; MANCEBO, G.; SOLÉ, J. M.; BELLOSILLO, B.; LLOVERAS, B.; AGRAMUNT, S.; BARÓ, M. T.; MUSET, M.; CASADO, B.; SERRANO, L.; MIRALPEIX, E.; CARRERAS, R. Human papillomavirus detection and p16INK4a expression in cervical lesions: A comparative study. **Human Pathology**, Abr (45)(4): 826–833. 2014.

GHITTONI, R.; ACCARDI, R.; CHIOCCA, S.; TOMMASINO, M. Role of human papillomaviruses in carcinogenesis. **Ecancermedicalsecience**, Abr (29)(9): 526. 2015.

GIEN, L. T.; BEAUCHEMIN, M. C.; THOMAS, G. Adenocarcinoma: A unique cervical cancer. **Gynecologic Oncology**, Jan (116)(1): 140–146. 2010.

GLOBOCAN– [base de dados]. Cancers statistics results – Disponível em: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx , Acesso em: 03 jan 2016.

GOMPEL, A.; BABER, R. J.; VILLIERS, T. J.; HUANG, K.-E.; SANTEN, R. J.; SHAH, D.; VILLASECA, P.; SHAPIRO, S. Oncology in midlife and beyond. **Climacteric : The Journal of the International Menopause Society**, Jul(16)(5): 522–35. 2013.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, Jan (7)(100): 57-70. 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, Mar (144)(5): 646-74. 2011.

HENLEY, S. A.; DICK, F. A. The retinoblastoma family of proteins and their regulatory functions in the mammalian cell division cycle. **Cell Division**, Mar (7)(1):10. 2012.

HUANG, K.; LI, L. A.; MENG, Y. G.; FU, X. Y. P16 Expression in Patients With Cervical Cancer and Its Prognostic Significance: Meta-Analysis of Published Literature. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, Dez (183): 64–69. 2014.

IARC - [base de dados]. Digital atlas - Who histological classification of tumours of the uterine cervix-. Disponível em: <<http://screening.iarc.fr/atlasclassifw ho.php?lang=1>> , Acesso em: 03 jan 2016.

ICO – [bases de dados]. Information Center of HPV- Disponível em: <<http://www.hpvcentre.net/>>, Acesso em 05 jan 2016.

INCA- [base de dados]. Estatísticas do Câncer – Disponível em: <<http://www1.inca.gov.br/vigilancia/>>, Acesso em 28 dez 2015.

ISHIKAWA, M.; FUJII, T.; MASUMOTO, N.; SAITO, M.; MUKAI, M.; NINDL, I.; RIDDER, R.; FUKUCHI, T.; KUBUSHIRO, K.; TSUKAZAKI, K.; NOZAWA, S. Correlation of p16INK4A overexpression with human papillomavirus infection in cervical adenocarcinomas. **International Journal of Gynecological Pathology**, Out (22)(4): 378-85. 2003.

JANICEK, M. F.; AVERETTE, H. E. Cervical cancer: prevention, diagnosis, and therapeutics. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, Mar-Abr (51)(2): 92-114. 2001.

JEMAL, A., BRAY, F.; FERLAY, J. Global Cancer Statistics. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, Mar-Abr (61)(2):69-90. 2011.

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 p16INK4 are complimentary surrogate biomarkers for human papilloma virus-related cervical neoplasia. **The American Journal of Surgical Pathology**, Jul (25)(7): 884–91. 2001.

KHAN, M. J.; SMITH-MCCUNE, K. K. Treatment of cervical precancers: back to basics. **Obstetrics and Gynecology**, Jun (123)(6):1339–43. 2014.

KIM, Y. T.; ZHAO, M. Aberrant cell cycle regulation in cervical carcinoma. **Yonsei Medical Journal**, Out (46)(5), p.597–613. 2005.

KOSS, L. G.; GOMPEL, C. Anatomia e histologia do trato genital feminino. In: **Introdução à citopatologia ginecológica com correlações histológicas e clínicas**. São Paulo: Roca, cap. 4, p. 24-31, 2006.

KUKU, S.; PROCTOR, I.; LODDO, M.; KADALAYIL, L.; KHOSHZABAN, M.; LEDERMANN, J. MCCORMACK, M. Do Cell-Cycle Phase-Specific Markers Predict Disease Grade, Stage, and Outcome in Cervical Carcinoma? **Ginecologia y obstetricia de Mexico**, Jul (7)(1):48–53. 2015.

KURSHUMLIU, F.; THORNS, C.; GASHI-LUCI, L. p16INK4A in routine practise as a marker of cervical epithelial neoplasia. **Gynecologic Oncology**, Out (115)(1): 127-31. 2009.

LAX, S. Histopathology of cervical precursor lesions and cancer. **Acta Dermatovenerologica Alpina, Pannonica et Adriatica**, Set (20)(3): 125-133. 2011.

LEHOUX, M.; D'ABRAMO, C. M.; ARCHAMBAULT, J. Molecular Mechanisms of Human Papillomavirus-Induced Carcinogenesis. **Public Health Genomics**, Ago (12)(0):268-280. 2009.

LEPPERT, P.C. Anatomy and physiology of cervical ripening. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, Jun(38)(2): 267–279. 1995.

LEVINE, D. A.; SANTOS, J.; FLEMING, G.; BARAKAT, R. R.; MARKMAN, M.; RANDALL, M. E. **Handbook for principles and practice of gynecologic oncology**. 5^a.ed. Lippincott Williams & Wilkins, cap. 7, p. 121-157, 2009.

LIN, J.; ALBERS, A. E.; QIN, J.; KAUFMANN, A. M. Prognostic significance of overexpressed p16^{INK4a} in patients with cervical câncer: A meta-analysis. **PLoS One**, Set (9)(9): e106384. 2014.

LONGATTO-FILHO, A.; LEVI, J. E.; MARTINS, T. R.; COHEN, D.; CURY, L.; VILLA, L. L.; ELUF-NETO, J. Critical analyses of the introduction of liquid-based cytology in a public health servisse of the state os São Paulo, Brasil. **Acta Cytologica**, Ago (59)(3): 273-7. 2015.

LONGWORTH, M.; LAIMINS, L. A. Pathogenesis of Human Papillomaviruses in Differentiating Epithelia. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Jun (68)(2):362-372. 2004.

LORINCZ, A. T. Cancer diagnostic classifiers based on quantitative DNA methylation. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, Abr (14)(3): 293–305. 2014

LOWE, S. W.; CEPERO, E.; EVAN, G. Intrinsic tumour suppression. **Nature**, Nov (18)(432): 307-15. 2004.

MARTINS, N. V.; OLIVEIRA, V. C.; PEREZ, C. A.; DÔRES, G. C. Colo do útero. In: LIMA, G. R.; GEBRIM, L. H.; OLIVEIRA, V. C.; MARTINS, N. V. **Ginecologia oncológica**. São Paulo: Atheneu, cap. 20, p.294-325, 1999.

MASOUDI, H.; VAN NIEKERK, D. J.; GILKS, C. B.; CHEANG, M.; BILEK, K.; FISCHER, U.; EHLEN, T.; MILLER, D.; HORN L. C. Loss of p16 INK4 expression in invasive squamous cell carcinoma of the uterine cervix is an adverse prognostic marker. **Histopathology**, Nov (49)(5): 542–545. 2006.

MCGRAW, S. L.; FERRANTE, J. M. Update on prevention and screening of cervical cancer. **World Journal of Clinical Oncology**, Out (5)(4): 744-752. 2014.

MCLAUGHLIN-DRUBIN, M. E.; CRUM, C. P.; MÜNGER, K. Human papillomavirus E7 oncoprotein induces KDM6A and KDM6B histone demethylase expression. And causes epigenetic reprogramming. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Fev (108)(5):2130-5. 2011.

MCLAUGHLIN-DUBRIN, M. E.; PARK, D.; MUNGER, K. Tumor supressor p16INK4A id necessary for survival of cervical carcinoma cell lines. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Out (110)(40): 16175-80. 2013.

MENDONÇA, V.G.; GUIMARÃES, M. J.; LIMA-FILHO, J. L.; MEDONÇA, C. G.; MARTINS, D. B.; CROVELLA, S.; ALENCAR, L. C. Human papillomavirus cervical infection: viral genotyping and risk factors for high-grade squamous intraepithelial lesion and cervix cancer. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia**, Out (32)(10): 476–485. 2010.

MILDE-LANGOSCH, K.; RIETHDORF, S.; KRAUS-PÖPPINGHAUS, A.; RIETHDORF, L.; LÖNING, T. Expression of cyclin-dependent kinase inhibitors p16MTS1, p21WAF1, and p27KIP1 in HPV-positive and HPV-negative cervical adenocarcinomas. **Virchows Archiv**, Jul (439)(1): 55–61. 2001.

MOTOYAMA, S.; LADINES-LLAVE, C. A.; VILLANUEVA, S. L.; MARUO, T. The Role of Human Papilloma Virus in the Molecular Biology of Cervical Carcinogenesis. **Kobe Journal of Medical Sciences**, Abr (50)(1): 9-19. 2004.

MULLER, S.; FLORES-STAINO, C.; SKYLDBERG, B.; HELLSTRÖM, A.-C.; JOHANSSON, B.; HAGMAR, B.; WALLIN, K.-L.; ANDERSSON, S. Expression of p16INK4a and MIB-1 in relation to histopathology and HPV types in cervical adenocarcinoma. **International Journal of Oncology**, Set (32)(2): 333–340. 2008.

MUÑOZ, N.; CASTELLSAGUÉ, X.; GONZALEZ, A. B. GISSMANN, L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. **Vaccine**, Jun (31)(24)SUPPL. 3:S3/1–10. 2006.

NAKAGAWA, J.T.; ESPINOSA, M. M.; BARBIERI, M.; SCHIRMER, J. Fatores associados ao câncer invasivo do colo do útero no estado de mato grosso. **Ciência, Cuidado e Saúde**, Dez (9)(4): 799–805. 2011.

OBEXER, P. HAGENBUCHNER, J.; HOLZNER, M.; AUSSERLECHNER, M. J. p16 INK4A – Connecting Cell Cycle Control to Cell Death Regulation in Human Leukemia. Dr Olga Babusikova (Ed.), ISBN: 978-953-307-400-9, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/t-cell-leukemia/p16ink4a-connecting-cell-cycle-control-to-cell-death-regulation-in-human-leukemia>

ODUNSI, K.; PEJOVIC, T.; ANDERSON, M. L. Gynecologic cancers. In: DEVITA, V. T. Jr.; LAWRENCE, T. S.; ROSENBERG, S. A. **Cancer. Principles e practice of oncology**. 1 Pap/Psc. ed. Lippincott Williams & Wilkins, cap. 23, p. 295-306, 2011.

OMRAN, O. M.; ALSHEEHA, M. Human papilloma virus early proteins E6 (HPV16/18-E6) and the cell cycle marker p16 (INK4a) are useful prognostic markers in uterine cervical carcinomas in Qassim Region- Saudi Arabia. **Pathology & Oncology Research**, Jan (21)(1):157-66. 2014.

PARK, T-W.; FUJIWARA, H.; WRIGHF, T. C. Molecular Biology of Cervical Cancer and its Precursors. **Cancer**, Nov (15)(76 – 10 Suppl.): 1902-13. 1995.

PETITO, G. Detecção e genotipagem de HPV em carcinomas de cavidade oral e orofaringe. Dissertação de mestrado, Goiânia. PUC-Goiás. 2014.

POPOV, N.; GIL, J. Epigenetic regulation of the INK4B-ARF-INK4a locus: In sickness and in health. **Epigenetics**, Nov-Dez (5)(8): 685–690. 2010.

PRASAD, S. B. YADAV, S. S.; DAS, M.; GOVARDHAN, H. B.; PANDEY, L. K.; SINGH, S.; PRADHAN, S.; NARAYAN, G. Down Regulation of FOXO1 Promotes Cell Proliferation in Cervical Cancer. **Journal of Cancer**, Ago (5)(8): 655–62. 2014.

REED, S. I. Cell cycle. In: DEVITA, V. T. Jr.; LAWRENCE, T. S.; ROSENBERG, S. A. **Cancer. Principles e practice of oncology**. 1 Pap/Psc. ed. **Lippincott Williams & Wilkins**, cap. 6, p. 84-101, 2011.

RIBEIRO, A. A.; COSTA, M. C.; ALVES, R. R. F.; VILLA, L. L.; SADDI, V. A.; CARNEIRO, M. A. S.; ZEFERINO, L. C.; RABELO-SANTOS, S. H. HPV infection and cervical neoplasia: associated risk factors. **Infectious Agents and Cancer**, Maio (10)(1):16. 2015.

ROELEN, J.; REUSCHENBACH, M.; KNEBELDOEBERITZ, M.; WENTZENSEN, N.; BERGERON, C.; ARBYN, M. p16INK4a immunocytochemistry versus HPV testing for triage of women with minor cytological abnormalities: A systematic review and meta-analysis. **Cancer Cytopathology**, Out (120)(5): 294–307. 2012.

RODRÍGUEZ, A. C.; SCHIFFMAN, M.; HERRERO, R.; WACHOLDER, S.; HILDESHEIM, A.; CASTLE, P. E.; SOLOMON, D.; BURK, R. Rapid clearance of human papillomavirus and implications for clinical focus on persistente infections. **Journal of the National Cancer Institute**, Abr (2)(100):513-7. 2008.

ROURA, E.; CASTELLSAGUÉ, X.; PAWLITA, M.; TRAVIER, N.; WATERBOER, T.; MARGALL, N.; BOSCH, F. X.; SANJOSÉ, S.; DILLNER, J.; GRAM, I. T.; TJONNELAND, A.; MUNK, C.; PALA, V., PALLI, D.; KHAW, K. T., BARNABAS, R. V.; OVERVAD, K.; CLAVEL-CHAPELON, F.; BOUTRON-RUAULT, M. C.; FAGHERAZZI, G.; KAKS, R.; LUKANOVA, A.; STEFFEN, A.; TRICHOPOULOU, A.; TRICHOPOULOS, D.; KLINAKI, E.; TUMINO, R.; SACERDOTE, C.; PANICO, S.; BUENO-DE-MESQUITA, H. B.; PEETERS, P. H.; LUND, E.; WEIDERPASS, E.; REDONDO, M. L.; SÁNCHEZ, M. J.; TORMO, M. J.; BARRICARTE, A.; LARRAÑAGA, N.; EKSTRÖM, J.; HORTLUND, M.; LINDQUIST, D.; WAREHAM, N.; TRAVIS, R. C.;

RINALDI, S.; TOMASSINO, M.; FRANCESCHI, S.; RIBOLI, E. Smoking as a major risk factor for cervical cancer and pre-cancer: Results from the EPIC cohort. **International Journal of Cancer**, Jul (135)(2): 453-66. 2014.

SAHASRABUDDHE, V. V.; LUHN, P.; WENTZENSEN, N. Human papillomavirus and cervical cancer: biomarkers for improved prevention efforts. **Future Microbiology Journal**, Set (6)(9): 1083-1098. 2011.

SANJOSÉ, S. WHEELER, C. M.; QUINT, W. G. V.; HUNT, W. C.; JOSTE, N. E. ALEMANY, L.; BOSCH, F. X. Age-specific occurrence of HPV16- and HPV18- related cervical cancer. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, Jul (22)(7): 1313–1318. 2013.

SCHAFFER, K. A. The cell cycle: a review. **Veterinary pathology**, Nov (35)(6): 461–78. 1998.

SCHWARZ, J. K.; LEWIS, J. S.Jr.; PFEIFER, J.; HUETTNER, P.; GRIGSBY, P. Prognostic significance of p16 expression in advanced cervical cancer treated with definitive radiotherapy. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, Set (84)(1): 153–157. 2012.

SERRANO, M.; LIN, A. W.; MCCURRACH, M. E.; BEACH, D.; LOWE, S. W. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. **Cell**, Mar (7)(88):593-602. 1997.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2015. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, Jan-Fev (65)(1): 5-29. 2015

SILVA-FILHO, A. L. Emprego dos marcadores de prognóstico no tratamento para o carcinoma invasor de colo. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetria**, Set (31)(9): 468–73. 2009.

SIMÕES, R. S.; SOARES, J. M. Jr.; SIMÕES, M. J.; BARACAT, E. C. Anatomia descritiva e topográfica do trato genital inferior. In: VALENTE, N. **Patologia do trato genital inferior: diagnóstico e tratamento**. 2ª. ed. São Paulo: Santos, cap. 3, p. 23-31, 2014.

SINGH, N.; ARIF, S. Histopathologic parameters of prognosis in cervical cancer - A review. **International Journal of Gynecological Cancer**, Set-Out (14)(5): 741–750. 2004.

SOLOMON, D.; NAYAR, R. **Sistema Bethesda para citopatologia cervicovaginal**. 2ª. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2005.

SON, S.-M.; NOH, K.; LEE, H.-C.; PARK, Y.-J.; JEONG, E.-H.; KIM, H.-S.; SONG, H. G. Evaluation of p16INK4a, pRb, p53 and Ki-67 expression in cervical squamous neoplasia. **Journal of Biomedical Research**, Set (13)(3): 209–217. 2012.

SONG, S.H.; PARK, H. M.; EOM, D. W.; LEE, N. W.; KIM, A. R.; HUR, J. Y.; LEE, K. W.; PARK, Y. K.; SAW, H. S. The expression of p16 (INK4a) and Ki-67 in relation to high-risk human papilloma viral load and residual disease after conization with positive margins. **International Journal of Gynecological Cancer**, Jul-Ago (17)(4): 858–867. 2007.

STANLEY, M. A. Epithelial Cell Responses to Infection with Human Papillomavirus. **Clinical Microbiology Reviews**, Abr (25)(2):215–222. 2012 .

STEWART, Z. A.; WESTFALL, M. D.; PIETENPOL, J. A. Cell-cycle dysregulation and anticancer therapy. **Trends in Pharmacological Sciences**, Mar (24)(3): 139–145. 2003.

TAJARA, E. H. Ciclo celular. In: FERREIRA, C. G.; ROCHA J. C. **Oncologia molecular**.2ª. ed. São Paulo: Atheneu, cap. 7, p. 95-107, 2010.

TAVASSOLI, F. A.; DEVILEE P. (Eds.): World Health Organization Classification of umours. **Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs**. IARC Press: Lyon 2003.

TEKE, F.; YÖNEU, A.; TEKE, M.; ADANAS, G.; URAKÇI, Z.; TÜRKCU, G.; EREN, B.; INAL, A.; ÜNSAL, M. Evaluation of outcome and prognostic factors in 739 patients with uterine cervix carcinoma: a single institution experience. **Contemporary Oncology**, Maio (19)(2):130–136. 2015.

THE HUMAN PROTEIN ATLAS– [base de dados]. Dictionary- Disponível em: <<http://www.proteinatlas.org/learn/dictionary/normal/cervix,+uterine+1>>, Acesso em: 05 jan 2016.

TNM: **Classificação de tumores malignos**/ Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação-geral de prevenção e vigilância; tradução Ana Lúcia Amaral Eisenberg. – 7ª. ed. – Rio de Janeiro: INCA, 2012. xxv, 325 p.

TOMMASINO, M. The human papillomavirus family and its role in carcinogenesis. **Seminars in Cancer Biology**, Jun (26): 13–21. 2014.

TORNESELLO, M. L.; BUONAGURO, L.; GIORGI-ROSSI, P.; BUONAGURO, F. M. Viral and cellular biomarkers in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia and câncer. **BioMed Research International**, Out (2013): 1-10. 2013.

TOTA, J. E.; CHEVARIE-DAVIS, M.; RICHARDSON, L. A.; DEVRIES, M.; FRANCO, E. L. Epidemiology and burden of HPV infection and related diseases: Implications for prevention strategies. **Preventive Medicine**, Out (53)(SUPPL. 1): S12–S21. 2011.

TSUDA, H.; HASHIGUCHI, Y.; NISHIMURA, S.; KAWAMURA, N.; INOUE, T.; YAMAMOTO, K. Relationship between HPV typing and abnormality of G1 cell cycle regulators in cervical neoplasm. **Gynecologic Oncology**, Dez (91)(3):475-85. 2003.

VAN DE PUTTE, G.; HOLM, R.; LIE, A. K.; TROPÉ, C. G.; KRISTENSEN, G. B. Expression of p27, p21, and p16 protein in early squamous cervical cancer and its relation to prognosis. **Gynecologic Oncology**, Abr (89)(1): 140–147. 2003.

VAN DE PUTTE, G.; KRISTENSEN, G. B.; LIE, A. K.; BAEKELANDT, M.; HOLM, R. Cyclins and proliferation markers in early squamous cervical carcinoma. **Gynecologic Oncology**, Jan (92)(1): 40-6. 2004.

VERMEULEN, K.; VAN BOCKSTAELE, D. R.; BERNEMAN, Z. N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Proliferation**, Jun (36)(3):131–149. 2003.

VOSMIK, M.; LACO, J.; SIRAK, I.; BERANEK, M.; HOVORKOVA, E.; VOSMIKOVA, H.; DRASTIKOVA, M.; HODEK, M.; ZOUL, Z.; ODRAZKA, K.; PETERA, J. Prognostic significance of human papillomavirus (HPV) status and expression of selected markers (HER2/neu, EGFR, VEGF, CD34, p63, p53 and Ki67/MIB-1) on outcome after (chemo-) radiotherapy in patients with squamous cell carcinoma of uterine cervix. **Pathology and Oncology Research**, Jan (20)(1):131–137. 2014.

WAGGONER, S. E. Cervical cancer. **The Lancet Seminar**, Jun (28)(361): 2217-2225. 2003.

WALBOOMERS, J. M.; JACOBS, M. V.; MANOS, M. M.; BOSCH, F. X.; KUMMER, J. A.; SHAH, K. V.; SNIJDERS, P. J.; PETO, J.; MEIJER, C. J.; MUÑOZ, N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **The Journal of Pathology**, Set (189)(1): 12-19. 1999.

WANG, J. L.; ZHENG, B. Y.; LI, X. D.; ANGSTRÖM, T.; LINDSTRÖM, M. S.; WALLIN, K. L. Predictive significance of the alterations of p16INK4A, p14ARF, p53, and proliferating cell nuclear antigen expression. In the progression of cervical cancer. **Clinical Cancer Research**, Abr (10)(7): 2407-14. 2004.

WENG, M.-Y.; LI, L.; FENG, S.-Y.; HONG, S. -J. Expression of Bmi-1, P16, and CD44v6 in Uterine Cervical Carcinoma and Its Clinical Significance. **Cancer Biology & Medicine**, Mar (9)(1):48–53. 2012.

WHITE, E. A.; KRAMER, R. E.; TAN, M. J. A.; HAYES, S. D.; HARPER, J. W.; HOWLEY, P. M. Comprehensive analysis of host cellular interactions with human papillomavirus E6 proteins identifies new E6 binding partners and reflects viral diversity. **Journal of Virology**, Dez (86)(24):13174–13186. 2012.

WITKIEWICZ, A. K.; KNUDSEN, K. E.; DICKER, A. P.; KNUDSEN, E. S. The meaning of p16^{INK4a} expression in tumors functional significance, clinical associations and future developments. **Cell Cycle**, Ago (10)(15): 2497-2503. 2011.

WITTEKINDT, C.; WAGNER, S.; MAYER, C. S.; KLUSMANN, J. P. Basics of tumor development and importance of human papilloma virus (HPV) for head and neck cancer. **GMS Current Topics in Otorhinolaryngology Head Neck Surg**, Dez (11):Doc 09. 2012.

XIE, X.-Z.; SONG, K.; CUIL, B.; JIANG, J.; ZHANG, Y.-Z.; WANG, B.; YANG, X.-S.; KONG, B.-H. Clinical and Pathological Factors Related to the Prognosis of Chinese Patients with Stage I to II Cervical Cancer. **Asian Pacific Journal of Cancer**, (13)(11):5505–5510. 2012.

YANG, H.-J. Aberrant DNA methylation in cervical carcinogenesis. **Chinese Journal of Cancer**, Jan (32)(1): 42-8. 2013.

ZARCHI, M. K.; AKHAVAN, A.; FALLAHZADEH, H.; GHOLAMI, H.; DEGHANI, A.; TEIMOORI, S. Outcome of cervical cancer in Iranian patients according to tumor histology,

stage of disease and therapy. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, (11)(5): 1289–1291. 2010.

ZEFERINO, L. C. O desafio de reduzir a mortalidade por câncer do colo do útero. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Maio (30)(5): 213-215. 2008.

APÊNDICE A - Ficha de coleta de dados

Pontifícia Universidade Católica de Goiás e Associação de Combate ao Câncer em Goiás
 Projeto: **AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE P16INK4A EM CARCINOMAS DE COLO UTERINO**

Prontuário: _____ Data do diagnóstico: ____/____/____
 Nome: _____ Data de nascimento: ____/____/____
 Endereço: _____ Telefone: _____
 Estado civil: (1) Solteiro (2) Casado (3) Outro _____ (4) Não informado
 Escolaridade: (1) Fundamental (2) Ens.Médio (3) Superior (4) Não informado
 Idade à primeira relação sexual: _____ (1) Não informado
 Opção sexual: (1) Homossexual (2) Heterossexual (3) Não informado
 Antecedente câncer: (1) Sim (2) Não (3) Não informado
 Histórico familiar: (1) Sim (2) Não (3) Não informado
 Tabagismo: (1) Sim (2) Não (3) ex-tabagista _____ (4) Não informado
 Frequência: (1) Às vezes (2) Diariamente (3) Não informado
 Quantidade: (1) < 1 maço (2) de 1 a 3 maços (3) > 3 maços
 Etilismo: (1) Sim (2) Não (3) Não informado
 Frequência: (1) Às vezes (2) Diariamente (3) Não informado
 Tipo de bebida: (1) Destilados (2) Fermentado (3) Não informado
 Uso de anticoncepcionais orais: (1) Sim (2) Não (3) Não informado
 Status menstrual: (1) Menacme (2) Menopausa (3) Não informado

DIAGNÓSTICO

Exame ginecológico: ____/____/____

Resultado: _____

Diagnóstico citológico: ____/____/____

Resultado: _____

Diagnóstico por biópsia: ____/____/____ Tipo de biópsia: _____

Resultado: _____

Diagnóstico por cirurgia: ____/____/____

Resultado: _____

Outras informações:

Número do AP a ser analisado: _____ Data do exame: ____/____/____

TRATAMENTO CIRÚRGICO: (1) Sim (2) Não
 TIPO CIRÚRGICO: (1) Conização (2) Histerectomia total (3) Histerectomia Radical
 TRATAMENTO RADIOTERÁPICO: (1) Radioterapia externa (2) Braquiterapia
 TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO: (1) Sim (2) Não
 ESTADIAMENTO CLÍNICO: _____

Tamanho do tumor: _____ (1) Não específico

Extensão da lesão: (1) IA (2) IB (3) IIA (4) IIB (5) IIIA

(6) IIIB (7) IVA (8) IVB (9) Não especificado

Comprometimento linfonodal: (1) NX (2) NO (3) N1, LN comprometidos _____

Local: _____

Metástase: (1) MX (2) MO (3) M1,

Local: _____

DADOS ANATOMO PATOLÓGICOS

Tipo histológico: (1) Ca Escamoso (2) Adenocarcinoma (3) Adenoescamoso

(4) Outros _____

Grau tumoral _____ Índice mitótico _____

Levantamento da quantidade de biópsias e características das peças:

EVOLUÇÃO DO PACIENTE:

(1) Viva, sem evidência de doença, último seguimento ____/____/____.

(2) Viva, com evidência de doença, último seguimento ____/____/____.

(3) Óbito, data ____/____/____.

Coletado por: _____, em ____/____/____.

1 - Objetivo	84
2 - Definições	84
3 - Materiais e Métodos	84
4 - Procedimento	87
5 - Resultados	89
6 - Registro e Interpretação de resultados	90
7 - Bibliografia	90

1. OBJETIVO:

Este procedimento destina-se a coloração de cortes histológicos utilizando o método da imunoperoxidase associada a polímeros.

DEFINIÇÕES:

IHQ – Imunohistoquímica. O processo de identificar antígenos nos tecidos com anticorpos, através de secção corada.

EPI - Equipamento de proteção individual.

2. MATERIAIS E MÉTODOS:

3.1. Equipamentos/ materiais permanentes:

- Balcão com pia para bateria de coloração e demais procedimentos técnicos
- Armário para armazenamento de reagentes químicos
- Armário-arquivo para as lâminas
- Capela para exaustão de vapores/gases
- Estufa para secagem/esterilização (50° - 200° C)
- Microscópio óptico comum binocular
- Balança analítica eletrônica
- pHmetro
- refrigerador comum
- freezer comum
- panela de pressão elétrica (capacidade 5l ou mais)
- pipetas automáticas (de volumes ajustáveis)
- bandejas de coloração/ incubação
- cubas de vidro/ racks para lâminas
- tubos de ensaio 10 ml
- estante pra tubos de ensaio
- proveta 1000 ml
- Becker 1000 ml

3.2. Materiais consumo

- Lamínulas 24x50 mm

- Ponteiras
- Pissetas 500 ml- 2 unidades
- Papel absorvente

3.3. Reagentes para IHQ

- Água MiliQ
- Álcool absoluto
- Xilol
- Hidróxido de sódio p.a.
- Cloreto de sódio p.a.
- Fosfato de sódio dibásico e dihidratado
- Fosfato de sódio monobásico e monohidratado
- Ácido cítrico monohidratado
- Albumina bovina fração V
- Hematoxilina de Harris
- Entellan
- Água oxigenada 10 volumes
- Proteinase K
- Azida sódica
- Hidróxido de amônia
- Kit de revelação (escolher a opção que contenha bloqueador de proteínas, pós-primário ou complemento, polímero, cromógeno DAB e o substrato para DAB.)

3.4. Soluções para IHQ:

Solução mãe PBS

Em 1 litro de água diluir:

Fosfato de sódio dibásico dihidratado -----	30,77g
Fosfato de sódio monobásico monohidratado -----	4,86g
Cloreto de sódio P.A.-ACS -----	160g

➤ Solução 20 vezes concentrada (diluir em 1 litro)

Solução Albumina 1%:

Soroalbumina bovina (BSA) fração V-----	0,5g
---	------

Azida sódica p.a. (NaN_3) -----0,05g

Tampão PBS q.s.p. -----50ml

- A azida sódica, aqui empregada como preservativo, deve ser manuseada com precaução, pois é muito tóxica se ingerida e forma um composto altamente explosivo quando em contato com alguns metais.
- Não utilizar soluções contendo azida sódica para diluir reagentes conjugados com peroxidase, pois, esta é inativada na presença dessa substância.

Solução DAB

Conforme bula de kit comercial (Leica):-----50 μl de substrato por ml

- Pingar 100 μl do DAB pronto em cada lâmina.
- Outros kits ----- gota de DAB por ml de substrato
- A cor ideal do DAB é o marrom forte (se estiver claro não funciona bem).
- A diaminobenzidina é um possível agente carcinogênico. Ao manipulá-lo usar luvas de borracha; estocar dentro de dessecador em freezer.

Solução tampão citrato 10mM/pH 6,0

Ácido cítrico monohidratado p.a. -----2,1g

Água destilada q.s.p. -----1000,0 ml

- Dissolver e acertar o pH com solução NaOH 2N.

3.5. Desinfecção de bancadas e acessórios:

- As lâminas são armazenadas no armário arquivo, os reagentes no armário de reagentes, os anticorpos no freezer e o tampão PBS na geladeira.
- A bancada deve estar limpa antes de iniciar o procedimento e após finalizar. A ordem das cubas não deve ser alterada e não devem ser realizados outros procedimentos na mesma bancada. Todos os materiais utilizados devem ser guardados nos devidos lugares. As ponteiros devem ser novas a cada procedimento.
- Ligar o sistema de exaustão da sala de coloração antes de iniciar o procedimento.
- Verificar periodicamente a validade das substâncias químicas utilizadas.
- Quebra de lâminas durante o processamento deverá ser notificado no caderno de registro de incidentes técnicos.

3.6. EPI:

- **Luvas, máscara, jaleco e procedimentos simples como lavar as mãos:** São obrigatórios e de fundamental importância antes e após a manipulação de reagentes biológicos, alguns reagentes necessitam de cuidados especiais por serem possíveis agentes carcinogênicos. Utilizar durante todo o procedimento.

4. PROCEDIMENTO:

4.1 – Preparação dos cortes histológicos

DESPARAFINIZAÇÃO

1. Xilol (a temperatura ambiente) 3x -----(5 a 10 min)

REIDRATAÇÃO

2. ETOH 100% 3x----- (2 min)
3. ETOH 80%----- (2 min)
4. ETOH 50%----- (2 min)
5. Lavar em água corrente

4.1 – Bloqueio da peroxidase endógena

Procede-se ao bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 3% em metanol (ou solução comercial a 3% = 10 volumes), em um banho de 5 minutos ou mais; seguem-se lavagens em água corrente e colocar na solução que já deve estar aquecendo na panela de pressão.

6. H_2O_2 (10 volumes) 3% ----- (5 min)

4.2 - Recuperação antigênica

7. Enzima (proteinase K) ----- (10 a 15 min)
8. Ácido cítrico (10mM) (4,2g)
Água destilada 2l
9. NaOH (2N) corrigir o pH (6,0)

INCUBAÇÃO EM CALOR ÚMIDO – as lâminas são incubadas em tampão citrato 10mM/pH 6,0 em panela de pressão, durante 7 minutos após resfriamento por 20 minutos, seguem-se lavagens em água corrente..

- 10. Panela de pressão -----(7 min)
- 11. Resfriar -----(20 min)

4.3 - Diluição do anticorpo primário

- 12. Albumina 0,5% diluída em PBS
- 13. Titulação

4.4 – Reação utilizando o complexo de polímeros sintéticos

- 14. Lavar em água corrente
- 15. Colocar em bandeja com fundo de água
- 16. Molhar lâminas com PBS
- 17. Secar lâminas
- 18. Pingar bloqueador de proteína -----(5 a 10 min)
- 19. Pingar anticorpo primário (200 μ L)
- 20. Tampar bandejas e colocar na geladeira -----(**overnight**)

- 21. Lavar em água corrente e escorrer
- 22. Molhar com tampão PBS
- 23. Secar lâminas
- 24. Pingar pós primário (tampar bandeja) -----(30 min)
- 25. Lavar em água corrente e escorrer
- 26. Molhar com tampão PBS
- 27. Secar lâminas
- 28. Pingar Polímero (tampar bandeja) -----(30 min)
- 29. Lavar em água corrente e escorrer
- 30. Molhar com tampão PBS

4.5 - Revelação

PREPARAR O DAB (diaminobenzidina é um possível agente carcinogênico, ao manipulá-lo usar luvas)

31. Pingar o DAB pronto em cada lâmina (100µl) -----(5 a 10 min)
32. Lavar em água corrente e escorrer
33. Colocar em cesta e lavar bem
34. Colocar em cuba de Hematoxilina para contracorar
35. Lavar em água corrente (até limpar o contracorante)
36. Imergir 3 a 4 vezes (rapidamente) a cesta na água amoniacal
37. Lavar em água corrente

4.6 - Desidratação

38. ETOH 100% 4x------(2 a 3 min)
39. Xilol 2x------(enquanto estiver montando)

4.7 - Montagem

40. Pingar 1 gota de Entellan em cada lamínula
41. Pingar uma gota de xilol da lâmina a ser montada no Entellan e colar (virada para baixo)
42. Pressionar uma contra a outra e secar a lâmina
43. Se houver bolhas, retirar
44. Mergulhar no xilol e deixar secar apoiada na cuba
45. Colocar na bandeja de madeira
46. Confeccionar etiquetas e colar

- Importante: lavar bandejas com água e sabão (esfregar com bucha, para não ficar restos de DAB), em seguida deixar de molho com Hipoclorito de sódio (NaClO) e enxaguar.

Observação 1: esse protocolo é baseado na utilização do kit de revelação da Leica, Novo Link.

5. RESULTADOS

As lâminas coradas serão avaliadas quanto à expressão dos marcadores empregados, utilizando microscópio óptico comum, por um patologista.

6. REGISTRO E INTERPRETAÇÃO DE RESULTADOS

Os blocos de parafina são selecionados através do Setor de Anatomia Patológica (SAP) do Hospital Araújo Jorge, levando em consideração a disponibilidade de material, após a seleção é realizado o processamento técnico, onde são feitos cortes histológicos e estes são fixados em lâminas, a relação das lâminas recebidas para coloração por IHQ são registradas em planilha no ato do recebimento, os resultados gerados são registrados em livro ATA pelo próprio colaborador e as conclusões finais na planilha de recebimento.

Após a IHQ, caso não ocorra coloração, avaliar a estocagem e manuseio dos anticorpos e a quantidade de líquidos nas lâminas no overnight deverão ser revisadas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Jesus, Lázaro Wender Oliveira. “Imunocitoquímica.” *Biologia celular: bases moleculares e metodologia de pesquisa/ organizador*. Org. Fábio Siviero. 1ª ed. São Paulo: Roca, 2013. 137–170. Print.

Santos, Raimunda Telma M.; Wakamatsu, Alda; Kanamura, Cristina T.; Nonogaki, Suely; Pinto, Glauce Aparecida. “procedimentos laboratoriais em imuno-histoquímica e hibridização ‘in situ’.” *Manual de imunohistoquímica*. Org. Vassalo J Alvez VAF, Bacchi C. 1ª ed. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999. 237–259. Print.

APÊNDICE C - Ficha de avaliação imuno-histoquímica

Ficha de avaliação Imuno-histoquímica _ Projeto: Avaliação da expressão de p16INK4a em carcinomas de colo uterino

Nº biópsia: _____ Nº amostra: _____ Data reação: _____

Análise descritiva da marcação de p16:

() focal () difusa

Análise quantitativa da marcação de p16:

() coloração nuclear células marcadas _____ células avaliadas _____
 () coloração citoplasmática células marcadas _____ células avaliadas _____

Tipo histológico:

Grau Histológico:

Intensidade da coloração:

() Ca escamoso

() Gx

() 1-negativo

() Adenocarcinoma

() GI

() 2- fraca

() Adenoescamoso

() GII

() 3- moderada

() GIII

() 4- forte

Nº de núcleos corados:

() -, negativo

() +, coloração positiva em 10 - 40% das células tumorais

() ++, coloração positiva em 41 - 50% das células tumorais

() +++, coloração positiva na >50% das células tumorais

Observação:

ANEXO A- Parecer consubstanciado do CEP

ASSOCIAÇÃO DE COMBATE
AO CÂNCER EM GOIÁS -



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE DE MARCADORES MOLECULARES E DISTRIBUIÇÃO GENOTÍPICA DO HPV EM TUMORES ASSOCIADOS AO VÍRUS

Pesquisador: VERA APARECIDA SADDI

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 13580613.5.0000.0031

Instituição Proponente: ASSOCIAÇÃO DE COMBATE AO CÂNCER EM GOIÁS

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE GOIÁS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 272.288

Data da Relatoria: 04/04/2013

Apresentação do Projeto:

Trata-se de pesquisa acadêmica, fomentada pela FAPEG, visando analisar (retrospectivamente) dados de cerca de 500 prontuários de pacientes portadores de CEC de vulva, cabeça e pescoço e anus. Também visa análise de blocos de parafina para identificação de presença e tipo de HPV.

O estudo proposto é retrospectivo, analítico e visa determinar a prevalência do genoma do HPV e a distribuição genotípica do vírus em grupos de pacientes com carcinomas cervicais (200 casos), de vulva e vagina (100 casos), carcinomas anais (100 casos) e carcinomas de cavidade oral e orofaringe (100 casos). Os casos incluídos deverão ser aqueles diagnosticados no Hospital Araújo Jorge, a partir de 2005, que apresentem dados clínicos e histopatológicos satisfatórios, blocos de parafina disponíveis no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Araújo Jorge e seguimento mínimo de cinco anos. A seleção será feita a partir de uma busca ativa nos livros de registros dos exames realizados no Setor de Anatomia Patológica do Hospital Araújo Jorge, com os diagnósticos histopatológicos já especificados. O período de inclusão deve se iniciar a partir de 2005, até atingir o número de casos estabelecidos para cada um dos grupos. As lâminas coradas pela hematoxilina-eosina de cada exame anátomo-patológico serão revisadas e os casos selecionados de acordo com o diagnóstico histológico confirmado. Os blocos de parafina, correspondentes às lâminas revisadas, serão selecionados para as análises moleculares. A detecção e a genotipagem

Endereço: 239

Bairro: SETOR LESTE UNIVERSITÁRIO

CEP: 74.605-070

UF: GO

Município: GOIÂNIA

Telefone: (62)3243-7050

Fax: (62)3243-7050

E-mail: cepaccg@accg.org.br

ASSOCIAÇÃO DE COMBATE AO CÂNCER EM GOIÁS -



Continuação do Parecer: 272.288

do HPV serão realizadas no Laboratório de Transplante de Medula Óssea/Laboratório de Radiobiologia e Oncogenética da Associação de Combate ao Câncer em Goiás e Laboratório de Genética e Biodiversidade da PUC-Goiás. Os tipos de HPV serão classificados em baixo e alto risco oncogênico com base no padrão filogenético, conforme a classificação proposta pela The International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). As análises imuno-histoquímicas serão realizadas no Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital Araújo Jorge.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Determinar a distribuição genotípica do HPV e as possíveis associações entre características clínico-patológicas, prognósticas e moleculares dos tumores associados ao vírus (carcinomas cervicais, de vulva, vagina, anus, cavidade oral e orofaringe).

Objetivo Secundário: - Identificar os tipos específicos de HPV detectados nos diferentes tumores associados ao vírus (carcinomas cervicais, de vulva, vagina, anus, cavidade oral e orofaringe). - Descrever os principais aspectos clínico-patológicos e prognósticos nos tumores associados ao HPV. - Avaliar a expressão imuno-histoquímica de Ki-67 e p16 nos tumores associados ao HPV. - Avaliar as possíveis associações entre os achados de detecção e genotipagem do HPV com os fatores clínico-epidemiológicos e moleculares dos tumores avaliados. - Avaliar o impacto dos diferentes genótipos do HPV no prognóstico dos pacientes com dos tumores associados ao vírus. - Produzir dados de prevalência e distribuição genotípica do HPV capazes de prever o impacto das vacinas na epidemiologia dos cânceres associados ao vírus.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Sem riscos relevantes.

Benefícios através do conhecimento de dados da prevalência de HPV entre portadores de CEC de vulva, anus, cabeça e pescoço, podendo implementar ou mudar o uso de vacinas contra HPV.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um importante projeto com potencial de elucidar lacunas científicas relevantes sobre o papel do HPV em CEC de anus, vulva e cabeça e pescoço.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados às exigências do CEP

Aparentemente, nada faltando

Pedem dispensa do TCLE (e estou de acordo)

Endereço: 239

Bairro: SETOR LESTE UNIVERSITÁRIO

CEP: 74.605-070

UF: GO

Município: GOIÂNIA

Telefone: (62)3243-7050

Fax: (62)3243-7050

E-mail: cepaccg@accg.org.br

**ASSOCIAÇÃO DE COMBATE
AO CÂNCER EM GOIÁS -**

Continuação do Parecer: 272.288

Recomendações:

Sem recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sugiro aprovação do projeto

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Parecer do relator acatado.

Estudo aprovado.

GOIANIA, 14 de Maio de 2013

Assinador por:

**Adriano Augusto Peclat de Paula
(Coordenador)**

Endereço: 239

Bairro: SETOR LESTE UNIVERSITÁRIO

CEP: 74.605-070

UF: GO

Município: GOIANIA

Telefone: (62)3243-7050

Fax: (62)3243-7050

E-mail: cepacog@accg.org.br