

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ**

**FERNANDA VILLAR FONSECA**

**MARCADORES “CLÍNICOS” RELACIONADOS COM  
EVOLUÇÃO “DESFAVORÁVEL” EM NEOPLASIAS  
INTRA-EPITELIAIS CERVICAIS TRATADAS POR  
CONIZAÇÃO**

**Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Cirurgia da  
Pontifícia Universidade Católica do  
Paraná, como requisito parcial para  
obtenção do grau de mestre.**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Flavio Daniel S. Tomasich**

**CO-ORIENTADOR: Prof  Dr  Juliana Elizabeth Jung**

**CURITIBA  
2011**

FONSECA – Fernanda Villar.// *Marcadores clínicos relacionados com evolução desfavorável*

*em neoplasias intra-epiteliais cervicais tratadas por conização.*//

Curitiba, 2011.// 68p.// (Dissertação Mestrado – Curso medicina)

Cirurgia – Pontífica Universidade Católica do Paraná

Orientador: Flávio Daniel S. Tomasich

Descritores: 1. Neoplasia intra-epitelial cervical 2. Conização 3.

*AO MEU MARIDO E À MINHA  
FAMÍLIA, QUE SEMPRE ME APOIARAM EM  
TODOS OS MOMENTOS, AJUDANDO-ME A  
CHEGAR A ESTE PONTO DO CAMINHO...*

*AO MEU FILHO, QUE ESPERO  
SEMPRE TENHA MUITO ORGULHO DE SUA  
MÃE...*

## AGRADECIMENTOS

Ao **meu orientador, Prof. Dr. Flávio Daniel S. Tomasich**, que ofereceu sempre sua amizade, perseverança e inestimável opinião crítica e construtiva para o sucesso deste trabalho.

À **minha co-orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Juliana Elizabeth Jung**, que com muita atenção e gentileza, acolheu-me e muito contribuiu para o meu crescimento.

Ao **meu marido, Luiz Claudio Sobrinho do Nascimento**, que socorreu-me em muitos dos momentos, quando tudo parecia ruir.

Ao **meu amigo Carlos Afonso Maestri**, meu maior incentivador neste projeto e no meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Ao **Prof. Dr. Sergio Ossamu Ioshii**, que com toda cordialidade e amizade abriu as portas do seu laboratório para permitir a realização deste trabalho.

Às **Biólogas do laboratório de Patologia da PUC, Ana Paula Camargo e Marina L.V. Azevedo** e aos **técnicos Maurício de Oliveira e Maria Angelina Anastácio**, que colaboraram de forma cuidadosa e dedicada a este projeto.

À **Prof<sup>a</sup> Dra Maria de Lourdes Pessole Biondo-Simões**, professora dedicada e exigente, que emprestou seu senso crítico a este trabalho.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, participaram da elaboração deste trabalho, contribuindo para sua conclusão.

*“ Não podemos voltar atrás e fazer  
um novo começo. Mas sempre podemos  
começar de novo e fazer um novo fim...”*

*Chico Xavier*

Curitiba, 09 de Março de 2010.

Fernanda Villar Fonseca  
**Pesquisadora Responsável**

Prezada Pesquisadora,

Gostaríamos de informar que o projeto de pesquisa intitulado como: **“Correlação de dados clínicos e imunohistoquímicos por p16 (INK4A) e p53, de pacientes submetidos a conização cirúrgica por neoplasia intra-epitelial de alto grau de colo uterino, com evolução clínica desfavorável”**, cujo número de protocolo é **P.P. nº 1947** e tem como pesquisador responsável V. Sa., foi avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa no dia 09 de março de 2010 e **foi aprovado** sem restrições.

Sem mais agradecemos a atenção e colocamo-nos a disposição para maiores esclarecimentos.

Atenciosamente,

**Coordenador do CEP**

**Dr. Jordan Zanetti Silva**

---

**Membros do CEP:**

Andrei Leite de Moraes - Médico	Jordan Zanetti Silva - Médico
Ariovaldo Donizetti de Abreu - Fisioterapeuta	Jose Carlos Wiederkehr – Administrador de Empresas
Clarice Nana Yamanouchi - Médica	Luiz Antonio Negrão Dias - Médico
Edenice de Oliveira Santana - Enfermeira	Márcia Bobak - Enfermeira
Fabício Martinelli de Oliveira - Médico	Marina Lopes Carlos - Nutricionista
Flávia Martignago - Nutricionista	Ricardo Isaias Testoni - Enfermeiro
Geovana Cristina S.Sylvestre - Enfermeira	Rodrigo Leite de Moraes - Médico
Iolanda de Assis Galvão	Timóteo Borges de Campos – Membro da comunidade.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>04</b>
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>05</b>
3.1 A NEOPLASIA INTRA-EPITELIAL CERVICAL.....	10
3.2 FATORES DE RISCO PARA NEOPLASIAS INTRA-EPITELIAIS CERVICAIS.....	12
3.2.1 Tabagismo.....	12
3.2.2 Hormonioterapia.....	14
3.2.3 Soropositividade para HIV.....	15
3.3 O MANEJO DA NEOPLASIA INTRA-EPITELIAL CERVICAL.....	16
3.4 A RECORRÊNCIA OU PERSISTÊNCIA DE NEOPLASIA INTRA-EPITELIAL CERVICAL.....	17
3.5 O PAPEL DA TECNOLOGIA NO RASTREAMENTO E SEGUIMENTO DA NEOPLASIA INTRA-EPITELIAL CERVICAL.....	18
3.5.1 A Proteína supressora tumoral p16.....	23
3.5.2 A Proteína p53.....	25
<b>4 MÉTODO.....</b>	<b>27</b>
4.1 SELEÇÃO DA AMOSTRA.....	27
4.2 DA ANÁLISE DOS DADOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	28
4.3 DA TÉCNICA DE CONIZAÇÃO.....	28
4.4 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DAS PEÇAS DE CONIZAÇÃO.....	30
4.5 TÉCNICA DE PREPARO DAS LÂMINAS PARA REALIZAÇÃO DA IMUNOHISTOQUÍMICA .....	31
4.6 LEITURA DOS IMUNOMARCADORES.....	33
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	36
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>37</b>

<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>45</b>
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>55</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>56</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>64</b>
<b>GLOSSÁRIO.....</b>	<b>65</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>67</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>XII</b>

## ABREVIATURAS

ALTS – ASCUS- LSIL Triage study

ASCUS - Atypical squamous cells of undetermined significance

CAF – Cirurgia de Alta Frequência

CO – Citologia oncológica

DST – Doença de Transmissão Sexual

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

HPV- Human Papillomavirus

HSV – Herpes Simplex virus

IARC – International Agency for Research on Cancer

IVA – Inspeção visual com ácido acético

LCR – Long coding region

LEETZ – Loop Electrosurgical Excision Procedure

LSIL – Low grade squamous intraepithelial lesion

NIC – Neoplasia Intra-epitelial Cervical

OMS – organização Mundial de Saúde

OR – ODDS ratio

P53 – proteína supressora tumoral p53

P16 – proteína supressora tumoral p16

PCR – Polymerase Chain reaction

SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – DADOS EPIDEMIOLÓGICOS NOS GRUPOS.....	37
TABELA 2- DOENÇAS PRÉ-EXISTENTES NOS GRUPOS.....	38
TABELA 3 – DADOS DO TRATAMENTO E RESULTADOS ANÁTOMO-PATOLÓGICOS.....	39
TABELA 4- ANÁLISE DOS IMUNOMARCADORES.....	41

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática do vírus do HPV.....	08
Figura 2- Espécime cirúrgico obtido por conização por CAF.....	29
Figura 3- Espécime cirúrgico obtido por técnica de conização clássica.....	30
Figura 4- Representação histológica de NIC/ carcinoma invasor do colo uterino (da esquerda para a direita: NIC 1, NIC3, Carcinoma invasor).....	31
Figura 5- Reação negativa para p16 em aumento de 10 e 40x.....	34
Figura 6- Reação positiva por p16 forte e difusa, corando núcleo e citoplasma, em aumento de 10 e 40x.....	34
Figura 7 - Reação negativa para p53 em aumento de 10 e 40x.....	35
Figura 8- Reação positiva, forte e difusa, para p53, em aumento de 10 e 40x....	35
Figura 9- Análise das margens excisionais no produto de conização.....	40
Figura 10 – Avaliação da positividade do p53 nos grupos.....	41
Figura 11 – Avaliação da positividade do p16 nos grupos.....	42
Figura 12 - Avaliação da expressão da p53 conforme o grau da NIC.....	43
Figura 13- Avaliação da expressão da p16 conforme o grau da NIC.....	43

## RESUMO

**Objetivo:** avaliar o risco de vários fatores clínicos de predizer doença persistente ou recorrente, após tratamento de neoplasia intra-epitelial cervical (NIC) por conização e o significado clínico da expressão da p53 e da p16<sup>INK4a</sup> nestes tumores. **Métodos:** estudo retrospectivo de pacientes tratadas de NIC 2 e 3 de colo uterino por conização, no período de janeiro de 1999 a janeiro de 2006. Análise estatística uni e bivariada, usando teste de proporções (qui-quadrado) e valor  $p \leq 0.05$ . **Resultados:** 113 pacientes, com idade entre 16 e 86 anos ( $35 \pm 11.7$ ), sendo 48 pacientes com recorrência ou progressão da doença (grupo estudo) e 65 com cura clínica (grupo controle). O índice de recorrência foi de 14.6%. Somente margens excisionais comprometidas por lesão foram preditores de recorrência/progressão ( $p < 0.05$ ). Os marcadores biológicos p53 e p16 INK4a não estiveram relacionados à evolução desfavorável, entretanto a expressão de ambos foi significativamente maior na NIC 3 e carcinoma invasor que na NIC 1 e NIC 2. **Conclusão:** a recidiva ou persistência de NIC 2 e 3 foi estatisticamente relacionada com margens excisionais comprometidas do produto de conização e os biomarcadores p16<sup>INK4a</sup> e p53 não foram preditores de evolução desfavorável da NIC tratada mas apresentam alto valor preditivo negativo.

Descritores: neoplasia intraepitelial cervical, conização, recorrência, marcadores biológicos.

## 1 INTRODUÇÃO

Com aproximadamente 500 mil casos novos por ano no mundo, o câncer do colo do útero é o segundo tipo de câncer mais comum no sexo feminino. É o responsável pelo óbito de até 250 mil mulheres ao ano e cerca de oitenta por cento dos casos acontecem em países subdesenvolvidos<sup>1</sup>. Esse tipo de câncer ainda permanece como um dos maiores problemas de saúde pública em países em desenvolvimento, especialmente na América Latina e Caribe<sup>2</sup>. Apesar dessa doença ser passível de prevenção, os esforços coletivos, de maneira global, para implementar programas de rastreamento ainda não têm reduzido, com sucesso, a mortalidade pela doença, principalmente na região das Américas<sup>2</sup>.

No século passado, o câncer do colo de útero era o líder de mortalidade entre mulheres nos Estados Unidos da América. Esse índice têm se reduzido pela metade nos últimos vinte anos. Isso se deve, em grande parte, aos efetivos programas de rastreamento com citologia oncótica por Papanicolaou e ao adequado tratamento de sua lesão precursora, a neoplasia intra-epitelial cervical grau 3 (NIC 3) ou carcinoma *in situ* do colo uterino<sup>3</sup>.

Em contrapartida, a América Latina e o Caribe, têm, ainda hoje, uma das mais altas taxas de incidência e de mortalidade do mundo, sendo superadas apenas pelo leste Africano e a Melanésia<sup>2</sup>.

O câncer do colo uterino apresenta-se como problema de saúde pública também no Brasil, sendo o segundo câncer mais prevalente na mulher brasileira, suplantado apenas pelo câncer da mama e apresenta uma incidência de 18430 casos novos ao ano, com 4800 mortes ao ano<sup>4</sup>.

Apesar do Brasil ser considerado, hoje, a oitava economia do mundo, seus investimentos em saúde continuam sendo objetivos não prioritários e, conseqüentemente, a cada minuto, morrem muitas mulheres por diagnóstico tardio desse tipo de câncer, mesmo sendo ele passível de prevenção com medidas simples e baratas.

Sua incidência e mortalidade estão relacionadas à pobreza, à dificuldade de acesso aos serviços de saúde, à vivência em área rural e ao baixo nível sócio-

educacional, fazendo com que mais de 600 mulheres morram todos os dias, principalmente em países em desenvolvimento<sup>2</sup>.

A incidência desse tipo de câncer torna-se evidente na faixa etária compreendida entre os 20 e os 29 anos e o risco aumenta rapidamente, até atingir seu pico na faixa etária entre os 45 e os 49 anos<sup>4</sup>.

Para o surgimento deste tipo de câncer é necessária a presença da infecção pelo vírus do papilloma humano (HPV). A maioria absoluta dos casos de câncer do colo uterino é causada por um dos tipos oncogênicos do HPV, sendo os mais comuns o 16 e o 18. Outros fatores que contribuem para a etiologia desse tumor são o tabagismo, a baixa ingestão de vitaminas, a multiplicidade de parceiros sexuais, a iniciação sexual precoce e o uso de contraceptivos orais<sup>4</sup>.

A descoberta das lesões precursoras de maior risco e uma logística adequada para seu tratamento, além de medidas abrangentes para a prevenção da infecção transformante pelo HPV, podem ser o caminho mais adequado para atingir um objetivo maior: evitar a morte prematura de tantas mulheres .

Redução de cerca de 80% da mortalidade pode ser alcançada com o rastreamento de mulheres na faixa etária de risco e pelo tratamento das lesões precursoras com alto potencial de malignidade<sup>4</sup>.

Programas de rastreamento baseados na citologia oncológica têm sido introduzidos em muitos países. Quando esses programas são organizados de forma que o rastreamento consiga abranger mulheres na faixa etária de risco, promovendo o seu seguimento adequado e o tratamento sistemático das lesões precursoras, têm demonstrado grande efetividade na redução da doença invasora<sup>5</sup>.

Apesar de resultados tão promissores dos programas de prevenção, e do exame de citologia oncológica por Papanicolaou ser altamente efetivo no diagnóstico precoce e na prevenção do câncer invasivo do colo do útero, as taxas de mortalidade e incidência mantêm-se entre as mais elevadas dentre os tumores malignos que ocorrem nas mulheres brasileiras. Isso se deve principalmente pela baixa cobertura populacional, não atingindo de forma efetiva a população de maior risco, além das limitações inerentes ao teste em si, incluindo-se sua sensibilidade moderada a baixa<sup>6</sup>.

Frequentemente, as discussões estão focadas em qual tipo de teste utilizar nos programas de rastreamento (citologia, teste de DNA para HPV e outros) que

possam se adequar à realidade dos países em desenvolvimento. Escolher um teste efetivo é apenas um dos aspectos do programa de prevenção. A maior e mais desafiadora tarefa é a organização e a execução de programas como esse. Entretanto, testes de rastreamento que necessitem de avaliações repetitivas para o diagnóstico e tratamentos cuja logística possam ser difíceis, podem ser mais uma barreira para o seu uso em grandes populações<sup>5</sup>.

Atualmente existem testes moleculares que detectam o DNA ou o RNA do HPV. No entanto, ainda se discute amplamente o tipo e o formato desses testes e sua utilização em números expressivos de forma efetiva e sustentável. Dificuldades na interpretação de seus resultados, na sua utilização na prática clínica diária e no contexto do rastreamento primário ou secundário do câncer do colo uterino faz-se frequente<sup>6</sup>.

Destacam-se, neste contexto, os esforços para a introdução de novas metodologias de rastreamento, sobretudo em países com poucos recursos financeiros. É incessante e intensa a busca atual por marcadores tumorais capazes de, especificamente, atribuir riscos diferenciados aos tumores associados ao HPV<sup>6</sup>.

O presente estudo busca os dados epidemiológicos, anátomo-patológicos e biomoleculares que possam sinalizar quais são as pacientes com maior risco de evolução desfavorável (persistência e/ou recorrência) da lesão precursora do câncer cervical e a progressão para o carcinoma invasor, determinando o real prognóstico das mesmas e podendo adequar estratégias de prevenção mais efetivas.

## 2 OBJETIVOS

Avaliar a expressão dos biomarcadores p16<sup>INK4a</sup> e p53, nas peças de conização de pacientes com diagnóstico de neoplasia intra-epitelial do colo uterino, utilizando a imuno-histoquímica, em microarranjos teciduais, correlacionando a evolução clínica das pacientes com a expressão imunohistoquímica destes marcadores e avaliando a sua aplicabilidade clínica na evolução desfavorável (persistência e/ou recorrência) da neoplasia intra-epitelial cervical tratada por conização.

Avaliar os dados epidemiológicos de relevância clínica e os dados anátomo-patológicos do espécime cirúrgico, correlacionando-os com a evolução das pacientes.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

Estudos epidemiológicos e moleculares desenvolvidos nos últimos 30 anos levaram ao reconhecimento de certos tipos do *Human Papillomavirus* (HPV) como agente etiológico do câncer cervical. Cerca de metade dos tipos de HPV conhecidos, incluindo suas variantes, têm sido isolados nas mucosas genitais. A associação de alguns tipos de HPV primariamente com tecidos normais e lesões benignas, assim como de tipos associados ao câncer, levaram ao conceito de HPV de baixo e alto risco oncogênico, respectivamente<sup>7</sup>.

Classificados entre os mais potentes carcinógenos em humanos, os HPV de alto risco oncogênico são considerados, atualmente, os responsáveis por, pelo menos, 5% de todos os cânceres no mundo (câncer de colo uterino, genitália externa, ânus, pênis e orofaringe), proporção esta que chega a 15% dos cânceres em mulheres que vivem em países em desenvolvimento, afetando também proporções consideráveis dos homens<sup>6</sup>.

Muñoz e Bosch, em sua metanálise, concluíram sobre as fortes evidências da associação entre a presença do HPV e o câncer do colo uterino. Segundo eles, vários estudos epidemiológicos usando métodos de hibridização para o DNA-HPV, evidenciaram a relação causal do HPV com a doença cervical. Concluíram também sobre a relação dose-resposta do aumento da carga viral com o risco desse câncer e sobre as evidências indiretas que sugeriam a detecção do DNA-HPV em células cancerígenas como um bom marcador da infecção por HPV, acontecendo antes do desenvolvimento da neoplasia invasora<sup>8</sup>.

Combinando os dados de seu estudo com estudos prévios, Walboomers *et al.* concluíram que a prevalência mundial do HPV no carcinoma do colo uterino é de 99,7% e sua presença em virtualmente todos os cânceres do colo uterino implica numa das maiores prevalências de um fator causal atribuído a qualquer câncer humano<sup>9</sup>.

Os HPV de alto risco oncogênico expressam proteínas oncogênicas que interferem com as funções do crescimento celular. Como consequência da

contínua expressão do genoma viral na célula, a instabilidade cromossômica pode acontecer, levando à completa transformação celular<sup>7</sup>.

Estudos indicam que a persistência do HPV de alto risco oncogênico pode determinar a progressão para estágios mais severos da doença cervical, enquanto que a maioria das infecções por HPV é transitória e não parece ser importante na carcinogênese cervical. O risco para a progressão da doença parece estar associado ao ciclo do HPV no hospedeiro<sup>7,8,9,10,11</sup>. A história natural do HPV no hospedeiro humano apresenta alguns pontos ainda não totalmente elucidados. A infecção por HPV é muito comum entre mulheres jovens, e durante a vida sexual, cerca de 70% das mulheres terão contato e/ou infecção transitória pelo mesmo. Apesar desses altos índices de infecção, poucas mulheres infectadas terão câncer cervical<sup>10</sup>.

Segundo consenso da Organização Mundial de Saúde (OMS), aproximadamente 5 a 15% de mulheres negativas para HPV são infectadas, a cada ano, com algum tipo de HPV de alto risco oncogênico. A incidência dos tipos de alto risco oncogênico tende a ser maior que os de baixo risco. Os subtipos mais frequentes são os 16, 18, 31, 33 e 51; entretanto, um dos tipos mais frequentes entre os estudos é o HPV 16<sup>11</sup>.

Um estudo multicêntrico avaliou a prevalência dos tipos de HPV em mulheres brasileiras, canadenses e norte-americanas entre os 15 e os 25 anos e concluiu que, em média, 26.6% das mulheres apresentam positividade a, pelo menos, um tipo de DNA-HPV. Destas, 80% apresentaram infecção por um tipo oncogênico<sup>12</sup>. O subtipo mais prevalente nos 3 países foi o HPV 16, seguidos pelos tipos 51, 52, 31, 66 e 39 e a infecção por múltiplos tipos foi encontrada em um terço das infecções<sup>12</sup>.

Os índices de infecção por HPV de alto risco tendem a serem maiores entre mulheres jovens do que entre as de mais idade. Alguns estudos avaliados pela OMS sugerem que a persistência da infecção pelo HPV aumente com a idade<sup>11</sup>.

A persistência da infecção por HPV tem implicações para a patogênese da lesão precursora e do câncer invasor<sup>10</sup>. Contudo, mais dados são necessários para esclarecer porque as infecções por diferentes tipos de HPV agem independentemente na cérvix uterina, modificando a resposta imunológica de

forma desigual<sup>11</sup>. Em média, 10% das lesões relacionadas ao HPV no colo uterino progridem para cacinoma *in situ* e 1% para carcinoma invasor<sup>11</sup>.

A média de idade para o diagnóstico de mulheres com lesões precursoras do câncer, na maioria dos países que adotam programas de rastreamento, é de aproximadamente 30 anos. E a idade nas quais se detecta câncer invasivo, tende a ser 10 anos mais tarde, o que sugere um longo tempo para a progressão da lesão pré-cancerosa<sup>11</sup>.

A história natural do câncer cervical, tipicamente, estende-se por um período de 15 a 20 anos e envolve um número de passos críticos, incluindo infecção por HPV, persistência da infecção, progressão para lesão precursora e finalmente desenvolvimento do câncer invasor. Em indivíduos imunocompetentes, o desenvolvimento de infecção por HPV e de neoplasias intra-epiteliais de baixo grau são frequentemente reversíveis e o *clearance* do HPV e a regressão das lesões precursoras frequentemente ocorre<sup>13</sup>.

A ativação da resposta imune do hospedeiro parece ser o ponto determinante entre a resolução da infecção pelo HPV ou a progressão para a doença da cérvix ou do trato anogenital. Enquanto a natureza exata da resposta imune permanece incerta, há evidências da colaboração das células T *helper*, células T citotóxicas e de mecanismos da resposta imune inata. Entretanto, o HPV é capaz de driblar várias funções no mecanismo da resposta imunológica do hospedeiro, transformando-a numa resposta lenta e fraca<sup>13</sup>.

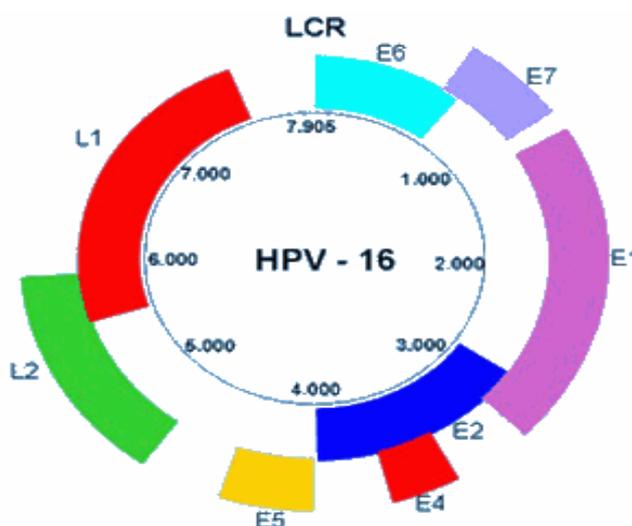
Os vírus podem contribuir para o desenvolvimento de tumores em seres humanos por diferentes mecanismos: indiretamente, por indução de imunossupressão ou induzindo modificações no genoma da célula hospedeira, sem a persistência do DNA viral; diretamente, pela indução de oncoproteínas ou pela alteração da expressão das proteínas da célula hospedeira devida à integração do DNA viral<sup>14</sup>.

A patogênese molecular do câncer causado por HPV de alto risco oncogênico ainda não é totalmente compreendida. Algumas características, entretanto, já são bem evidentes. Esses vírus são auto-suficientes para induzir carcinogênese, apesar da infecção *per se* não ser suficiente para induzir malignidade. A indução de instabilidade cromossômica, de mutações e de aneuploidia em células previamente não proliferativas da camada basal e

suprabasal do epitélio do colo uterino emerge das modificações em genes que controlam a transcrição viral e as funções das oncoproteínas virais<sup>14,15</sup>.

O HPV é um vírus de formato icosaédrico, pertencente à família *Papovaviridae*. O seu genoma está dividido em regiões denominadas *Open Reading Frames (ORF)*, as quais localizam-se em uma mesma fita de DNA e constituem os genes virais. Os três fragmentos subgenômicos na organização do genoma do HPV, até agora identificados, são: região precoce ou E de *early*, região tardia ou L de *late* e região não codificada ou LCR de *long coding region* (figura 1)<sup>7,16</sup>.

Entre os genes indutores de atipia celular, situados na região precoce, destacam-se o E1 e o E2, relacionados com a replicação epissomal e a regulação da transcrição; o E6 e o E7, que inativam o gene produtor das proteínas p53 e pRb, supressoras do crescimento tumoral. Já os genes L1 e L2 estão relacionados à formação do capsídeo viral<sup>7,16</sup>.



Fonte: [www.ipoportomin-saude.pt](http://www.ipoportomin-saude.pt)

Figura 1 – Representação esquemática do vírus do HPV

O gene p53, localizado no cromossomo 17, expressa a proteína p53 que tem a importante função de ativar genes que mantêm a estabilidade do genoma. Na divisão normal da célula, a p53 não é necessária, porém, quando o DNA é de alguma forma lesado, sua função reparadora é induzida, o que lhe confere o título de “guardião do genoma”<sup>16</sup>. Havendo modificação do DNA, a expressão da p53 é

aumentada, ativando a proteína p21, que bloqueia o ciclo celular em G1, para a reparação do DNA. Quando essa reparação não ocorre, a p53 induz a apoptose<sup>16</sup>.

O gene Rb, localizado no cromossomo 13, expressa a proteína pRB, que se une ao fator de transcrição E2F na fase G1 do ciclo celular. Durante o ciclo celular normal, a pRb é fosforilada, liberando E2F. Se a E2F permanecer ativada, por interferência na habilidade da pRb de manter a E2F inativa, fazem com que haja um crescimento desordenado das células<sup>16</sup>.

O genoma do HPV é mantido em sua forma epissomal nas células infectadas, porém, para a progressão da infecção para neoplasia intra-epitelial ou câncer, é preciso a integração ao DNA da célula hospedeira e isso envolve os genes E1 e E2 do vírus, que regulam a expressão viral na célula. Quando o gene E2 é desmembrado, como resultado da integração do genoma viral, altos níveis dos genes E6 e E7 viral são observados. O E1 é responsável pela replicação do genoma viral no hospedeiro<sup>7,14,15</sup>.

Proteínas específicas celulares ligam-se às oncoproteínas E6 e E7 do HPV de alto risco. A oncoproteína E7 se une ao gene de susceptibilidade do retinoblastoma (pRb), enquanto que a E6 se une à p53, que é um gene de supressão tumoral<sup>7,14,15</sup>. Esta união promove a degradação da p53, removendo o controle do ciclo celular dependente da p53 e conseqüentemente, impedindo a reparação do DNA. Em decorrência disso, surgem os genes mutantes, que são perpetuados, levando à proliferação desordenada, que é uma característica das lesões neoplásicas<sup>7,14,15,16</sup>.

A E7, associada à transcrição de produtos da pRb, promove liberdade para a transcrição de muitos genes envolvidos na progressão de células no ciclo celular. A E7 parece demonstrar interação com ciclina-A e cinase-2 ciclina dependente, ambas atrapalhando a progressão do ciclo celular . A E7 liga-se à pRb, interferindo na sua capacidade de manter a E2F na forma inativa, levando ao crescimento desordenado das células. Atribui-se ainda ao gene E7 a capacidade de reduzir a expressão dos antígenos de histocompatibilidade, situados em superfície celular, o que pode explicar, pelo menos em parte, o retardo da resposta imunológica do hospedeiro<sup>7,14,15,16</sup>.

Interferências com a função da pRb e da p53 podem determinar a perda do controle do ciclo celular e promover instabilidade cromossômica e aneuploidia. Porém, os genes E6 e E7 em infecções por HPV de baixo risco parecem

expressar essas oncoproteínas de forma menos efetiva e, por consequência, falham nas modificações cromossômicas. Contudo, a integração dos genes E6 e E7 do HPV de alto risco com as proteínas celulares pRb e p53 representam um fator de progressão endógena, tornando-se importante na progressão das lesões pré-malignas e malignas<sup>7,14,16</sup>. Somando-se a essas modificações endógenas do DNA da célula hospedeira, há a contribuição de fatores mutagênicos exógenos, que provavelmente determina o desenvolvimento do câncer<sup>11</sup>.

Co-fatores podem ser considerados, além do HPV, na patogênese das anormalidades do colo uterino. Entre eles, destacam-se principalmente fatores genéticos, alimentares, ambientais, o uso de contraceptivos hormonais, o tabagismo e o estado imunológico. Esses co-fatores interagem, em maior ou menor intensidade, de maneira a aumentar a susceptibilidade do hospedeiro ao HPV, favorecendo sua infecção, sua multiplicação e a persistência da sua atuação, oferecendo grande oportunidade para a integração do genoma viral ao genoma celular, com concomitante expressão das proteínas virais e perda do controle celular<sup>11,17</sup>. Quando modificações pré-cancerosas são encontradas no tecido cervical, identificadas precocemente e tratadas, o câncer de colo uterino não se desenvolverá<sup>2</sup>.

Existe grande interesse na atualidade em se pesquisar aspectos relacionados à etiopatogenia do câncer cervical e suas lesões precursoras, no sentido de se estabelecer sua prevenção primária. As investigações têm se voltado para estratégias que levem em conta o papel representado pelo agente causal, que é o papilomavírus humano, bem como para co-fatores que favoreçam a ação do mesmo<sup>11</sup>.

### 3.1 A NEOPLASIA INTRA-EPITELIAL CERVICAL

As lesões precursoras do câncer de colo de útero foram primeiramente descritas por Cullen em 1900 e Rubin em 1910, como achados histopatológicos casuais em bordas de tumores francamente invasores. As células observadas nessas lesões tinham aspectos morfológicos semelhantes às do tumor infiltrante, porém estavam contidas dentro do epitélio transformado. A melhor caracterização dessas lesões iniciais deveu-se a dois inovadores procedimentos propedêuticos:

a colposcopia, idealizada por Hinselmann, em 1925, e a colpocitologia oncótica (CO), preconizada em 1938, por Papanicolaou<sup>16</sup>.

Em 1967, Richardt reconheceu que tais lesões possuíam caráter neoplásico verdadeiro. Preferiu nomeá-las como neoplasia intra-epitelial cervical, graduando-as como NIC 1, NIC 2 e NIC 3, de acordo com a intensidade das atipias. Em decorrência das dificuldades na precisão dos diagnósticos diferenciais entre NIC 3 e carcinoma *in situ*, em 1973, Richardt propôs, como legenda diagnóstica única, o encontro de NIC 3 e carcinoma *in situ*<sup>16</sup>.

A graduação das lesões precursoras em NIC 1, NIC 2 e NIC 3 é embasada na intensidade dos distúrbios morfológicos celulares, relacionados, principalmente, com a proliferação, a atipia celular e as mitoses. Esses critérios morfológicos são avaliados também em relação ao nível que alcançam na verticalidade do epitélio. Utiliza-se, universalmente, o sistema de divisão do epitélio em três terços: inferior, mediano e superficial. Desse modo, na NIC 1, as alterações celulares e a perda de diferenciação, ficam restritas ao terço inferior do epitélio; na NIC 2 ocorrem nos dois terços inferiores e na NIC 3 existem alterações morfológicas que ocupam os três terços do epitélio<sup>16</sup>.

No carcinoma *in situ* existe inquestionável envolvimento de toda a espessura do epitélio, sem qualquer evidência de diferenciação celular, estando a membrana basal íntegra<sup>16</sup>.

Ostor concluiu, em 1993, que muitos tipos de carcinomas escamosos da cérvix uterina eram provenientes de precursores intra-epiteliais e que as evidências desse fato eram embasadas nos seguintes quesitos: a NIC geralmente ocorria uma década antes do câncer invasivo (o que suporta o conceito de evolução temporal desse tipo de câncer); mulheres com anormalidades intra-epiteliais desenvolviam câncer muito mais frequentemente do que as que não as tinham; os carcinomas em estadios precoces aconteciam na periferia da NIC ou na cripta das glândulas e os francamente invasores eram frequentemente rodeados por uma lesão *in situ*; existiam evidências laboratoriais da semelhança entre NIC e carcinoma invasor do colo uterino e estudos epidemiológicos já evidenciavam muita semelhança nos fatores causais de ambos<sup>18</sup>.

As lesões precursoras do câncer cervical têm, em geral, um curso evolutivo desigual e lento; podendo progredir, permanecer inalteradas ou sofrer regressão. Para alguns autores, NIC 1, NIC 2 e NIC 3 representam processos distintos, no

qual a NIC 1 é autolimitada e espelha a infecção pelo papilomavírus sexualmente transmitido, enquanto que a NIC 2 e a NIC 3 seriam as verdadeiras lesões pré-malignas<sup>16</sup>.

A NIC origina-se em células metaplásicas imaturas, que mais provavelmente se alteram devido a uma associação de fatores, como agentes oncogênicos, distúrbios imunológicos e outros, encontrados principalmente em certos grupos epidemiológicos<sup>16</sup>.

Pesquisas revelam que o grupo de risco para essa neoplasia é composto de mulheres jovens, e que fatores como infecção persistente por HPV de alto risco, imaturidade imunológica, presença de ectrópios cervicais, uso de contraceptivos hormonais, tabagismo e multiplicidade de parceiros sexuais, dentre outros, facilitam a instalação dessa neoplasia<sup>11,16,17</sup>.

### 3.2 FATORES DE RISCO PARA NEOPLASIAS INTRA-EPITELIAIS CERVICAIS

Estudos epidemiológicos têm indicado que tanto a infecção pelo HPV quanto o câncer cervical são fortemente influenciados pela atividade sexual da mulher e de seu parceiro, uma vez que a infecção persistente por tipos de HPV de alto risco oncogênico é um importante determinante das lesões intra-epiteliais. Entretanto, fatores adicionais contribuem no processo multifatorial para o desenvolvimento da neoplasia<sup>7,11</sup>. Condições causando imunossupressão e agentes mutagênicos aumentam o risco de aquisição e progressão das lesões associadas ao HPV<sup>7,11</sup>.

O risco de infecção também parece ser influenciado independentemente por outras variáveis, como paridade, uso de contraceptivo oral e tabagismo habitual. A idade parece ser um fator importante, pois muitos estudos demonstram declínio da infecção após os 30 anos<sup>7</sup>.

#### 3.2.1 Tabagismo

O envolvimento do tabagismo na etiologia do câncer cervical e de suas lesões precursoras tem sido tópico de debate por muitos anos. O consenso da OMS<sup>11</sup> determinou que apesar das diferenças de prevalência entre o uso corrente do cigarro e o seu uso passado, dentre os diversos estudos e populações

avaliados, o tabagismo está consistentemente associado ao risco de ter NIC3 e câncer invasivo do colo uterino. Concluiu ainda que os componentes do cigarro são importantes carcinógenos, além de interferirem nas funções imunológicas que atuam no reconhecimento e no *clearance* do HPV, demonstrando ser o mesmo um co-fator na gênese da neoplasia do colo do útero<sup>11</sup>.

Diversas hipóteses são postuladas em relação à maneira pela qual o tabagismo poderia induzir as lesões cervicais, não existindo um mecanismo isolado que possa explicar a carcinogênese cervical relacionada ao cigarro<sup>17</sup>. A complexidade da mistura de carcinógenos presentes na fumaça do cigarro, associada à susceptibilidade individual, pode significar que diferentes substâncias ocasionam diferentes tipos de danos<sup>17</sup>.

Um dos principais mecanismos de ação relacionados à carcinogênese cervical está associado à exposição direta do DNA das células epiteliais cervicais à concentrações elevadas desses carcinógenos, seguida de modificação dessas moléculas, com potenciais efeitos mutagênicos<sup>16</sup>. O nível do dano ao DNA celular tem variação individual, com influência de fatores genéticos e ambientais, bem como o número e o tipo de cigarro consumidos<sup>17</sup>.

O fumo parece desempenhar alteração nos mecanismos de defesa imunológica tecidual, tanto no âmbito sistêmico quanto no local<sup>17</sup>. De maneira global, o tabagismo modifica tanto a resposta celular quanto a humoral. Em indivíduos fumantes, existe diminuição dos níveis de imunoglobulinas circulantes, depressão da produção de anticorpos direcionados a determinados antígenos e diminuição da liberação das citocinas pelas células imunocompetentes. Também ocorre alteração nas concentrações de linfócitos T citotóxicos, supressores e células *natural killer*, diminuição da liberação da migração e da quimiotaxia leucocitária, bem como queda na atividade fagocitária<sup>17</sup>. Dessa maneira, o hospedeiro poderia apresentar dificuldades em montar resposta imune efetiva contra os diversos agentes agressores infecciosos, como por exemplo, o HPV<sup>17</sup>.

Autores atuais reconheceram o tabagismo, corrente ou passado, dose e tempo dependente, como um significativo fator de risco para a neoplasia cervical<sup>16-17,19-23</sup>. Contudo, outros estudos não encontraram correlação entre o hábito de fumar e o desenvolvimento da doença<sup>24-26</sup>. Syrjanen et al. concluíram, entretanto, que o tabagismo é um fator de risco para a aquisição da infecção pelo HPV, mas não para o desenvolvimento da NIC<sup>26</sup>.

### 3.2.2 Hormonioterapia

A pesquisa da relação do uso de contraceptivos hormonais ou da terapia de reposição hormonal com o desenvolvimento de cânceres do sistema reprodutivo em mulheres ainda apresenta resultados conflitantes. Contudo, estudos citados por McFarlane-Anderson *et al.* reportam que a contracepção hormonal (pílulas ou injetáveis) aumenta o risco para o câncer cervical, particularmente em mulheres HPV-positivo, sugerindo que o contraceptivo oral atue como um promotor da carcinogênese induzida pelo HPV<sup>27</sup>. Em adição a qualquer efeito promotor direto do hormônio no desenvolvimento da displasia cervical, o uso de contraceptivos hormonais pode resultar ainda em maior frequência de atividade sexual desprotegida, colocando o indivíduo em maior risco de infecção pelo vírus HPV e outras doenças sexualmente transmissíveis<sup>16,27</sup>.

Os mecanismos de interação entre HPV e esteróides sexuais não são totalmente esclarecidos<sup>11</sup>.

A regulação da transcrição viral ocorre principalmente na região LCR do HPV. Pelo menos três elementos responsivos a glicocorticóides dentro da região LCR são responsivos tanto à progesteronas quanto aos glicocorticóides, aumentando a transcrição dos genes E6 e E7. Mas nem todos os elementos responsivos aos glicocorticóides de cada tipo de HPV responde aos hormônios na mesma intensidade<sup>28</sup>.

O aumento da 16 $\alpha$ -hidroxilação do estradiol em 16 $\alpha$ -hidroxiestrone e estriol têm sido hipotetizado como um fator de risco para o carcinoma cervical. Quando a 16 $\alpha$ -hidroxiestrone se liga aos receptores de estrogênio prolonga o seu efeito e aumenta a capacidade das células endocervicais imortalizadas pelo HPV 16 e as células do carcinoma cervical, sugerindo que a 16 $\alpha$ -hidroxilação do estradiol em estrone e HPV de alto risco oncogênico aumentem o efeito de um sobre o outro na promoção da proliferação celular<sup>28</sup>.

A zona de transformação da cérvix uterina é altamente sensível a estrógenos, em comparação a outras áreas do sistema reprodutivo. Introduzindo-se HPV 16 nessas células aumenta-se em oito vezes o risco da conversão do estradiol em 16 $\alpha$ -hidroxiestrone. A exposição crônica a estrógenos em HPV 16

E6/E7 de ratos transgênicos resulta em progressão neoplásica das células do epitélio escamoso da cérvix e da vagina<sup>28</sup>.

Avaliando-se a associação entre o uso de contraceptivo oral e o carcinoma escamoso da cérvix, o consenso da OMS<sup>11</sup> foi de que ainda não é possível avaliar adequadamente o risco associado ao consumo das formulações mais comumente usadas, e que mais estudos são necessários para incluí-los como cofatores na gênese do câncer cervical.

Estudos recentes corroboram na hipótese de que o anticoncepcional oral não parece estar correlacionado com a etiopatogenia da neoplasia cervical e seus precursores<sup>16,19,21</sup>.

### 3.2.3 Soropositividade para HIV

Estudos desta infecção, analisados pela OMS, consistentemente têm demonstrado associação entre a infecção do colo uterino pelo HPV e pelo HIV (vírus da imunodeficiência humana) e, da mesma forma, da associação entre a neoplasia intra-epitelial cervical e o HIV. Uma alta percentagem de mulheres soropositivas para HIV é infectada com múltiplos tipos de HPV e a infecção da cérvix uterina pelo HPV tende a ser mais persistente nessas mulheres do que nas mulheres soronegativas<sup>11</sup>.

A epidemia do HIV é mundial. No final de 2006, cerca de 39 milhões de pessoas conviviam com o vírus do HIV a nível mundial, dos quais 1.7 milhões estavam na América Latina e um terço dessas pessoas, no Brasil<sup>29</sup>. A melhora dos índices de sobrevivência desses pacientes é consequência de um adequado manejo clínico, da profilaxia contra infecções comuns e do uso efetivo de antiretrovirais<sup>28</sup>. Esses fatos geraram maior atenção para as doenças crônicas e degenerativas, que até então pareciam irrelevantes, como por exemplo, o precursor do câncer cervical, que é mais prevalente em pacientes soropositivas<sup>29</sup>.

Mulheres soropositivas têm alta prevalência e incidência tanto para infecção por HPV quanto para NIC 3, quando comparadas às mulheres soronegativas. A prevalência do HPV nas mulheres infectadas pelo HIV está fortemente associada com a contagem de células CD4 e com a carga viral. Mulheres soropositivas com contagem de CD4 menor que 200 células por microlitro, têm um risco três vezes maior para a infecção pelo HPV que as

soronegativas. Da mesma maneira, quando a carga viral é maior que 10.000 cópias por mililitro, o risco de infecção por HPV aumenta em três vezes<sup>30</sup>.

Estudos citados por Russomano *et al.* têm consistentemente mostrado que mulheres soropositivas apresentam alto risco de neoplasia intra-epitelial cervical persistente e recorrente, mesmo após terapêutica padrão<sup>29</sup>.

### 3.3 O MANEJO DA NEOPLASIA INTRA-EPITELIAL CERVICAL

O manejo impróprio das neoplasias intra-epiteliais pode aumentar o risco do carcinoma invasivo do colo uterino e, ao mesmo tempo, existem as complicações relativas ao tratamento destas<sup>31</sup>.

No tratamento das lesões precursoras, tanto o tratamento ablativo quanto o excisional são utilizados. Os métodos ablativos incluem crioterapia, ablação a laser, eletrofulguração e cauterização química. Os métodos excisionais, que promovem a avaliação anátomo-patológica por meio do espécime retirado, são a conização por bisturi a frio, a cirurgia de alta frequência (CAF, LOOP, LEETZ), a conização a laser e a conização por agulha eletrocirúrgica<sup>31</sup>.

A escolha da técnica a ser usada no tratamento (excisão ou destruição local) depende de critérios que devem ser considerados pelo examinador: idade da paciente, paridade, desejo reprodutivo, risco de perda de seguimento, habilidade do operador e colposcopia satisfatória<sup>31</sup>.

Atualmente, a cirurgia de alta frequência com alça (CAF), método introduzido por Prendiville, vem sendo cada vez mais utilizada para a excisão de toda a zona de transformação. Inicialmente, a conização com CAF era reservada para os casos nos quais a zona de transformação era totalmente visível e confinada ao colo uterino e quando não havia suspeita de doença microinvasora ou invasora na citologia e na colposcopia. Porém, tem sido demonstrado que a conização por CAF apresenta resultados terapêuticos similares aos da conização por bisturi a frio e é um método mais rápido, mais econômico e com menos complicações<sup>32</sup>.

A conização por bisturi a frio é o procedimento cirúrgico tradicional e também o método “padrão-ouro”, no qual se baseiam os dados para estudos de outros métodos, porém está associado com significativa morbidade, principalmente hemorragia e estenose cervical<sup>33</sup>.

Fatores relacionados à neoplasia residual e recorrência após conização são o grau da NIC, margens excisionais comprometidas e envolvimento glandular no produto de conização, idade, raça, número de gravidezes e partos, nível sócio-econômico, hábito de fumar, estado marital e associação com o papilomavírus humano<sup>34</sup>.

A frequência de comprometimento das margens do cone varia de 7.2 a 43.5% e depende de vários fatores, tais como: grau de severidade da NIC, envolvimento de endocérvice, dimensões do cone e técnica de conização. Sabe-se hoje que uma conização ampla e com adequada avaliação das margens cirúrgicas é suficiente para o tratamento da NIC 3 e até do carcinoma microinvasor (estadio clínico Ia1)<sup>32</sup>.

A presença de NIC nas margens cirúrgicas do cone, vista na análise histopatológica, é frequentemente utilizada na clínica para predizer a presença de lesão residual. Essa relação foi baseada na presença de lesão residual em espécimes cirúrgicos de histerectomia de pacientes com margens comprometidas na conização. Entretanto, a ausência de comprometimento das margens não dá a certeza da ausência de neoplasia residual<sup>34</sup>. Isso demonstra que os estudos a respeito das margens de conização ainda não são completamente conclusivos no que tange à recorrência ou presença de neoplasia residual<sup>34</sup>.

### 3.4 A RECORRÊNCIA OU A PERSISTÊNCIA DA NEOPLASIA INTRA-EPITELIAL CERVICAL

A persistência da neoplasia intra-epitelial cervical ocorre entre 5 e 35% das pacientes após tratamento conservador, seja por conização ou ablação, provavelmente devida à falha do tratamento primário ou novo desenvolvimento da doença. Em outras palavras, a maioria das recorrências ocorre possivelmente por doença residual ou infecção sub-clínica por HPV que não é erradicada<sup>35</sup>.

Conização do colo uterino, feita com bisturi a frio ou eletrocautério pode efetivamente erradicar a infecção por HPV de alto risco oncogênico e a neoplasia intra-epitelial cervical<sup>36</sup>. A persistência de infecção por HPV de alto risco oncogênico e de alterações histológicas após a conização, aumenta o risco de NIC persistente ou recorrente e esta pode progredir para carcinoma invasor na ausência de um tratamento efetivo<sup>36</sup>.

O conhecimento de fatores de risco para a persistência da infecção por HPV ou NIC persistente/recorrente é essencial para a sua detecção precoce<sup>29</sup>. Idade, paridade, grau da lesão, *status* da margem e extensão glandular têm sido descritos como fatores de risco para HPV persistente e doença residual após conização. Contudo, nem todos esses fatores são citados em todos os artigos e seu significado clínico exato ainda precisa ser bem estabelecido<sup>36</sup>.

A incidência de recidiva registrada em portadoras do vírus da imunodeficiência humana (HIV) é muito alta. O controle clínico e laboratorial da paciente infectada pelo HIV, mediante contagem das células CD4 e a quantificação da carga viral, parece estar intimamente relacionada à persistência e/ou recidiva da lesão, tendo sido verificados altos índices de recidiva após todas as modalidades de tratamento nas imunossuprimidas, mesmo após histerectomia<sup>37</sup>.

### 3.5 O PAPEL DA TECNOLOGIA NO RASTREAMENTO E NO SEGUIMENTO DA NEOPLASIA INTRA-EPITELIAL CERVICAL

Embora não seja a realidade para a maioria das neoplasias que ocorrem em humanos, a incidência e a mortalidade por câncer do colo do útero podem ser controladas pelo rastreamento. O que particulariza este câncer em relação às demais neoplasias é o fato de que esse tipo se desenvolve a partir de lesões pré-invasivas bem definidas, de comportamento conhecido, e de evolução lenta, as chamadas “neoplasias intra-epiteliais cervicais”<sup>38</sup>.

As NIC's, além da história natural lenta, ocorrem em região anatômica de fácil acesso, favorecendo o diagnóstico. Os avanços médicos ocorridos a partir da última metade do século XX permitiram, com mutilações mínimas e de pequena repercussão clínica, tratar as NIC's com probabilidade de cura de 90%<sup>38</sup>.

Nos locais onde ocorre com sucesso, o rastreamento para o câncer da cérvix uterina é realizado com o uso da colpocitologia oncótica (CO). Algumas regiões e países obtiveram reduções de até 70% da incidência de câncer do colo uterino, com equivalente redução da mortalidade<sup>38</sup>. Contudo, os benefícios do rastreamento por meio da colpocitologia oncótica não foram obtidos de forma homogênea em todo o mundo. Ainda hoje, a cada ano, meio milhão de mulheres são vítimas do câncer do colo uterino e metade delas morre pela doença.

Entretanto, o rastreamento por meio da CO só foi efetivamente introduzido em regiões bem respaldadas economicamente, fracassando, por outro lado, nos locais mais pobres. Não é por acaso que 78% dos novos casos desse tipo de câncer ocorrem no chamado “mundo em desenvolvimento”<sup>38</sup>.

O exame de colpocitologia oncótica (Papanicolaou) ainda é o principal método utilizado para a detecção do câncer da cérvix e suas lesões precursoras. Essa técnica, descrita por George Papanicolaou, em 1941, consiste na avaliação morfológica das células de esfregaços obtidos da superfície do colo uterino<sup>39</sup>.

A colpocitologia oncótica é considerada um teste bastante específico para o diagnóstico de lesões pré-cancerosas e do câncer invasor, porém a depender da qualidade da coleta, da fixação e do condicionamento do material, além do adequado treinamento da equipe envolvida no processo, sua sensibilidade será apenas moderada<sup>5</sup>.

Apesar do impacto da colpocitologia em programas de rastreamento do câncer do colo uterino, esse método possui muitas limitações: altas taxas de falso-negativos, a natureza subjetiva do teste, a necessidade de ser repetido em intervalos frequentes e a larga variação de sensibilidade e especificidade entre os laboratórios<sup>38,39,40</sup>. Algumas causas podem explicar o erro no diagnóstico da neoplasia cervical e de lesões precursoras à colpocitologia, como a falta de critérios morfológicos seguros para microinvasão, a ausência de amostragem da junção escamo-colunar e a escassez de células neoplásicas nas amostras<sup>39,40</sup>.

A sensibilidade da colpocitologia em detectar NIC 2 e 3 está em torno de 60% e sua especificidade em torno de 75%. A citologia de base líquida é provavelmente mais sensível, porém menos específica para detectar neoplasia cervical invasora<sup>41</sup>.

Em programas de rastreamento, a sensibilidade e a especificidade são dois parâmetros importantes na escolha do exame. No caso da CO, embora a sensibilidade varie entre 18 e 76%, sua escolha como método de rastreamento em muito se deve à sua elevada especificidade. Mesmo que a sensibilidade da CO seja relativamente baixa, a longa duração da fase pré-invasora permite que a doença, ainda que não diagnosticada em uma determinada rodada de rastreamento, seja detectada na seguinte; ou seja, a mera repetição do exame resultaria em melhora substancial da detecção de lesões precursoras, mas isso ressalta a necessidade de um programa organizado<sup>38</sup>.

A identificação e a utilização de ferramentas que possam complementar tanto o diagnóstico quanto o rastreamento das lesões precursoras do câncer do colo uterino é de suma importância. Uma vez que a grande maioria das lesões precursoras desse câncer regride espontaneamente, a identificação de lesões que realmente necessitem serem tratadas evitaria a utilização de métodos agressivos desnecessários, enquanto lesões com maior chance de progredirem seriam passíveis de tratamento antes do desenvolvimento de um câncer invasivo<sup>39</sup>.

Quatro vertentes vêm sendo utilizadas como alternativas ou suplementos ao rastreamento citológico: a detecção molecular do DNA de tipos de papilomavírus humano (HPV) de alto risco oncogênico; o rastreamento baseado na inspeção visual do colo do útero; as formas alternativas da própria colpocitologia (citologia de meio líquido ou citologia automatizada assistida por computador) e os novos biomarcadores associados às alterações citológicas decorrentes da infecção por HPV (imunohistoquímica para certas proteínas associadas às infecções pelo HPV)<sup>38</sup>.

Com as limitações da citologia, tem-se tentado usar os testes biomoleculares para detecção do DNA do HPV como alternativa para o rastreio primário, entretanto, devida à alta prevalência de infecções assintomáticas, a mera detecção do HPV de alto risco tem um baixo valor preditivo positivo para a presença de neoplasia intra-epitelial do colo uterino, uma vez que a prevalência para esse tipo viral em mulheres sem lesões varia de 20 a 40%<sup>38,39</sup>.

Os primeiros estudos, publicados na década de 1990, foram claros ao demonstrar que a adição de testes de HPV ao rastreamento contribuiria em muito para o aumento global da sensibilidade do programa, mas ao custo de destruir a excelente especificidade da colpocitologia. Isso ocorre porque 40% das mulheres residentes em áreas urbanas, com idade entre 25 e 35 anos, são portadoras do HPV, embora apenas 1% delas desenvolva algum tipo de lesão de importância clínica. Quanto mais jovem a mulher, maior a probabilidade de um teste positivo para HPV vir acompanhado de CO normal<sup>38</sup>.

Testar a presença de tipos oncogênicos de HPV de alto risco parece lógico, uma vez que é de conhecimento que praticamente todas as neoplasias cervicais são causadas por esses vírus. O teste de captura híbrida II (teste biomolecular para HPV) detecta 13 tipos de HPV de alto risco oncogênico e está positivo em

torno de 90% dos casos, entretanto seu índice de especificidade é baixo (62-96%), o que faz com que o valor preditivo positivo desse teste seja menor que o dos métodos citológicos<sup>41</sup>.

O teste para DNA HPV pode ser usado na triagem de mulheres com anormalidades citológicas duvidosas, e tem potencial para a identificação de mulheres com risco de doença residual ou recorrente após o tratamento da NIC. Entretanto, falha na triagem de lesões de baixo grau; e se usado no rastreamento primário, necessitaria de mais um marcador específico de doença para identificar as mulheres que precisariam realizar uma colposcopia para finalizar um diagnóstico<sup>42</sup>.

Combinando a citologia com o teste para HPV, em mulheres em que simultaneamente a citologia está alterada e a captura híbrida é positiva, ainda assim a sensibilidade será, em torno, de 94% ou mais para a detecção da neoplasia do colo uterino, contudo ocorrerá uma modesta redução da especificidade<sup>41</sup>.

O estudo *Ascus-LSIL Triage Study* [ALTS], entre outros que o precederam, forneceu evidências de que o uso dos testes para HPV pode aumentar em 50% a detecção de NIC 3 se as mulheres com diagnóstico de atipias celulares limítrofes de células escamosas (do inglês, *ASCUS*) e testes de HPV positivo forem encaminhadas à colposcopia, em comparação com a simples repetição da citologia e o encaminhamento para colposcopia apenas se a segunda CO estiver alterada<sup>38</sup>.

Os primeiros estudos sobre a combinação dos testes de HPV com CO no rastreamento primário do câncer cervical conseguiram demonstrar que, quando ambos os testes estão negativos, a probabilidade de a mulher vir a desenvolver NIC 3 nos dez anos seguintes ao rastreamento é menor do que 1%. Estudos mais recentes detectaram que o teste com HPV de fato aumenta a sensibilidade do rastreamento a níveis próximos de 100% em algumas circunstâncias, mas eleva o número de colposcopias desnecessárias (por falso-positivos) a quantidades impraticáveis<sup>38</sup>.

Os métodos visuais de rastreamento de lesões precursoras se baseiam no fato de que a maioria dessas lesões pode ser identificada a olho nu após a aplicação de ácido acético diluído ou compostos iodados, como o lugol. A inspeção visual com ácido acético (IVA), que consiste na visualização direta da

cérvix uterina após a aplicação de ácido acético a 3 ou 5%, é o método de rastreamento mais estudado como alternativa de substituição ou de suplementação da CO depois da detecção do HPV<sup>38</sup>.

Tecnicamente, a IVA é um método muito simples. Consiste no exame direto, a olho nu, da cérvix uterina, auxiliado apenas por iluminação artificial após um a dois minutos da aplicação do ácido acético. As maiores vantagens do exame são a simplicidade e o baixo custo. Outra vantagem é o fato de que o resultado do teste é imediato e a mulher a ser referida à propedêutica suplementar (colposcopia) recebe indicação na mesma consulta. Não é por acaso que tem sido utilizado em regiões pobres, para as quais a CO é logística e economicamente inviável ou muito difícil, quem dirá então os testes de HPV<sup>38</sup>.

Mas a IVA é um exame subjetivo e, mesmo quando executado por profissionais bem treinados, pode resultar em um número elevado de falsos-positivos, comprometendo sua especificidade e poder preditivo positivo. Ainda é preciso desenvolver padrões para o controle de qualidade da IVA, e a obtenção de um bom desempenho, em condições de campo, pode ser muito difícil<sup>38</sup>.

Apesar da histologia nas biópsias de colo uterino ser considerada “padrão-ouro” na avaliação das neoplasias intra-epiteliais e carcinomas invasores, é dependente da variabilidade intra-inter observador. Novos marcadores aplicados nos espécimes cirúrgicos e/ou nas biópsias poderiam melhorar a identificação de mulheres com resultados ambíguos que requeiram tratamento<sup>42</sup>.

Os biomarcadores tumorais são indicadores de alterações que ocorrem durante o processo neoplásico. A expressão desses marcadores pode refletir diversos processos em andamento nas células tumorais. Um biomarcador tumoral ideal possui relação direta com o processo maligno, correlaciona-se com a massa tumoral, permite a caracterização do tipo de tumor, a localização, o estadiamento, bem como fornece uma avaliação prognóstica do tumor em questão<sup>39</sup>.

Além da recorrência e/ou persistência da NIC nos primeiros anos de seguimento, as mulheres que foram tratadas de NIC 2 ou 3 permanecem em risco de desenvolver um carcinoma invasivo por um longo período de tempo, sendo por isso o seguimento prolongado necessário<sup>31</sup>.

Não é possível, até o presente momento, prever quais casos de NIC irão progredir ou regredir. Seguimento regular por citologia pode proporcionar boa proteção através da detecção das alterações celulares e conseguir, com isso,

significante redução nos índices de morbi-mortalidade do câncer do colo uterino, entretanto, o custo-efetividade deste seguimento ainda está em debate<sup>43</sup>.

Um grande número de protocolos de seguimento têm sido recomendados. Estes incluem citologia, colposcopia, a combinação da citologia com a colposcopia e testagem para a presença de DNA-HPV, todos testados numa grande variedade de intervalos<sup>31</sup>.

Revisões sistemáticas da performance do Teste DNA-HPV no seguimento pós-tratamento parece ser bom e excede aos resultados da CO. Em alguns estudos, a combinação do teste DNA-HPV com a citologia oncótica parece resultar no aumento da sensibilidade<sup>31</sup>.

As principais linhas de investigação associadas aos processos anteriormente mencionados para a ocorrência e a progressão da neoplasia cervical focam, sobretudo, a identificação de proteínas celulares/teciduais ou circulantes, cuja expressão se encontre alterada em resposta à expressão das oncoproteínas virais<sup>39</sup>.

Diversos estudos visam a análise dos níveis de proteínas relacionados ao evento da integração do DNA-HPV/oncoproteínas virais ao ciclo celular do hospedeiro. As principais descritas na literatura são: p53, p16<sup>INK4a</sup>, MCM2-7, EGFR, ciclina D, ciclina E, p21<sup>waf1</sup> e p27<sup>kip1</sup>, entre outras<sup>39</sup>.

Pesquisas atuais estão focadas no desenvolvimento de objetivos biomarcadores que possam distinguir infecção transformante por HPV e predizer a severidade da doença<sup>42</sup>. Para países em desenvolvimento, é necessária uma avaliação do papel das novas tecnologias para a prevenção do câncer do colo uterino que sejam úteis no contexto da saúde. Qualquer combinação de quaisquer testes de rastreio aumenta a sensibilidade, mas diminui a especificidade e aumenta o custo. Apesar de promissores, não há ainda estudos suficientes mostrando qual é a melhor combinação<sup>40</sup>.

### 3.5.1 A Proteína Supressora Tumoral p16<sup>INK4a</sup>

A proteína supressora tumoral celular p16<sup>INK4a</sup> tem sido identificada como um marcador da transformação da infecção por HPV. Fisiologicamente, a p16 bloqueia a atividade das *Kinases* ciclo-dependentes CDK4/6. Em uma infecção HPV transformante, os oncogenes virais E6 e E7 interferem substancialmente

com a apoptose e a regulação do ciclo celular. Mais importante, a ruptura da proteína Rb pelo E7 promove a progressão do ciclo celular, ativada pela CDK4/6<sup>42</sup>. Células afetadas expressam fortemente a p16 para controlar a ativação do ciclo celular irregular. Com o tempo, a p16 acumula no núcleo e no citoplasma das células afetadas, podendo ser detectado por imunohistoquímica<sup>42</sup>.

O ciclo da p53 e da pRb, em parte, é controlado pela CDKN2A (INK4A/ARF), em cujo *locus* estão codificadas duas proteínas supressoras tumorais: a p16<sup>INK4A</sup> e a p14<sup>ARF</sup>. A p16<sup>INK4A</sup> é um elemento da via pRb e pode induzir o ciclo celular G1 pela inibição da fosforilação de cinase-4 e 6 ciclina-dependente, e também, a p16<sup>INK4A</sup> tem um importante papel na senescência celular<sup>43</sup>.

A proteína p16 é uma cinase 4-ciclina dependente, que é expressa em um limitado número de tecidos normais e tumores. A p16 está integralmente relacionada à mediação do controle da transição da fase G1-S do ciclo celular<sup>44</sup>.

A expressão da p16 em tecidos humanos varia com a idade. Em crianças, sua expressão é essencialmente confinada ao timo, enquanto que em adultos há expressão no endométrio proliferativo, ductos mamários, células do antro gástrico, epitélio escamoso esofageano, glândulas salivares e algumas células neuroendócrinas<sup>44</sup>.

A perda da função da p16 foi demonstrada em algumas neoplasias; de fato, a alta frequência de deleção da p16 em linhas tumorais sugere um importante papel na carcinogênese. Foi inicialmente sugerida a sua inativação em pacientes com melanoma familiar, e também, em outros tipos de tumores forte expressão da p16 têm sido documentada. Positividade difusa tem sido descrita em dermatofibrossarcomas protuberantes, adenocarcinomas gástricos, linfomas Hodgkin e não Hodgkin, vários tumores pulmonares neuroendócrinos e tumor de pequenas células<sup>44</sup>.

Atualmente, a maior aplicação de imuno-histoquímica para p16 tem sido no campo das doenças ginecológicas. Positividade difusa (em oposição à positividade focal) com p16 em cérvix uterina pode ser identificada como um marcador da presença do vírus do papiloma humano (HPV)<sup>44</sup>.

Em lesões escamosas cervicais, a p16 é positiva na maioria das lesões intra-epiteliais cervicais de alto grau e em alguns casos de lesões de baixo grau, usualmente aquelas associadas à infecção por HPV de alto risco oncogênico<sup>44</sup>. A

positividade da p16 pode ser útil para identificar algumas lesões intra-epiteliais focais de alto grau em colo uterino, distinguindo alguns casos de NIC focal em epitélio metaplásico imaturo de epitélio metaplásico imaturo sem atipias e para diferenciar de lesões benignas mimetizando NIC<sup>44</sup>.

A maioria dos carcinomas escamosos cervicais, glandulares e de pequenas células é p16 positivo. Em lesões glandulares cervicais, a p16 é útil para diferenciar entre adenocarcinoma *in situ* (positividade difusa) e carcinoma endometrial tipo adenocarcinoma (positividade negativa ou focal)<sup>44</sup>.

A meta-análise produzida por Tsompou *et al.* concluiu que, apesar de haver boas evidências do p16<sup>INK4a</sup> correlacionar-se com a severidade das anormalidades citológicas e biológicas, sua reprodutibilidade é limitada devido à padronização insuficiente da interpretação da imunohistoquímica, entretanto, um consenso precisa ser procurado para a validação do p16 e sua aplicabilidade clínica em questões específicas<sup>42</sup>.

Poucos estudos, entretanto, correlacionaram a expressão do p16 com a evolução desfavorável da NIC pós conização. Nam *et al.*, em seu estudo na Korea, demonstraram a utilidade da expressão do p16 como um biomarcador preditor de recorrência da NIC e do risco de progressão para carcinoma invasor e, segundo eles, a expressão do p16 pode ser utilizada clinicamente para estratificar as pacientes que requeiram tratamento mais agressivo<sup>45</sup>.

### 3.5.2 A Proteína p53

A proteína 53 (p53 ou proteína tumoral p53) é uma proteína supressora tumoral que nos seres humanos é codificada pelo gene TP53. A p53 é importante em organismos multicelulares, que tem ciclo celular regulado e cuja função de supressão tumoral está envolvida na prevenção do câncer. Por isso mesmo a p53 tem sido descrita como a “guardiã do genoma”<sup>46</sup>.

A p53 pode ser ativada em resposta a uma série de tipos de *stress*, que incluem dano ao DNA (induzido por radiação UV, ação de agentes químicos, *stress* oxidativo, choque osmótico, depleção ribonucleotídeo e desregulação da expressão de oncogenes)<sup>46</sup>.

Certos patógenos podem afetar a p53 e a expressão do gene TP53. O vírus do papiloma humano codifica a proteína E6, que modifica a proteína p53 e inativa a mesma<sup>46</sup>.

A real importância da inativação da p53 na carcinogênese cervical tem sido bem documentada, entretanto, segundo Bragança *et al.* muitos estudos têm falhado em demonstrar diferentes escores de imunorreatividade da p53 em neoplasia intra-epitelial cervical HPV-positiva, HPV-negativa e o câncer cervical. Também têm reportado resultados conflitantes da relação entre a expressão do p53 e a progressão da neoplasia intra-epitelial do colo uterino<sup>47</sup>.

A detecção de alterações celulares originadas pela expressão desregulada das oncoproteínas virais pode vir a caracterizar marcadores de progressão tumoral e contribuir, dessa forma, para a identificação de populações celulares com maior risco de progressão para o câncer de colo uterino. A identificação e o estabelecimento do padrão de alteração desses fatores poderão definir marcadores com alto poder preditivo positivo<sup>39</sup>.

## 4 Métodos

Foi realizado um estudo retrospectivo das pacientes com diagnóstico histológico de neoplasia intra-epitelial do colo uterino, que foram tratadas por conização (pela técnica clássica e/ou cirurgia de alta frequência / CAF), no Hospital Erasto Gaertner (HEG) / Curitiba / PR, no período compreendido entre janeiro de 1999 a janeiro de 2006, e que apresentaram evolução desfavorável (persistência, recidiva e/ou progressão da doença) no período de seguimento de 18 meses, e comparadas com um grupo controle, pareado, submetido ao mesmo tratamento, no mesmo período, e que tiveram evolução favorável (cura clínica).

A amostra de pacientes foi composta de dois grupos:

- Grupo A: grupo ESTUDO (pacientes com evolução desfavorável: persistência e/ou recorrência da neoplasia intra-epitelial cervical ou progressão para neoplasia invasora, após o tratamento de conização);
- Grupo B: grupo CONTROLE (pacientes com diagnóstico de cura clínica após tratamento e seguimento mínimo de 1,5 anos).

O estudo foi devidamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HEG sob protocolo nº 1947 (pré-texto).

### 4.1 SELEÇÃO DA AMOSTRA

De um total de 491 pacientes que foram submetidas ao tratamento cirúrgico por conização, devido ao diagnóstico, por colposcopia e biópsia, de neoplasia intra-epitelial cervical grau 2 e 3 (NIC 2 e 3) do colo uterino, no período compreendido entre janeiro de 1999 a janeiro de 2006, foram extraídas 72 pacientes que evidenciaram persistência, recidiva ou progressão da NIC e determinou-se o grupo estudo.

O grupo controle foi determinado, dentre todas as pacientes conizadas nesse período, por uma amostra aleatória de pacientes também com diagnóstico de NIC 2 e 3, tratadas neste mesmo período.

Foram critérios de exclusão de pacientes: dados insuficientes de prontuário físico e/ou eletrônico, tempo de seguimento clínico pós-conização inferior a 1,5 anos, pacientes submetidas a histerectomia por doença benigna durante o seguimento, bloco de parafina do produto de conização em condição técnica inadequada para confecção das lâminas de imunohistoquímica, e ausência de evidências de neoplasia intra-epitelial após avaliação microscópica do produto de conização.

Com esses critérios de exclusão, o estudo ficou assim desenhado: 113 pacientes, ficando o grupo estudo composto por 48 pacientes e o grupo controle por 65 pacientes.

#### 4.2 DA ANÁLISE DOS DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

Foi realizada uma revisão sistemática dos prontuários físico e eletrônico das pacientes selecionadas, e analisados os seguintes dados epidemiológicos: idade, tabagismo, método anticoncepcional, doenças associadas, soropositividade para HIV, presença de lesão em vagina simultânea a do colo, ocorrência de gestação no primeiro ano pós-conização, técnica de conização realizada, positividade das margens do espécime cirúrgico, severidade da NIC no produto de conização e presença de extensão glandular no produto de conização.

A testagem da soropositividade do HIV de cada paciente é uma rotina desse serviço de patologia cervical e o exame é realizado mediante autorização, por termo de consentimento assinado pela paciente no laboratório do referido hospital, antes da sua execução.

#### 4.3 DA TÉCNICA DE CONIZAÇÃO

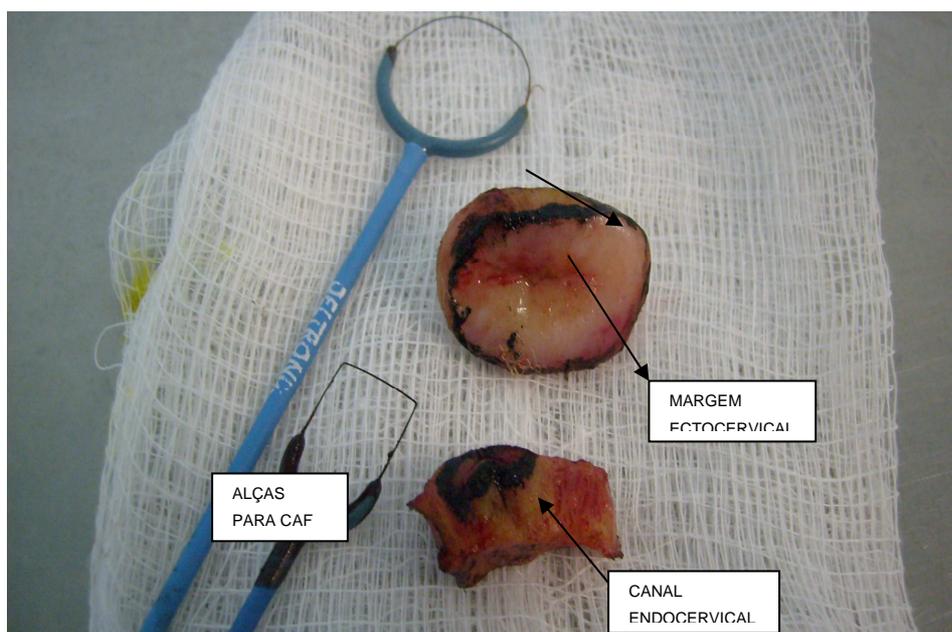
Foram utilizadas duas técnicas de conização: a Cirurgia de Alta Frequência (CAF) e a técnica de Conização Clássica.

Fez-se a cirurgia de conização com cautério de alta frequência (CAF) sob anestesia local, com retirada de duas peças (margem ectocervical e margem endocervical do colo uterino), através das alças do cautério de alta frequência, as quais foram encaminhadas para avaliação anátomo-patológicas com suas margens verdadeiras marcadas por nanquim (figura 2).

A técnica de cirurgia de conização clássica foi realizada sob anestesia geral associada à anestesia local, com retirada de espécime cirúrgico único, de formato cônico, e também marcada nas suas margens verdadeiras com nanquim antes de serem enviadas para estudo anátomo-patológico (figura 3).

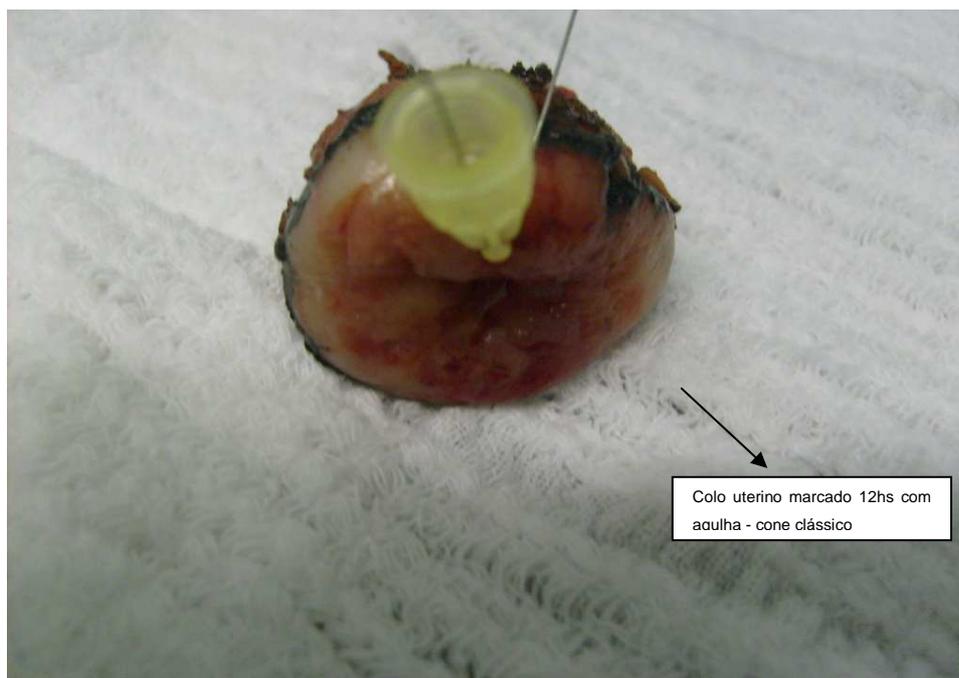
A escolha da técnica a ser utilizada em cada paciente foi determinada por protocolo do Serviço de Patologia Cervical do referido hospital, no qual as lesões consideradas mais extensas e/ou profundas foram previamente determinadas para a técnica clássica, e as demais para a técnica de CAF.

O material utilizado para a técnica de conização englobava espéculo com ajuste para aspirador, pinça Pozzi, eletrocautério, alças próprias para cirurgia de alta frequência, algodão, gase, soluções reagentes para colposcopia (lugol e ácido acético), carpule para anestesia local e tubetes com cloridrato de lidocaína a 1% para anestesia local .



Fonte: HEG/ Serviço de Patologia Cervical

Figura 2- Espécime cirúrgico obtido por conização por CAF



Fonte: HEG, Serviço de Patologia cervical

Figura 3- Espécime cirúrgico obtido por técnica de conização clássica

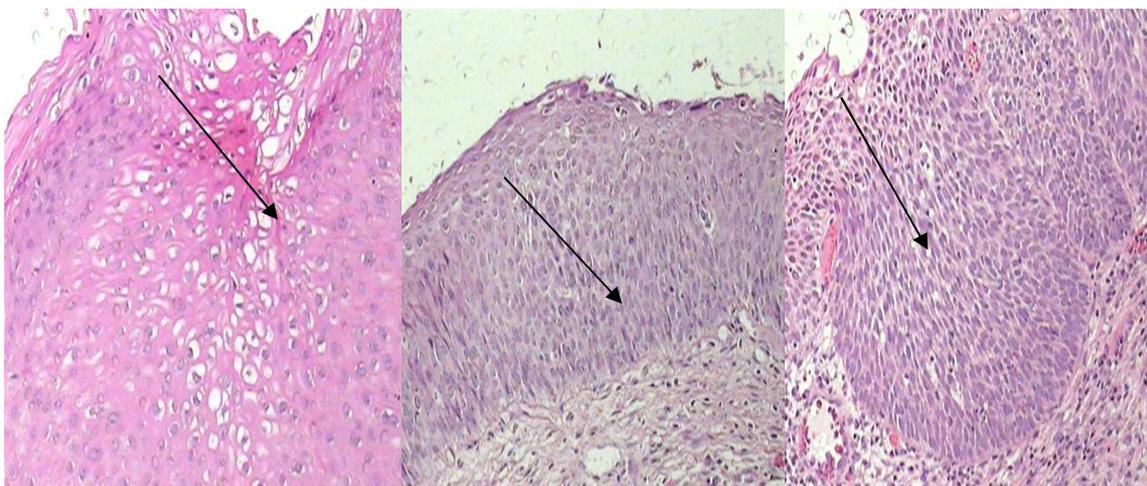
#### 4.4 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DAS PEÇAS DE CONIZAÇÃO

A avaliação dos cortes histológicos do produto de conização de cada paciente foi concentrada nos quesitos diagnóstico, margens excisionais livres ou comprometidas pela doença, extensão glandular da doença presente ou ausente e calculado o volume das peças de conização. O material avaliado foi o proveniente das lâminas confeccionadas e estudadas na época da conização, seguindo os critérios padrões do serviço de anatomia patológica do referido hospital e no momento desse estudo, revisadas. Esses cortes histológicos foram preparados por técnica convencional e corados pela hematoxilina-eosina.

O volume de colo uterino retirado foi calculado multiplicando-se o comprimento pela altura pela espessura da peça retirada e quando realizado CAF em duas peças o volume das 2 peças foi somado para cálculo do volume final daquele produto de conização.

No espécime da conização foi novamente confirmado o diagnóstico de neoplasia intra-epitelial cervical e em alguns casos, houve divergência do resultado da biópsia prévia, ficando os espécimes cirúrgicos classificados como

NIC 1 (quando a alteração histológica ficava restrita ao terço inferior do epitélio), NIC 2 (quando a alteração histológica ocupava aos dois terços basais do epitélio), NIC 3 (quando a alteração histológica ocupava toda a extensão do epitélio) e carcinoma escamoso invasor de colo uterino (quando a alteração histológica ultrapassava a membrana basal) (figura 4).



Fonte: Serviço de Anatomia-Patológica do HEG

Figura 4: Representação histológica de NIC/ carcinoma invasor do colo uterino (da esquerda para a direita: NIC 1, NIC3, Carcinoma invasor)

#### 4.5 TÉCNICA DE PREPARO DAS LÂMINAS PARA REALIZAÇÃO DA IMUNOHISTOQUÍMICA

Foram confeccionados cortes histológicos do produto de cada conização, pela técnica de *tissue microarray*, a partir dos blocos de parafina originais, para serem submetidas à aplicação dos imunomarcadores p53 e p16<sup>INK4a</sup>, de forma artesanal, no Laboratório de Patologia Experimental da PUCPR.

Para confecção das lâminas de *tissue microarray*, a partir dos blocos de parafina originais dos produtos de conização, foram avaliadas todas as lâminas feitas a partir desses blocos e demarcada a área de lesão mais representativa com caneta de retroprojeter. A área marcada foi colocada sobre o bloco correspondente e o material a ser retirado foi identificado. Com pinça do tipo *punch*, de dois milímetros de diâmetro e ligeiramente aquecida, foi retirado do bloco de parafina a área marcada e colocada nas caixas de *arrays*, seguindo

uma ordem previamente diagramada para posterior leitura, e então confeccionado novo bloco, o bloco de *tissue*.

Cada lâmina de *tissue* foi confeccionada com vinte amostras, sendo uma de cada paciente, totalizando seis lâminas de *tissue* para cada imunomarcador. Não foram individualizadas, nas lâminas confeccionadas, as pacientes do grupo estudo e do grupo controle, de modo que a leitura da reação imunohistoquímica fosse feita às cegas, para evitar viés de contaminação.

Os *kits* de imunohistoquímica utilizados foram:

- Anticorpo p53 pré-diluído (monoclonal de rato, clone DO-7, diluído 1:100, Biocare Medical<sup>®</sup>, Concord, USA);
- Anticorpo p16 pré-diluído (monoclonal de rato, clone 16p04-jc2, diluído 1:100, Bio Sb<sup>®</sup>, Santa Barbara, California, USA).

Após preparo de lâminas separadas para cada imunomarcador, estas foram submetidas aos seguintes processos: desparafinização (três banhos de xilol em cubas sequenciais de cinco minutos cada e quatro banhos de álcool absoluto em passagens rápidas de cinco a seis mergulhadas); recuperação antigênica com citrato pH 6,0 (quarenta minutos de banho maria a 96°C e resfriadas em temperatura ambiente por vinte minutos); bloqueio de peroxidase endógena (três banhos de água oxigenada - 10V, cinco minutos cada e depois lavagem em água corrente por 5 minutos); bloqueio de proteínas inespecíficas (com leite mólico a 3% por 20 minutos); diluição de cada anticorpo a 1:100 e aplicação do anticorpo primário sobre cada lâmina, colocando em câmara escura por duas horas em temperatura ambiente e depois lavagem com PBS específico de cada imunomarcador (três banhos de PBS de cinco minutos); aplicação do anticorpo secundário (trinta minutos em câmara escura umedecida e mais 3 banhos de PBS de cinco minutos cada) e, finalmente, aplicação do DAB específico e contracoloração.

Por ser a neoplasia intra-epitelial cervical uma lesão superficial e muitas vezes focal, houve perda de material para avaliação adequada do imunomarcador quando a amostra tinha pouca representatividade de tecido com a doença ou nos casos em que o tecido amostrado foi perdido da lâmina, durante o processo de imunomarcção.

#### 4.6 LEITURA DOS IMUNOMARCADORES

Os elementos imunohistoquímicos avaliados na leitura das lâminas foram os seguintes: positividade da reação e sua intensidade (análise qualitativa), padrão de positividade da reação (análise quantitativa) e imunolocalização (avaliada somente para o anticorpo p16).

##### A) Positividade da reação (análise qualitativa):

a.1) reação positiva- dividida em dois grupos:

a.1.1) positiva forte: quando a intensidade da coloração foi semelhante ao controle utilizado;

a.1.2) positiva fraca: quando a intensidade da coloração foi substancialmente menor que a do controle positivo utilizado, só podendo ser observada com clareza com aumento de 100 vezes; e

a.2) reação negativa: quando não houve nenhuma coloração característica da reação imunohistoquímica.

##### B) Padrão de positividade da reação (análise quantitativa):

b.1) positividade difusa: a reação foi positiva numa extensão que englobava mais de 50% da amostra viável e avaliável;

b.2) positividade multifocal intensa: a reação foi positiva numa extensão que englobava entre 25 e 50% da amostra viável e avaliável do tumor; e

b.3) positividade multifocal leve: a reação foi positiva numa extensão que englobava menos de 25% da amostra viável e avaliável.

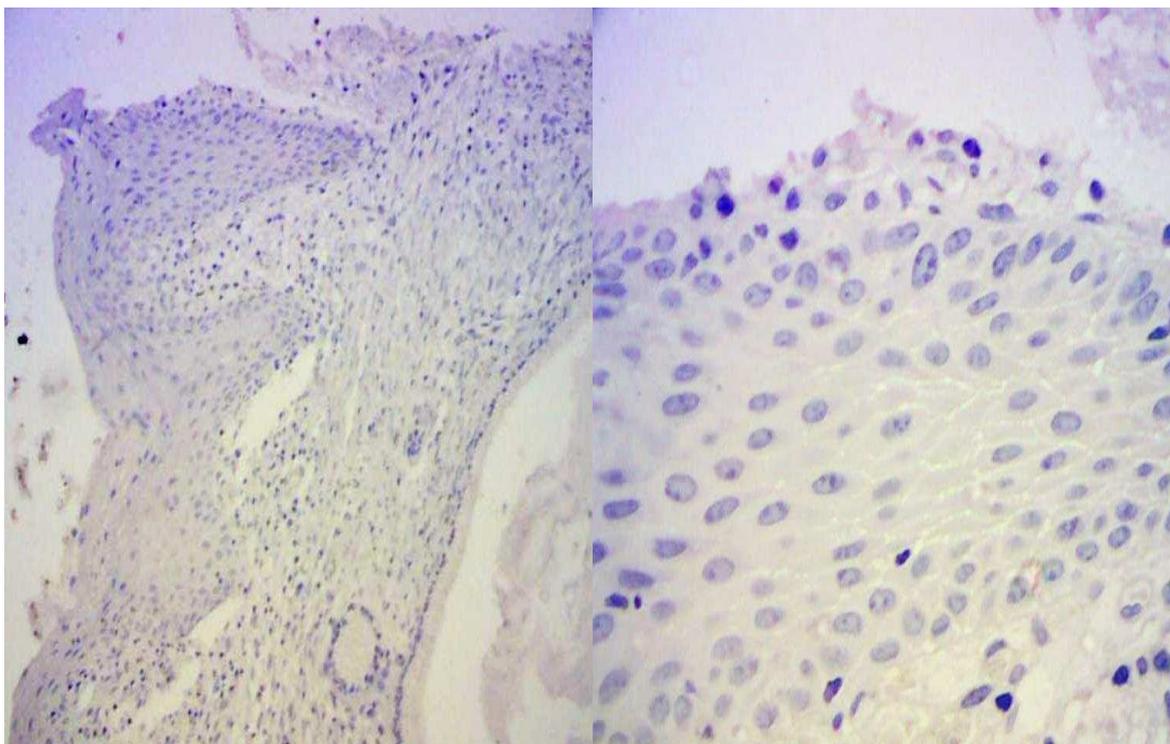
##### C) Imunolocalização (somente em relação ao marcador p16):

c.1) núcleo: padrão nuclear de positividade;

c.2) citoplasma: padrão citoplasmático de positividade;

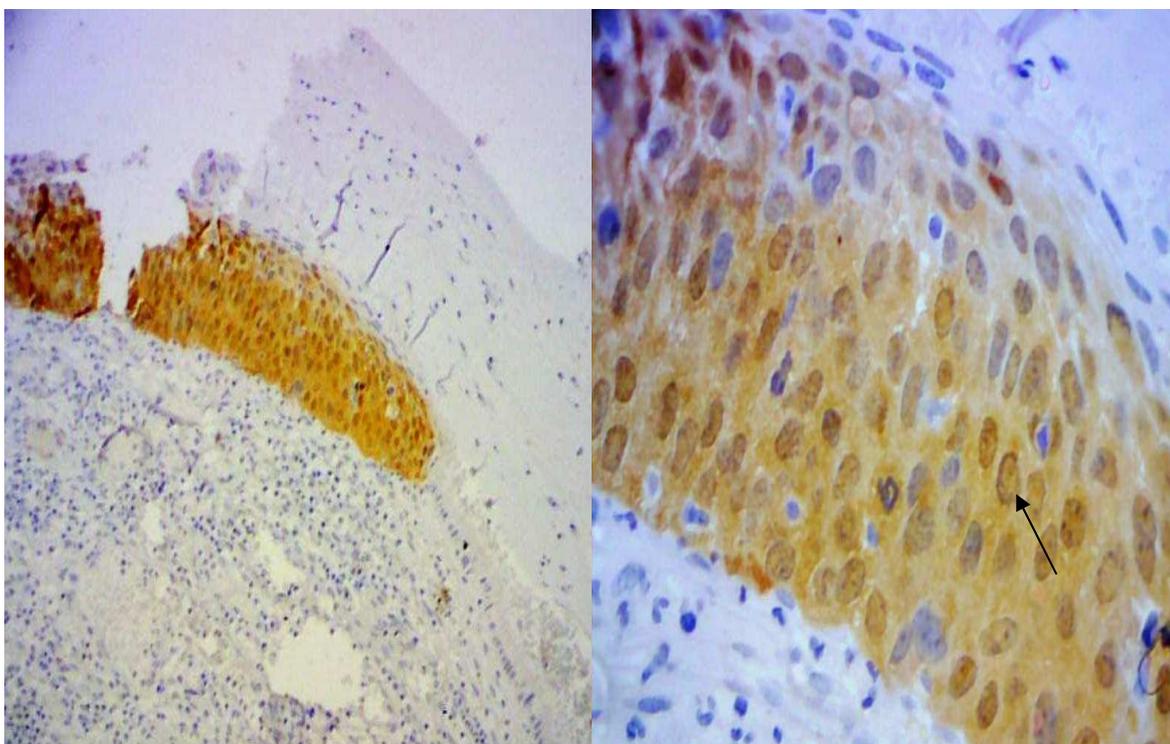
c.3) núcleo e citoplasma: positividade de reação tanto em núcleo quanto em citoplasma.

O imunomarcador demonstrou coloração castanho-amarronada, à nível nuclear, para os cortes positivos para o p53 e castanho-amarronada, à nível nuclear e citoplasmático, para o p16 ( figuras 5 a 8).



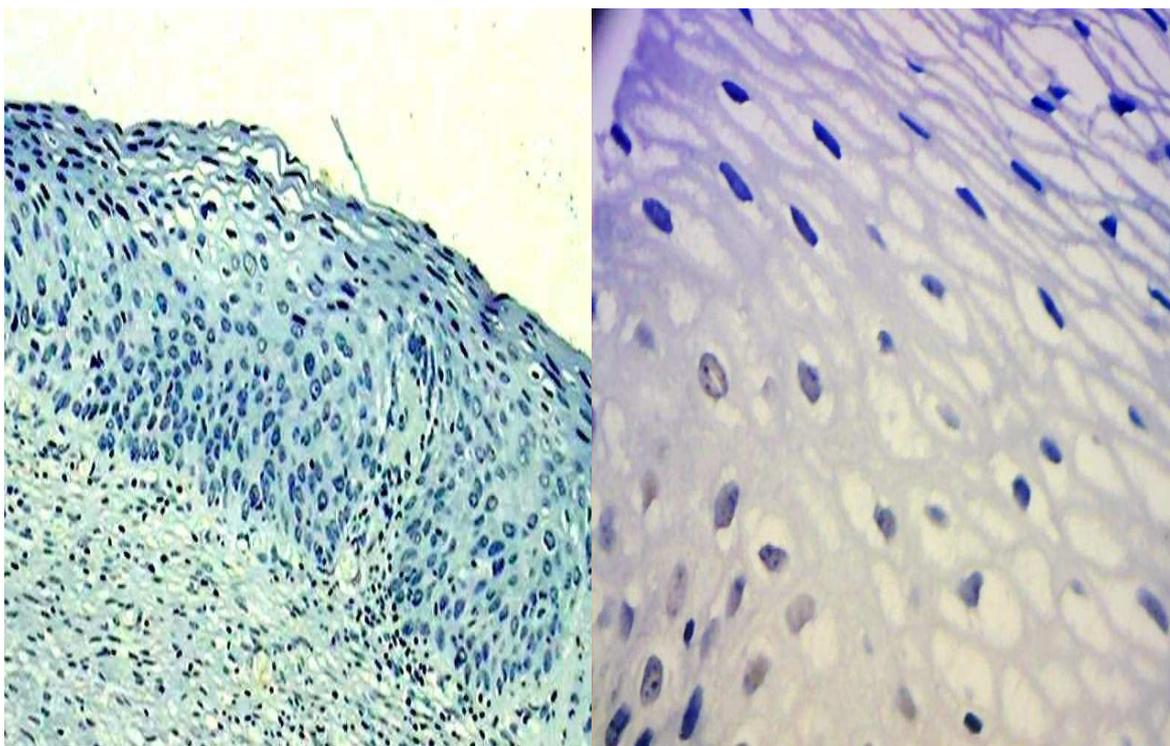
Fonte: Laboratório de Anatomia-patológica, HEG

Figura 5- Reação negativa para p16 (objetiva de 10 X e 40 X)



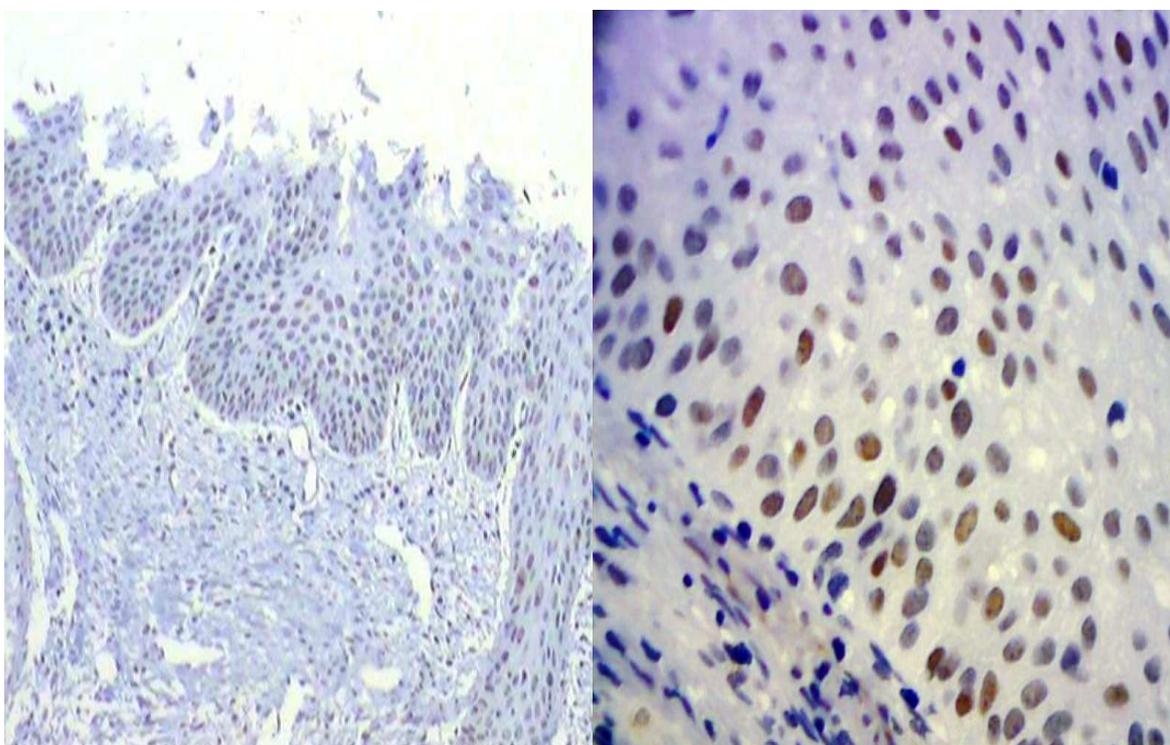
Fonte: Laboratório de Anatomia-patológica, HEG

Figura 6- Reação positiva por p16 forte e difusa, corando núcleo e citoplasma (objetiva de 10 X e 400 X)



Fonte: Laboratório de Anatomia-patológica , HEG

Figura 7 - Reação negativa para p53 (objetiva de 10 X e 40 X)



Fonte: Laboratório de Anatomia-patológica, HEG

Figura 8- Reação positiva, forte e difusa, para p53 (objetiva de 10 X e 40 X)

#### 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizada análise estatística dos dados, utilizando-se o programa SPSS 12.0, buscando Intervalo de Confiança superior a 95% e nível de significância de 5%, com cálculo do ODDS Ratio para cada fator preditor encontrado e análise uni e multivariada das variáveis.

A análise multivariada foi feita incluindo todas as variáveis com valor de  $p < 0.250$ , utilizando-se a idade para controle.

## 5 RESULTADOS

Das 491 paciente conizadas no período supracitado, após aplicação dos critérios de exclusão, foram extraídas 113 pacientes, assim distribuídas: 48 pacientes no grupo estudo e 65 pacientes no grupo controle.

Destas 113 pacientes foram analisados os seguintes dados epidemiológicos: idade, paridade, tabagismo, uso de método anticoncepcional e doenças pré-existentes ao tratamento da NIC.

Nessas pacientes, a média de idade encontrada no grupo estudo foi  $36 \pm 11.5$  anos ( IC 95%: 33-40) e no grupo controle  $33 \pm 11.8$  anos ( IC 95%: 30-36), com valor de p de 0.202, não evidenciando diferença significativa entre os dois grupos no que tange ao risco de persistência/ recorrência da doença cervical (tabela 1).

A paridade dentre as mulheres estudadas, o hábito de fumar e o método anticoncepcional não exerceram influência de significância estatística na evolução desfavorável da doença cervical tratada (tabela 1).

TABELA 1 – DADOS EPIDEMIOLÓGICOS NOS GRUPOS

VARIÁVEL	CLASSIFICAÇÃO	n	GRUPO		VALOR p (univariada)	VALOR p (multivariada)	OR (IC 95%)	TESTE
			CONTROLE	ESTUDO				
IDADE	NUMÉRICO	113	65	48	0.202	0.666	0.9	t STUDENT
			33±11.8	36±11.5				
PARIDADE	NUMÉRICO	113	65	48	0.200	0.296	1.21	MANN- WHITNEY
			2.7±2.27	3.3±2.5				
TABAGISMO (4)	EX	10	5(7.8%)	5(11.1%)	0.637			X <sup>2</sup>
	NÃO	45	25(39.1%)	20(44.4%)				
	SIM	54	34(53.1%)	20(44.4%)				
MÉTODO ANTICONCEPCIO- NAL (4)	CONDOM	20	9(45%)	11(55%)	0.838*			X <sup>2</sup>
	DIU	5	3(60%)	2(40%)				
	LTB	12	8(42%)	7(58%)				
	ORAL	38	26(68%)	12(32%)				
	NENHUM	34	19(56%)	15(44%)				

\* significa p calculado para usar ou não método anticoncepcional

(\*) significa o número de pacientes não avaliáveis

Avaliando-se as doenças pré-existentes nas pacientes, 71% delas não apresentavam nenhum tipo de co-morbidade e as outras 29% apresentavam as seguintes doenças: depressão, diabetes melito, doenças sexualmente transmissíveis, hipertensão arterial crônica e síndrome da imunodeficiência adquirida. Entretanto, ter ou não doença pré-existente não evidenciou diferença significativa ( $p=0.289$ ) na persistência/recorrência das lesões intra-epiteliais cervicais, pós-tratamento (tabela 2).

TABELA 2- DOENÇAS PRÉ-EXISTENTES NOS GRUPOS

VARIÁVEL	DOENÇAS	n	CONTROLE	ESTUDO	P UNIVARIADA	P MULTIVARIADA	OR (IC95%)	TESTE
DOENÇAS (9)	DEPRESSÃO	3	3(100%)	0(0%)	0.289 *			X <sup>2</sup>
	DIABETES	4	1(25%)	3(75%)				
	DST	4	3(75%)	1(25%)				
	HAS	5	4(80%)	1(20%)				
	HIV	7	1(12%)	7(88%)				
	NENHUMA	81	49(60%)	32(40%)				

- Refere-se a ter ou não doença pré-existente
- (\*) significa o número de pacientes não avaliáveis

Estudando a soropositividade do HIV de forma individualizada, nas 79 pacientes que foram testadas, 10% delas foram positivas para a imunodeficiência e 88% delas estavam no grupo estudo, mostrando tendência à significância como fator epidemiológico de evolução desfavorável ( $p= 0.06$ ), mas com este  $n$  muito pequeno não foi possível incluí-lo nas conclusões .

As pacientes que, ao diagnóstico da NIC apresentavam lesão concomitante em vagina, sugerindo doença multicêntrica, totalizaram 7% ( $n=8$ ) das mulheres estudadas, e dentro destas, 75% ( $n=6$ ) estavam no grupo estudo, enquanto que 25% ( $n=2$ ) estavam no grupo controle, determinando um valor de  $p=0.07$  na análise univariada e 0.265 na análise multivariada, mas este  $n$  pequeno também não permitiu incluir esta variável nas conclusões.

A ocorrência de gestação durante o seguimento, pós tratamento, ocorreu em apenas 6% ( $n=7$ ) das pacientes, e destas, 71% ( $n=5$ ) estavam no grupo estudo e 29% ( $n=2$ ) estavam no grupo controle, com valor de  $p$  equivalente à

0.133 na análise univariada e 0.72 na análise multivariada, sendo analisada assim como a soropositividade para o HIV a a lesão concomitante de vagina.

Quanto aos dados relativos ao tratamento realizado (técnica de conização), foram analisados: a técnica cirúrgica, o resultado anátomo-patológico do produto de conização, as margens excisionais do produto de conização, a presença de extensão glandular na peça histológica e feito o cálculo do volume de cone retirado em cm<sup>3</sup> (tabela 3).

TABELA 3 – DADOS DO TRATAMENTO E RESULTADOS ANÁTOMO-PATOLÓGICOS

VARIÁVEL	CLASSIFICAÇÃO	n	GRUPO		VALOR p (univariada)	VALOR p (multivariada)	OR (IC 95%)	TESTE
			controle	x estudo				
TIPO DE CIRURGIA	CAF	103	60(58%)	43(40%)	0.741			FISHER
	CONE	10	5(50%)	5(50%)				
AP DO CONE (106)	NIC1	8	3(37%)	5(63%)	0.179			X <sup>2</sup>
	NIC2	43	30(70%)	13(30%)				
	NIC3	55	32(58%)	23(42%)				
MARGENS DO CONE (112)	AMBAS+	3	0(0%)	3(100%)	<0.001**	<0.01	15	FISHER
	ECTOCERVICAL+	12	4(33%)	8(67%)				
	ENDOCERVICAL+	9	0(0%)	9(100%)				
	LIVRES	88	61(70%)	27(30%)				
EXTENSÃO GLANDULAR	AUSENTE	47	25(53%)	22(47%)	0.447			FISHER
	PRESENTE	66	40(61%)	26(39%)				
VOLUME DO CONE	NUMÉRICO	113	62	44	0.662			t STUDENT
			6.7±7.7	6.2±4				

\*\* Significa ter margem livre ou comprometida pela doença.

\*\* A margem esteve comprometida em 21% das pacientes estudadas.

(\*) significa número de pacientes não avaliáveis.

Avaliando-se o comprometimento das margens, elas estiveram comprometidas em 21% dos casos, ocorrendo em 83% das vezes no grupo estudo e em 17% no grupo controle. O índice global de evolução desfavorável (persistência, recidiva ou progressão da doença) nesse estudo foi de 14%.

O comprometimento das margens do produto de conização foi o único dado relativo ao tratamento cirúrgico realizado que correlacionou-se de forma significativa com a evolução desfavorável da NIC (figura 9).

## MARGENS EXCISIONAIS X GRUPOS

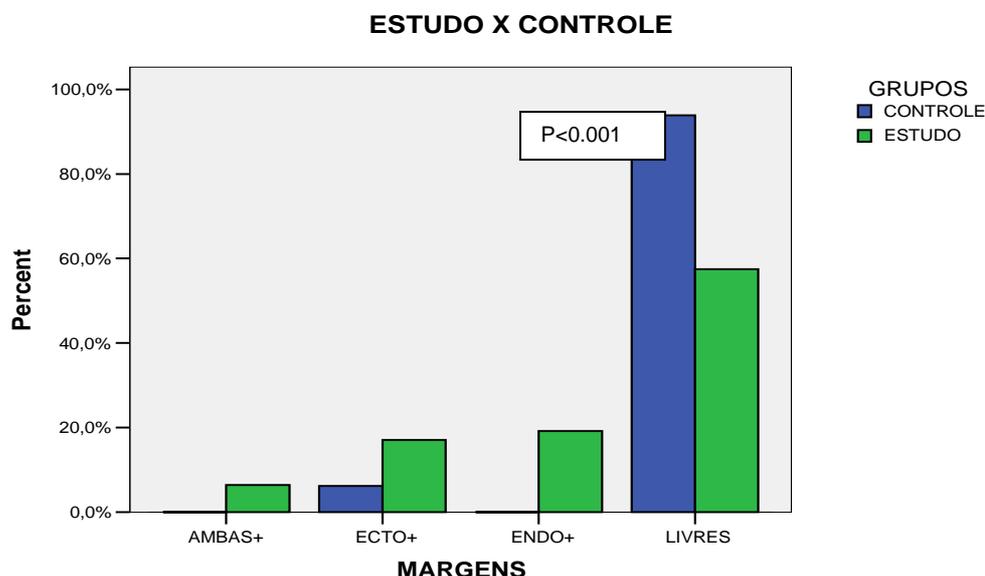


Figura 9- Análise das margens excisionais no produto de conização

A análise univariada dos dados epidemiológicos e anátomo-patológicos demonstrou serem fatores preditores de evolução desfavorável das NIC tratadas apenas as margens comprometidas do produto de conização. A soropositividade para HIV, a presença de lesão em vagina e a ocorrência de gestação pós-tratamento recente por conização mostraram tendência à positividade como fatores preditores de mau prognóstico, porém não atingiram valor de significância estatística devido ao pequeno número de casos.

A análise multivariada confirmou como fator epidemiológico relacionado à evolução desfavorável somente o comprometimento das margens no espécime cirúrgico.

Na análise dos imunomarcadores, cada qual foi avaliado individualmente para recidiva/ persistência da doença (evolução desfavorável) e cura clínica, além do grau de positividade dos mesmos imunomarcadores conforme a severidade da doença, tanto em análise qualitativa quanto quantitativa para cada imunomarcador (tabela 4).

TABELA 4- ANÁLISE DOS IMUNOMARCADORES

TIPOS DE ANÁLISE	IMUNORREACÇÃO	P53		P16	
		CONTROLE	ESTUDO	CONTROLE	ESTUDO
ANÁLISE GERAL	POSITIVO	28 (53%)	25 (47%)	27 (53%)	24 (47%)
	NEGATIVO	25 (70%)	11 (30%)	26 (68%)	12 (32%)
	SIGNIFICÂNCIA	P= 0,130		P= 0,191	
ANÁLISE QUANTITATIVA	DIFUSO (+)	10 (59%)	7 (41%)	19 (50%)	19 (50%)
	MULTIFOCAL INTENSO (+)	7 (50%)	7 (50%)	2 (67%)	1 (33%)
	MULTIFOCAL LEVE (+)	11 (50%)	11 (50%)	6 (60%)	4 (40%)
	NEGATIVO	25 (70%)	11 (30%)	26 (68%)	12 (32%)
ANÁLISE QUALITATIVA	FORTE (+)	15 (56%)	17 (44%)	10 (37%)	17 (63%)
	FRACO (+)	13 (50%)	13 (50%)	17 (71%)	7 (29%)
	NEGATIVO	26 (68%)	11 (31%)	26 (68%)	12 (32%)
VALOR PREDITIVO POSITIVO		47,17%		47,06%	
VALOR PREDITIVO NEGATIVO		69,44%		68,42%	

A p53 foi positiva em 47% (n=25) das pacientes do grupo estudo e em 53% (n=28) das pacientes do grupo controle, e da mesma forma, foi negativo em 70% (n=25) das pacientes do grupo controle e em 30% (n=11) do grupo estudo (figura 10) .

#### IMUNORREATIVIDADE P53 X GRUPOS

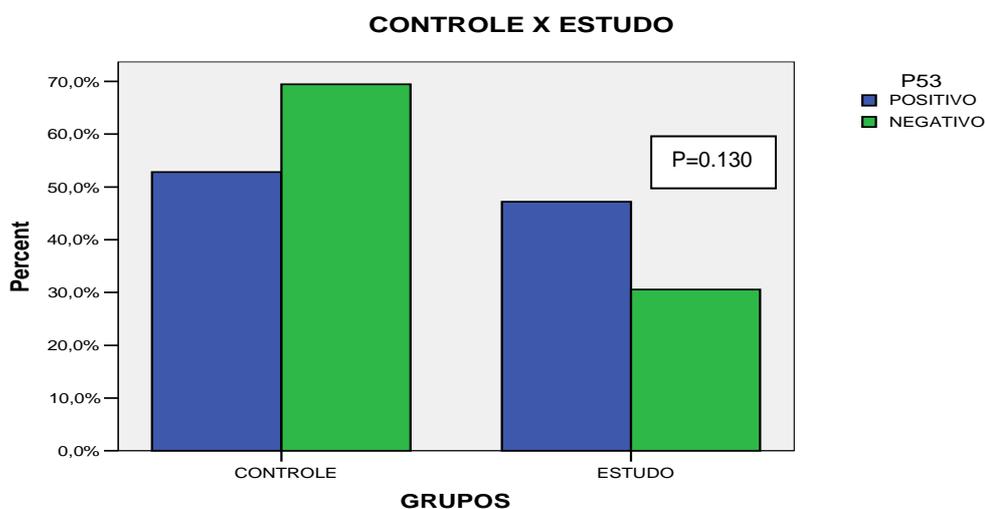


Figura 10 – Avaliação da positividade da p53 nos grupos

A p16 foi positiva em 47% (n=24) das pacientes do grupo estudo e em 52% (n=27) das pacientes do grupo controle. Em contraposto, foi negativa em 68% (n=26) das pacientes do grupo controle e 32% do grupo estudo (n=12) .(figura 11)

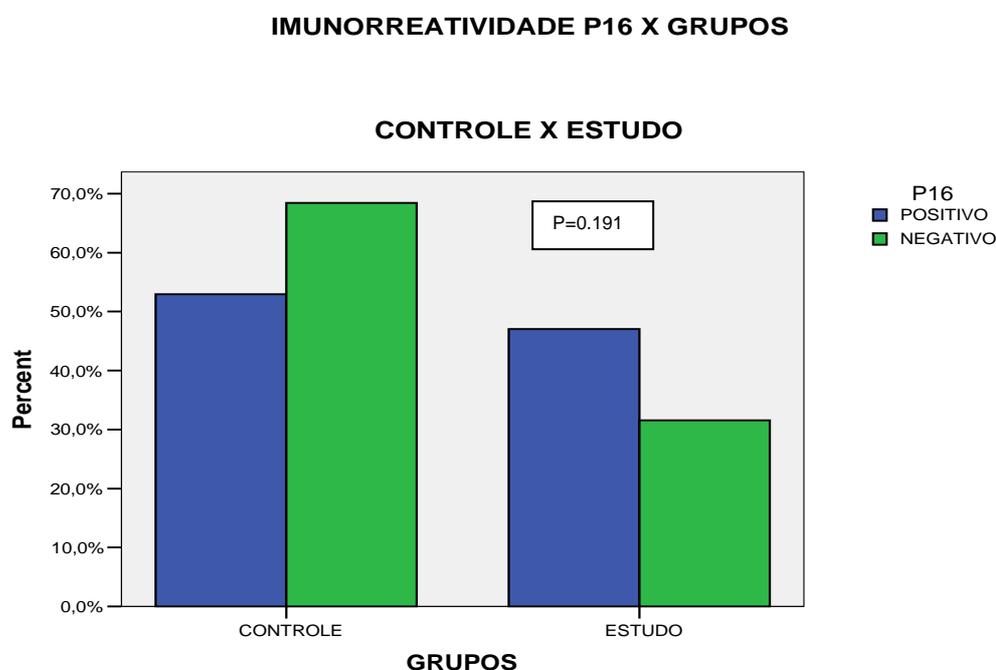


Figura 11 – Avaliação da positividade dap16 nos grupos

Baseado nesses dados para o P53, o valor preditivo positivo foi de 47% e o valor preditivo negativo 69%, quando o exame correlaciona evolução desfavorável com cura clínica. E para o p16, o valor preditivo positivo do exame foi 47% e o valor preditivo negativo 68%, na mesma situação.

Para ambos os imunomarcadores, o grau de positividade foi diretamente proporcional ao aumento do grau da NIC/ carcinoma invasor.

Quando se avalia a positividade do imunomarcador conforme o grau de NIC (NIC 1, NIC 2, NIC 3 e CEC invasor), pode-se ver que a positividade do p53 aumenta diretamente proporcional ao aumento do grau da NIC, pois enquanto a NIC 1 foi positiva somente em 33% dos casos, o carcinoma invasor apresentou um índice de positividade de 66% (figura 12).

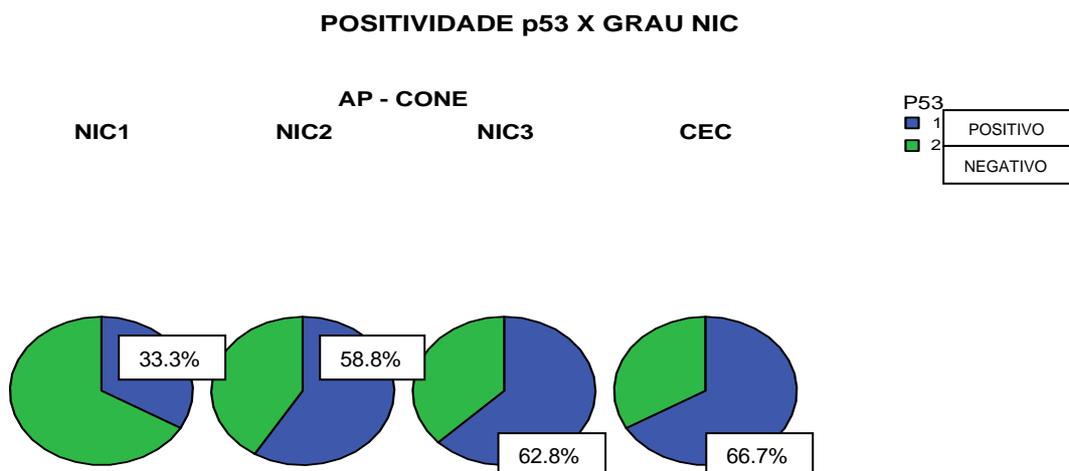


Figura 12 - Avaliação da expressão da p53 conforme o grau da NIC

Não houve diferença significativa na análise quantitativa da reação imunohistoquímica nem entre os grupos, nem para o grau da NIC para a p53.

Quando se comparou o grau de positividade do p16 conforme a severidade da NIC, obteve-se 33.3% de positividade na NIC 1 contra 66.7% no carcinoma invasor e 74.4% na NIC 3 (figura 13).

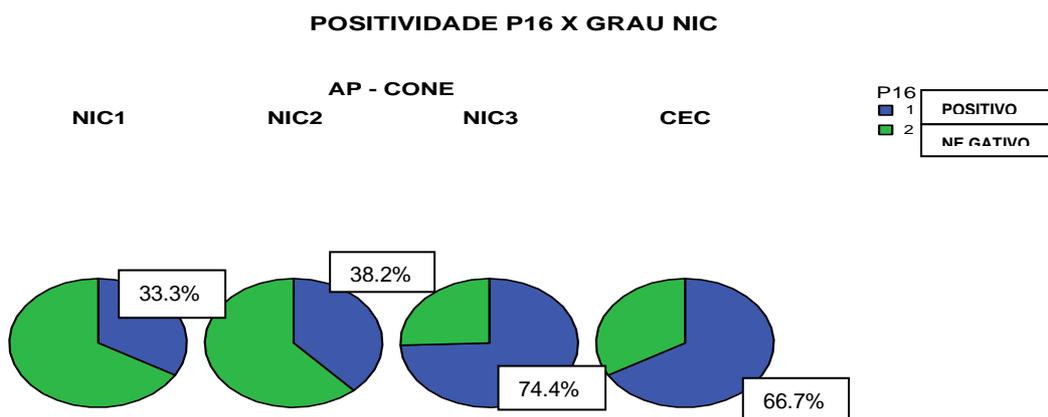


Figura 13- Avaliação da expressão da p16 conforme o grau da NIC

Quando se comparou o grau de positividade do p16 conforme o grau da NIC nos dois grupos estudados, identificou-se que, nas NIC 1, houve positividade de 33% tanto no grupo estudo quanto no grupo controle; nas NIC 2, houve positividade de 36% no grupo controle e 44% no grupo estudo e nas NIC 3, houve positividade de 76% no grupo controle e 83% no grupo estudo.

Na análise quantitativa do p16, o único padrão identificado com clareza de imunorreação, foi o que distinguiu entre forte, fraco e negativo, pois dentre os que exibiram reação forte, 63% deles estavam no grupo estudo, dos que exibiram reação fraca, 70.8% estavam no grupo controle e dos que exibiram reação negativa, 68.4% também estavam no grupo controle.

Quando avaliada a positividade do p16 em análise quantitativa pela diferenciação do grau da NIC, encontrou-se que em NIC 1, 100% das pacientes apresentaram reação negativa ou padrão de reatividade fraca (multifocal leve) e nenhuma reação forte; na NIC 2, 73,5% delas apresentaram reação negativa ou padrão de reatividade fraca e só 20.5% tiveram reação de padrão forte; já na NIC 3, 44.1% das pacientes apresentaram padrão de reação forte.

Quando comparados os grupos na análise quantitativa, identificou-se que 70% dos negativos estavam no grupo controle e que aqueles com padrão forte/ difuso/ corando núcleo e citoplasma, 61% deles estavam no grupo estudo.

## 6 DISCUSSÃO

Ao longo das últimas décadas, diversos estudos epidemiológicos e laboratoriais têm demonstrado que o carcinoma invasor do colo uterino é uma doença complexa, com muitos determinantes ambientais e genéticos<sup>38</sup>. Apesar do adequado tratamento da lesão precursora, a recorrência da NIC ocorrerá em média em 1 a 25% dos casos (podendo variar conforme tratamento realizado e população estudada), o que aumenta o risco para o câncer invasor<sup>30</sup>.

Os dados epidemiológicos relacionados à recidiva ou à persistência da doença pré-neoplásica apresentam-se de forma bastante variada na literatura, uma vez que a maioria dos estudos é retrospectivo, limitando a coleta de dados interferentes no sucesso e/ou falha do tratamento. Entretanto, os trabalhos que relacionam recorrência da doença cervical com persistência da infecção pelo vírus do HPV em altos índices, após a cirurgia de conização, são praticamente unânimes em afirmar que a infecção viral persistente é um fator de risco independente<sup>34,35,48</sup>.

Assim como nesse estudo, nos trabalhos avaliados, a idade não influenciou sobremaneira o resultado terapêutico definitivo, sendo boa parte deles muito semelhantes em relação à média de idade das pacientes observadas<sup>28-29,32-33,35</sup>.

Porém, Flannelly *et al.* encontraram um grupo específico de mulheres com idade superior a 50 anos e margens da conização comprometidas por lesão residual, que poderia identificar um grupo de maior risco para recorrência da lesão intra-epitelial tratada. Este resultado parece bastante lógico, pois nesse tipo de paciente, pelo fator idade e estado hormonal (menopausa), a junção escamo-colunar e conseqüentemente a zona de transformação do colo uterino estão muito próxima do canal endocervical e as lesões intra-epiteliais mais frequentemente adentram o canal endocervical, com maior chance de lesão residual por inadequada técnica de excisão da lesão ou lesão multifocal<sup>49</sup>.

Ao contrário de Flannelly *et al.* o estudo realizado não detectou maior risco de recorrência da doença nessa faixa etária específica, provavelmente por ser rotina na técnica de conização desenvolvida por esse serviço a retirada do canal

endocervical, onde se aloja grande parte das lesões residuais em pacientes menopausadas.

O hábito de fumar, nesse estudo, não foi fator preditor de mau prognóstico, dado este que foi validado por alguns autores, de forma retrospectiva e prospectiva, em seus estudos<sup>50,51,52</sup>. Contudo, Aclaudious *et al.* determinaram que ser fumante ou ex-fumante aumenta em três vezes o risco de falha terapêutica e que o tabagismo é um fator de risco independente que influencia a história natural da doença<sup>48</sup>.

Essa falta de unanimidade no que tange ao tabagismo como fator de risco independente para a persistência da doença pode ter relação direta com cada população estudada, levando em consideração a heterogeneidade genética de cada comunidade, associada ao perfil imunológico e aos hábitos de vida, que todos somados ao hábito de fumar podem determinar maior predisposição à evolução desfavorável.

O uso de contraceptivos orais, mais comumente os contraceptivos com formulações combinadas à base de estrogênio e progesterona, têm sido hipotetizados como sendo associados ao desenvolvimento de lesões pré-invasivas e câncer invasor. Entretanto, limitações nos estudos de investigação da relação do uso de anticoncepcional com a gênese da neoplasia cervical são relacionadas às doses e às formulações de cada contraceptivo<sup>11</sup>.

Muitos são os estudos que relacionam o uso do contraceptivo hormonal à etiopatogenia da neoplasia do colo uterino e suas lesões precursoras, porém escassos são os estudos que relacionam seu uso corrente à evolução da NIC e/ou carcinoma invasor.

Pesando todas as evidências disponíveis na atualidade, a Organização Mundial de Saúde não recomenda a alteração do uso ou da prática de prescrição dos contraceptivos hormonais em mulheres com NIC ou HPV positiva, uma vez que não há dados que suportem a contra-indicação nessas situações<sup>11</sup>.

Assim como Frega *et al.* esse estudo não encontrou correlação entre o uso de anticoncepcional hormonal e a persistência de lesão precursora, mas esse estudo teve a limitação de, por ser retrospectivo, não ter identificado pontualmente que tipo de formulação foi mais frequentemente usada por essas mulheres<sup>52</sup>.

Contudo, Mcfarlane-Anderson *et al.* relacionaram o uso da contracepção hormonal tanto com a presença de doença como com a severidade da NIC. Também concluíram em seu estudo que o uso do contraceptivo hormonal por mais de quatro anos aumentava o risco para a doença cervical como para a gravidade<sup>26</sup>.

Adam *et al.* ao avaliar fatores preditores de recorrência em mulheres submetidas a tratamento por CAF não encontraram associação entre a persistência de anormalidades citológicas pós-conização com o uso de contraceptivos hormonais<sup>53</sup>.

A infecção pelo vírus da imunodeficiência humana representa um importante problema de saúde pública a nível mundial. Atualmente, a presença de câncer cervical define o diagnóstico da síndrome da imunodeficiência humana em paciente portadora do vírus HIV, devido à alta prevalência e à incidência da infecção por HPV e de neoplasia intra-epitelial cervical em pacientes soropositivas para HIV<sup>29</sup>.

Uma mulher soropositiva tem duas a quatro vezes maior chance de infecção pelo HPV do que uma mulher soronegativa, e os índices de CD4 menor do que 200 e carga viral alta aumentam em três vezes o risco de co-infecção pelo HPV, quando comparado com uma mulher soronegativa<sup>29</sup>.

Corroboramos com os autores que associaram a recorrência e/ou progressão da doença cervical com a soropositividade do HIV, entretanto, o número de casos de mulheres soropositivas nesse estudo não foi suficiente para permitir a conclusão sobre HIV e a evolução desfavorável da NIC tratada e um estudo com maior número de casos seria necessário para confirmar tal tendência<sup>53-55</sup>.

Outros autores só evidenciaram essa associação conforme o *status* imune da paciente, ou seja, quando o CD4 era menor do que 200 ou apresentava carga viral elevada, o que também foi uma limitação desse estudo, por ser este um estudo retrospectivo e não ter detalhes sobre o grau de imunossupressão de cada paciente estudada<sup>28,29,53</sup>.

No que tange ao tratamento realizado para a NIC e o risco de doença residual, é quase unanimidade que o comprometimento das margens do cone é fator preditor de falha terapêutica. Alguns atribuem tanto à margem ectocervical quanto à margem endocervical a associação com persistência de doença<sup>33, 49, 56</sup>,

já outros atribuem somente à margem ectocervical essa correlação<sup>57</sup> e há ainda os que atribuem apenas à margem endocervical<sup>58,59</sup>.

Contudo, Costa *et al.* e Park *et al.* não encontraram associação entre o comprometimento das margens do produto de conização e a recorrência, o que provavelmente tem relação com a técnica de conização realizada associada ao perfil da paciente escolhida para o estudo, pois a maioria dos serviços que utiliza a técnica do CAF retira apenas a margem ectocervical e não faz a retirada do canal endocervical ou apenas utilizam a técnica do CAF para lesões pequenas e de menor gravidade, o que poderia ter relação com um risco de recorrência menor<sup>35,60</sup>.

Figueiredo *et al.* num estudo no qual avaliaram a presença de lesão residual de NIC e/ ou carcinoma de colo uterino em peças de histerectomia de pacientes previamente conizadas (técnica clássica ou CAF), observaram que 28.8% das mulheres com achado de NIC 3 na biópsia de colo apresentaram carcinoma microinvasor ou invasor no cone e que essas mesmas pacientes apresentaram comprometimento das margens do cone entre 28 a 49% das vezes<sup>31</sup>.

Da mesma forma, Maluf *et al.*, estudando a recorrência em pacientes submetidas à histerectomia após conização clássica, observaram que a margem endocervical estava comprometida em um percentual maior que a margem ectocervical dessas mesmas pacientes, e que a recorrência esteve presente em 53.8% das pacientes com margens comprometidas *versus* 12.9% daquelas com margens livres<sup>33</sup>.

Entretanto, num estudo semelhante na Tailândia, apenas a margem ectocervical comprometida foi observada como fator preditivo de doença residual em pacientes submetidas a histerectomia pós conização, e discute a questão da multifocalidade da neoplasia intra-epitelial cervical como provável causa para este achado<sup>57</sup>.

Mais recentemente, também na Tailândia, outro estudo semelhante, concluiu que a presença de envolvimento endocervical extenso da margem do cone é um forte preditor de doença residual, porém esse estudo avaliou pacientes com média de idade de 48.6 anos, o que explica tal achado, uma vez que pacientes menopausadas vão apresentar a junção escamo-colunar adentrando ou

totalmente interna ao canal endocervical, o que aumenta risco de doença residual presente na margem endocervical<sup>58</sup>.

Para Ramchandani *et al.* os fatores preditores de doença persistente e/ou recorrente, observados em seu estudo, foram a severidade da doença e o comprometimento da margem endocervical, mas discutem como limitação do estudo o fato do mesmo ser retrospectivo e apresentar grande perda de seguimento entre as pacientes estudadas<sup>59</sup>.

Em outro estudo retrospectivo de análise da persistência ou recorrência da neoplasia intra-epitelial cervical em pacientes submetidas à conização, de forma similar a este aqui realizado, Park *et al.* observaram um índice de recorrência de 4.2%. Concluíram que a técnica de conização, o *status* da margem, a presença de extensão glandular e dados epidemiológicos como idade e paridade não tinham relação com a evolução desfavorável e sim, a detecção de altos níveis de DNA HPV de alto risco oncogênico na pré-conização<sup>35</sup>.

Semelhante ao estudo aqui desenvolvido, Lima *et al.* concluíram que os fatores de risco associados à recidiva das lesões intra-epiteliais cervicais foram soropositividade para HIV, ocupação glandular e comprometimento das margens da conização<sup>36</sup>.

Dentro da mesma linha de pesquisa, Adam *et al.* observaram índices extremamente altos de persistência de NIC em mulheres soropositivas para HIV e a presença de doença residual nas margens da conização após a cirurgia de conização por CAF e concluíram que seguimento mais intensivo deveria ser oferecido a pacientes com margens comprometidas e soropositivas com contagem de CD4 menor que 500, porém, para o mesmo, permanecia duvidoso se mulheres com NIC persistente estão em maior risco de progressão para carcinoma invasor<sup>53</sup>.

Nos parece, levando em consideração os resultados do presente estudo, que ambas as margens são igualmente importantes no risco de recorrência, pois o grande percentual de margens livres esteve presente no grupo controle e as comprometidas no grupo controle. Além disso, quando a técnica de conização obedece um adequado rigor técnico, normalmente a margem ectocervical e/ou endocervical ficam comprometidas por doença residual quando a lesão é muito extensa ou muito profunda, o que sugere doença de maior gravidade.

Determinar o risco de desenvolvimento e o prognóstico, bem como o sucesso do tratamento em resposta a uma determinada medicação e/ou procedimento, constituem a principal razão para a identificação de marcadores biológicos ou biomarcadores<sup>41</sup>.

Muitos estudos recentes têm verificado a importância da p16 na neoplasia cervical. Em sua grande maioria avaliaram o percentual de positividade do imunomarcador em relação à presença de neoplasia intra-epitelial cervical e correlacionaram com a gravidade da lesão<sup>41-43,45,47,61-67</sup>.

Verificou-se, nesse estudo, um aumento gradativo da positividade da p16 diretamente proporcional ao grau de NIC, sendo que na NIC 1 encontrou-se apenas 33% de positividade enquanto que na NIC 3, 74.4%. A positividade forte e difusa foi encontrada em 44% das lesões de alto grau. Keating *et al.* encontraram percentual de positividade maior, com 100% de positividade em lesões intra-epiteliais de alto grau, porém correlacionou essa positividade com a presença de HPV de alto risco oncogênico, mostrando uma forte associação entre positividade difusa e forte e lesões por HPV de alto risco<sup>61</sup>.

Da mesma forma, Keating *et al.* encontraram positividade difusa em 70.2% dos casos de lesão de alto grau e 37.5% das lesões de baixo grau e que 84.8% da positividade difusa da p16 esteve relacionada à presença de HPV de alto risco oncogênico<sup>59</sup>. Outros autores atuais corroboram os dados de aumento de percentual de positividade da p16 com o aumento do grau da NIC<sup>63-65</sup>.

Nesse estudo, pôde-se ver a positividade maior da p16 nas pacientes cuja evolução da NIC 3 foi desfavorável (76% de positividade para p16 nas NIC 3 do grupo controle, enquanto no grupo estudo chegou a 83% de positividade), o que pode correlacionar-se com o tipo de HPV que causou cada lesão, uma vez que tipos diferentes de HPV podem apresentar graus diferentes de imunoexpressão, conforme afetam cada indivíduo diferentemente, mas que é uma limitação dessa pesquisa, uma vez que não foi tipado HPV no presente estudo.

Comparando os dois grupos ora estudados, não se evidenciou diferença significativa na positividade da p16 entre o grupo controle (52.9%) e o grupo estudo (47.1%), porém a positividade comparativa nos dois grupos, no mesmo grau de NIC foi maior no grupo estudo; e 61% dos casos com positividade forte e difusa estavam no grupo com evolução desfavorável, sugerindo que um estudo com maior número de casos talvez possa confirmar esse padrão de marcação da

p16 como próprio de evolução desfavorável e/ou infecção transformante por HPV de alto risco.

Klaes *et al.*, avaliando o grau de concordância interobservadores na avaliação imunohistoquímica para p16 de pacientes com NIC e comparando com o grau de concordância entre biópsias das mesmas pacientes, concluíram que a p16 usada de rotina pode reduzir o percentual de discordância interobservador na interpretação de lesões cervicais e melhorar a acurácia da detecção das lesões de alto grau e das lesões de baixo grau associada com a infecção progressiva por HPV de alto risco<sup>62</sup>.

Agoff *et al.* encontraram 57% de positividade do p16 na NIC 1, 75% na NIC 2, 91% na NIC 3 e em 89% dos carcinomas invasivos. Comparando seus dados com Keating *et al.*, discutiram a questão de que o HPV de baixo risco oncogênico, por ter menor afinidade pela proteína Rb pode não apresentar superexpressão da p16 e que diferentes estágios da neoplasia cervical induzida por HPV de baixo ou alto risco pode evidenciar diferentes níveis de expressão da p16<sup>61,63</sup>.

Nessa análise dos imunomarcadores pôde-se detectar que, embora não tenha havido significância estatística na positividade dos mesmos em relação à cura clínica e à evolução desfavorável, quando estes eram negativos, a chance da doença persistir ou progredir era substancialmente menor do que quando eram positivos, determinando um alto valor preditivo negativo para o imunomarcador p16.

Wang *et al.* generalizando os dados de seu estudo para uma coorte de 10.000 mulheres, encontraram um valor preditivo positivo de 13.9% da p16 nas NIC3 e um valor preditivo negativo de 100%, concluindo, por esses dados, que estudos futuros ainda são necessários para avaliar quando o manejo clínico deve ser modificado, baseado nos resultados da positividade da p16, em mulheres<sup>64</sup>.

Nam *et al.*, em um dos poucos estudos que avalia a expressão da p16 como fator prognóstico das NIC tratadas, encontraram positividade de 29% em NIC 1, 39% em NIC 2 e 64% em NIC 3 com evolução favorável e, em contrapartida, 25% de positividade na NIC 1, 28% na NIC 2 e 44% na NIC 3 com recorrência. Atribuíram esses baixos índices de positividade na recorrência relacionados à baixa expressão da p16 e da pRb simultaneamente e ao aumento de cdk4, resultando em altos índices de recorrência<sup>45</sup>.

Em sua meta-análise, O'Neill *et al.* ponderaram que nos últimos anos, a p16 tem sido extensivamente estudada como auxílio diagnóstico em vários cenários da doença ginecológica. Assim como muitos marcadores, a p16 não é 100% sensível e específica para todas as lesões. Entretanto, há muitas áreas em que indubitavelmente se reconhece seu valor, frequentemente em combinação com outros marcadores, o que inclui a identificação de lesões de alto grau focal do colo uterino e a separação de lesões de alto grau de lesões benignas, mimetizando o alto grau<sup>43</sup>.

Tsompou *et al.*, em outra meta-análise mais recente, concluíram que apesar das boas evidências da correlação da severidade da infecção pelo HPV com a positividade da p16, sua reprodutibilidade ainda é insuficiente para padronizá-lo na prática clínica<sup>41</sup>.

Avaliando-se os dados encontrados de positividade da p53 no presente estudo, identificou-se um aumento diretamente proporcional ao grau de positividade da p53 com o grau da NIC, sendo que a NIC 1 foi positiva em apenas 33.3% dos casos e a NIC 3 em 62.8% dos casos.

Entretanto, quando se avalia a positividade no grupo controle e no grupo estudo, a p53 foi positiva em 52.8% dos cortes histológicos do grupo controle e em 47.2 % do grupo estudo e não se encontrou nenhum padrão mais frequente de positividade na análise quantitativa do imunomarcador, reforçando a idéia de alto valor preditivo negativo e baixo valor preditivo positivo desse imunomarcador, semelhante ao da p16, ou seja, quando o marcador é negativo a chance de ocorrer evolução desfavorável da NIC pós-conização é muito pequena, mas quando é positivo, não dá para prever a sua evolução, a não ser pelo seguimento clínico.

De forma semelhante, Akasofu e Oda encontraram 29% de positividade na NIC 1, 45% na NIC 2, 86% na NIC 3 e 87% no carcinoma invasor e concluíram que seus dados sugeririam que a inativação da p53 ou sua alteração pela infecção do HPV precede o desenvolvimento dos tumores<sup>68</sup>.

Jeffers *et al.*, entretanto, encontraram positividade da p53 tanto em tecido normal quanto em lesões precursoras e não identificaram relação de aumento direto do grau de positividade da p53 com o grau da NIC (62% no tecido normal, 38% na NIC 1, 21% na NIC 2 e 59% na NIC 3)<sup>69</sup>.

Estudando as lesões intra-epiteliais de baixo grau, Giannoudis e Herrington concluíram que a expressão da p53 em lesões de baixo grau aumenta progressivamente em infecções por HPV de baixo grau e se expressa menos, proporcionalmente, em infecções por HPV de intermediário e alto risco oncogênico, fato que pode estar relacionado às diferentes funções da proteína E6 conforme o tipo de HPV e a degradação da p53<sup>70</sup>.

Cheah e Looi encontraram maior positividade da p53 nas lesões de baixo grau do que nas lesões de alto grau (100% de positividade na NIC 1 e 74% na NIC 2 e 3 e 70% no carcinoma invasor), porém observaram positividade diferente nos terços do epitélio conforme o grau da NIC (expressão confinada ao terço inferior do epitélio na NIC 1 e até o terço superior na NIC)<sup>71</sup>.

Mittal *et al.* encontraram positividade da p53 semelhante a desse estudo, conforme o grau de positividade da NIC e também nos condilomas, no carcinoma escamoso e adenoescamoso e não no adenocarcinoma, concluindo, por seus dados, que alterações na p53 exercem um importante papel na patogênese do carcinoma escamoso cervical, porém a expressão da p53 não é suficiente para concluir sobre a carcinogênese cervical<sup>72</sup>.

De maneira semelhante ao nosso estudo, Wang *et al.* e Bragança *et al.* estudaram simultaneamente a positividade da p16 e da p53 nas lesões cervicais HPV-induzidas, encontraram altos percentuais de positividade da p16 relacionadas às lesões de alto grau de colo uterino; entretanto, Wang *et al.*, assim como nesse estudo, encontraram aumento de positividade da p53 diretamente proporcional ao grau da NIC enquanto Bragança *et al.* não encontraram nenhuma relação da expressão da p53 com o grau da NIC ou do *status* do HPV<sup>43,47</sup>.

Levando em consideração todos esses dados, parece que a expressão tanto da p16 quanto da p53, em biópsias de conização, evidenciam fortemente a relação da gravidade da infecção do HPV com o desenvolvimento da neoplasia intra-epitelial cervical, mas em virtude de alguns dados conflitantes entre os trabalhos, ainda não se pode utilizá-los de forma primária no rastreamento das lesões precursoras cervicais e do câncer da cérvix uterina.

Baseados nestes dados, a colpocitologia oncótica ainda não pode ser substituída como método isolado no rastreamento e no seguimento das lesões precursoras tratadas, porém biomarcadores como estes aqui estudados poderiam

ser somados a ela no intuito de melhorar a acurácia do diagnóstico e do seguimento.

Embora estes dados pareçam demonstrar uma boa relação da gravidade das neoplasias intra-epiteliais cervicais com a expressão destes imunomarcadores, não se pode ainda identificá-los como marcadores ideais, pois não conseguem confirmar todos os casos positivos e nem excluir todos os casos negativos para gravidade da doença.

Contudo, para os mesmos biomarcadores, o alto valor preditivo negativo poderia ser melhor investigado em estudos futuros, com o intuito de determinar quais pacientes necessitariam ser submetidas a maior rigor de seguimento.

## **7 CONCLUSÕES**

Os biomarcadores p16 e p53 não estiveram relacionados à evolução desfavorável das neoplasias intra-epiteliais cervicais tratadas por conização, mas apresentaram alto valor preditivo negativo no que concerne à persistência de doença HPV do colo uterino.

A evolução da neoplasia intra-epitelial cervical tratada por conização foi desfavorável apenas nas pacientes com margens excisionais comprometidas no produto de conização.

## REFERÊNCIAS

1. WHO. Cervical Cancer. Internet. Disponível:  
<http://www.who.int/reproductivehelth/topics/cancers/en>. Acesso em 24 mar 2011.
2. WHO Cervical Cancer. Internet. Disponível:  
<http://www.paho.org/english/ad/dpc/nc/accp.htm>. Acesso em 24 mar 2011.
3. Trimble EL, Harlan LC, Gius D, Stevens J, Schwartz SM. Patterns of care for women with cervical cancer in the Unites States. *Cancer*. 2008; 113 (4): 743-49.
4. INCA. Câncer de colo uterino / taxas brutas de incidência, estimativa 2008. Internet. Disponível:  
<http://www.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colo-utero/definicao>. Acesso em: 24 mar 2011.
5. WHO. Effective screening programmes for cervical cancer in low and middle income developing countries. Internet. Disponível:  
<http://www.who.int/en/>. Acesso em 02 jul 2009.
6. Villa LL. HPV: um monstro prestes a ser controlado [editorial]. *J bras Doenças Sex Transm*. 2008; 20 (2):71-2.
7. Villa LL. Human Papillomaviruses and cervical cancer. *Adv Cancer Res*. 1997; 71: 321-41.
8. Muñoz N, Bosch FX. HPV and cervical neoplasia: review of case-control and cohort studies. *IARC Sci Publ*. 1992; (119): 251- 61.
9. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV *et al*. Human Papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathol*. 1999; 189(1):12-9.
10. Moscicki AB, Shiboski S, Broering J, Powel K, Clayton L, Jay N, *et al*. The natural history of Human Papillomavirus infection as measured by repeated DNA testing in adolescent and young women. *J Pediatr*. 1998; 132(2): 277-84.

11. IARC. International Agency for Research on Cancer Monographs of evaluation of carcinogenetic risks to humans. Lyon, France. 1995; 49: 1409-1995. Disponível em: <http://www.who.int/en/>. Acesso em 02 jul 2009.
12. Roteli-Martins CM, Carvalho NS, Naud P, Teixeira J, Borba P, Derchain S *et al*. Prevalence of Human papillomavirus infection and associated risk factors in young women in Brasil, Canada, and the United States: a multicenter cross-sectional study. *Int J Gynecol Pathol*. 2011; 30(2): 173-184.
13. Frazer I. Correlating immunity with protection for HPV infection. *Inter. J Infec Dis*. 2007; 11 (supplement 2): S10-S16.
14. Zur Hausen H. Viruses in human cancers. *Science*. 1991; 254(5035):1167-73.
15. Zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Can Inst*. 2000; 92 (9):690-8.
16. Silva TT. Fatores de risco para neoplasia intra-epitelial cervical em pacientes submetidas à avaliação morfológica e pesquisa de DNA-HPV [dissertação de mestrado]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco; 2004.
17. Campaner AB, Santos RE, Galvão MAL. Importância do tabagismo na carcinogênese do colo uterino. *Femina*. 2007; 35(11):713-17.
18. Ostör AG. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int J Gynecol Pathol*. 1993; 12(2):186-92.
19. Kjellberg L, Hallmans G, Ahren AM, Johansson R, Bergman F, Wadell G *et al*. Smoking, diet, pregnancy and oral contraceptive use as risk factors for cervical intra-epithelial neoplasia in relation to human papillomavirus infection. *Br J Cancer*. 2000; 82 (7):1332-8.
20. Harris TG, Kulasingam SL, Kiviat NB, Mao C, Agoff SN, Feng Q *et al*. Cigarette smoking, oncogenic human papillomavirus, Ki-67 antigen, and cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Epidemiol*. 2004; 159(9):834- 42.
21. Sierra-Torres CH, Acosta-Aragón MP, Orejuela-Aristizabal L. Papilomavirus y factores asociados a neoplasia intraepitelial cervical de

- alto grado en Cauca, Colombia. Rev. Salud Pública (Bogota). 2006; 8 Supp 1: 47-58.
22. Tsai HT, Tsai YM, Yang SF, Wu KY, Chuang HY, Wu TN *et al.* Lifetime cigarette smoke and second-hand smoke and cervical intraepithelial neoplasm- a community-based case-control study. *Gynecol Oncol.* 2007; 105(1):181-8.
23. Sarian LO, Hammes LS, Longatto Filho A, Guarisi R, Derchain SF, Roteli-Martins C, *et al.* Increased risk of oncogenic Human Papillomavirus infections and incident high-grade cervical intraepithelial neoplasia among smokers. *Sex Transm Dis.* 2009; 36 (4):241-8.
24. Yoshikawa H, Nagata C, Noda K, Nozawa S, Yajima A, Sekiya S *et al.* Human papillomavirus infection and other risk factors for cervical intraepithelial neoplasia in Japan. *Br J Cancer.* 1999; 80(3/4):621-4.
25. Schiff M, Becker MT, Masuk M, Asselt-King L, Wheeler CM, Altobeli KK *et al.* Risk factors for cervical intraepithelial neoplasia in Southwestern American indian women. *Am J Epidemiol.* 2000; 152(8):716-26.
26. Syrjänen K, Shabalova I, Petrovichev N, Kozachenko V, Zakharova T, Pajanidi J *et al.* Smoking is an independent risk factor for oncogenic human papillomavirus (HPV) infections but not for high-grade CIN. *Eur J Epidemiol.* 2007; 22(10):723-35.
27. McFarlane-Anderson N, Bazuaye PE, Jackson MD, Smikle M, Fletcher HM. Cervical dysplasia and cancer and the use of hormonal contraceptives in Jamaican women. *BMC Womens Health.* 2008; 8:9. Published online 2008 May 30. doi: 10.1186/1472-6874-8-9. Acesso em 15 nov 2010.
28. De Villiers EM. Relationship between steroid hormone contraceptives and HPV cervical intraepithelial neoplasia and cervical carcinoma. *Int J. Cancer.* 2003; 103(6):705-8.
29. Russomano F, Reis A, Camargo MJ, Grinszlej B, Tristão MA. Recurrence of cervical intraepithelial neoplasia grades 2 or 3 in HIV-infected women treated by large loop excision of the transformation zone (LLETZ). *Sao Paulo Med J.* 2008; 126(1): 17-22.
30. Leitao MM, White P, Cracchiolo B. Cervical cancer in patients infected with the human immunodeficiency virus. *Cancer.* 2008; 112(12):2683-89.

31. Wright Jr TC, Massad S, Dunton JC, Spitzer M, Wilkinson EJ, Solomon DD. 2006 Consensus guidelines for the management of women with cervical intraepithelial neoplasia or adenocarcinoma in situ. *AJOG*, 2007, October: 340-345, Available from: [www.AJOG.org](http://www.AJOG.org). Acesso em 08 set 2009.
32. Figueiredo PG, Gontijo C, Derchain SFM, Nakano FY, Teixeira JC, Martinez EZ. Carcinoma microinvasor no cone pós-biópsia dirigida compatível com nic3. *RBGO*. 2002; 24(1):37-43.
33. Duggan BD, Felix JC, Muderspach LI, Gebhardt JA, Groshen S, Morrow P, Roman LD. Cold-knife conization versus conization by loop electrocautery excision procedure: a randomized, prospective study. *Am J Obstet Gynecol*. 1990; 180(2 Pt 1):276-82.
34. Maluf PJ, Adad SJ, Murta EF. Outcome after conization for cervical intraepithelial neoplasia grade III: relation with surgical margins, extension to crypts and mitoses. *Tumori*. 2004; 90(5):473-7.
35. Nagai Y, Maehama T, Asato T, Kanazawa K. Persistence of human papillomavirus infection after therapeutic conization for CIN 3: is it an alarm for disease recurrence? *Gynecol Oncol*. 2000; 79(2):294-9.
36. Park JY, Lee KH, Dong SM, Kang S, Park SY, Seo SS. The association of pre-conization high-risk HPV load and the persistence of HPV infection and persistence/recurrence of cervical intraepithelial neoplasia after conization. *Gynecol Oncol*. 2008; 108(3):549-54.
37. Lima MIM, Melo VH, Tafuri A, Labanca AC, Lima LM. Fatores de risco de recidiva de lesões intra-epiteliais cervicais após conização por cirurgia de alta frequência em mulheres portadoras e não portadoras do vírus da imunodeficiência humana. *RBGO* 2006; 28(9):536-44.
38. Sarian LO, Derchain SFM, Bastos JFB. Métodos diagnósticos para o rastreamento do câncer de colo [editorial]. *RBGO*. 2010; 32(8):363-7.
39. Termini L, Villa LL. Biomarcadores na triagem do câncer do colo uterino. *J bras Doenças Sex transm*. 2008; 20 (2):125-31.
40. Nomelini RS, Barcelos ACM, Michelin MA, Adad SJ, murta EFC. Prevenção do câncer de colo uterino: testes biomoleculares para HPV. *Femina*. 2007; 35(5): 295-99.

41. Ekalaksananan T, Pientog C, Sriamporn S, Kongyngyoes B, Pengsa P, Kleebkaow P *et al.* Usefulness of combining testing for p16 protein and human papillomavirus (HPV) in cervical carcinoma screening. *Gynecol Oncol.* 2006; 103(1):62-6.
42. Tsoumpou I, Arbyn M, Wentzensen N, Koliopoulos G, Martin-Hirsch P, Malamou-Mitsi V, Paraskevaidis E. p 16 (INK4a) immunostaining in cytological and histological specimens from the uterine cervix: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Treat Rev.* 2009; 35(3):210-20.
43. Wang JL, Zheng BY, Li XD, Angstrom T, Lindstrom MS, Wallin KL. Predictive significance of the alterations of p16INK4A, p14ARF, p53 and proliferating cell nuclear antigen expression in the progression of cervical cancer. *Clin Cancer Res.* 2004; 10(7):2407-14.
44. O'Neill CJ, McCluggage WG. P16 expression in the female genital tract and its value in diagnosis. *Adv Anat Pathol.* 2006; 13(1): 8-15.
45. Nam EJ, Kim JW, Kim SW, Kim YT, Kim JH, Yoon BS, *et al.* The expressions of the Rb pathway in cervical intraepithelial neoplasia: predictive and prognostic significance. *Gynecol Oncol.* 2007; 104: 207-11.
46. From Wikipedia. P53. Internet. Disponível : <http://en.wikipedia.org/wik/53>. Acesso em 12.set.2010.
47. Bragança JF, Sarian LO, Pitta DR, Maito AB, Vassalo J, Pignataro F *et al.* Expression of p16 INK4a and cervical infection with high-risk human papillomaviruses are not related to p53 activity in cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Gynecol Cancer.* 2008; 18(5):1060-4.
48. Acladios NN, Sutton C, Mandal D, Hopkins R, Zaklama M, Kitchener H. Persistent human papillomavirus infection and smoking increase risk of failure of treatment of cervical intraepithelial neoplasia (CIN). *Int J Cancer.* 2002; 98(3):435-9.
49. Flannelly G, Bolger B, Fawzi H, De Lopes AB, Monaghan LM. Follow up after LLETZ: could schedules be modified according to risk of recurrence? *BJOG.* 2001; 108(10):1025-1030.
50. Roupa Z, Sapountzi-Krepia D, Binioris S, Gourni M, Faros E, Darivakis S *et al.* Risk factors for cervical intraepithelial neoplasia (CIN) among

- women living in the greater area of Athens and Piraeus, Greece. *ICUs and Nursing Web Journal*. 2002; 10: 1-15.
51. Paraskevoidis E, Kalantaridou SN, Paschopoulos M, Zikopoulos K, Daikomanolis E, Dalkalitsis N, *et al*. Factors affecting outcome after incomplete excision of cervical intraepithelial neoplasia. *Eur J Gynaecol. Oncol*. 2003; 24(6): 541-43.
52. Frega A, Stentella P, De Ioris A, Piazzè JJ, Fambrini M, Marchionni M *et al*. Young women, cervical intraepithelial neoplasia and human papillomavirus: risk factors for persistence and recurrence. *Cancer Letters*. 2003; 196(2):127-34.
53. Adam Y, van Gelderen CJ, Bruyn G, McIntyre JA, Turton DA, Martinson NA. Predictors of persistent cytologic abnormalities after treatment of cervical intraepithelial neoplasia in Soweto, South Africa: a cohort study in a HIV high prevalence population. *BMC Cancer*. 2008. 8: 211 doi: 10.1186/1471-2407-8-211.
54. Chirenje ZM, Rusakaniko S, Akino V, Munjoma M, Milingo M. Effect of HIV disease in treatment outcome of cervical squamous intraepithelial lesions among Zimbabwean women. *J Low Genit Tract Dis*. 2003; 7(1):16-21.
55. Foulot H, Heard I, Potard V, Costagliola D, Chaperon C. Surgical management of cervical intraepithelial neoplasia in HIV-infected women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2008; 141(2):153-7.
56. Lima MI, Tafuri A, Araújo AC, Lima LM, Melo VH. Cervical intraepithelial neoplasia recurrence after conization in HIV-positive and HIV-negative women. *Inter J Gynaecol Obstet*. 2009; 104(2):100-4.
57. Natee J, Therasakvichaya S, Boriboonhirunsarn D. Prevalence and risk factors for residual cervical neoplasia in subsequent hysterectomy following LEEP or conization. *J Med Assoc Thai*. 2005; 88(10):1344-8.
58. Kietpeerakool C, Khunamornpong S, Srisomboon J, Siriaunkgul S, Suprasert J. Cervical intraepithelial neoplasia II-III with endocervical cone margin involvement after cervical loop conization: is there any predictor for residual disease? *J. Obstet Gynaecol Res*. 2007; 33(5):660-4.

59. Ramchandani SM, Houck KL, Hernandez H, Gaughan LP, Roth A. Predicting persistent/ recurrent disease in the cervix after excisional biopsy. *Med Gen Med.* 2007; 9(2):24-35.
60. Costa S, De Nuzzo M, Infante FE, Bonavita B, Marinelli M, Rubino A *et al.* Disease persistence in patients with cervical intraepithelial neoplasia undergoing electrosurgical conization. *Gynecol Oncol.* 2002; 85(1):119-24.
61. Keating JT, Cviko A, Reithdorf S, Reithdorf L, Quade BJ, Sun D *et al.* ki-67, cyclin E, and p16<sup>INK4</sup> are complimentary surrogate biomarkers for human papilloma virus-related cervical neoplasia. *Am J Surg Pathol.* 2001; 25(7):884-91.
62. Klaes R, Benner A, Friedrich T, Ridder R, Herrington S, Jenkins D *et al.* p16<sup>INK4a</sup> immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol.* 2002; 26(11):1389-98.
63. Agoff SN, Lin P, Morihara J, Mao C, Kiviat NB, Koutsky LA. P16<sup>INK4a</sup> expression correlates with degree of cervical neoplasia: a comparison with Ki-67 expression and detection of high-risk HPV types. *Mod Pathol.* 2003; 16(7):665-73.
64. Wang SS, Trunk M, Schiffman M, Herrero R, Sherman ME, Burk RD *et al.* Validation of p16<sup>INK4a</sup> as a marker of oncogenic human papillomavirus infection in cervical biopsies from a population-based cohort in Costa Rica. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004; 13(8): 1355-60.
65. Lorenzato M, Caudroy S, Bornner C, Evrad G, Simon M, Durlach A *et al.* Cell cycle and/ or proliferation markers: what is the best method to discriminate cervical high-grade lesions? *Human Pathol.* 2005; 36(10):1101-7.
66. Giraldo PC, Eleutério Jr J, Cavalcante DIM, Ferreira FVA. Lesões pré-invasivas da cérvix- marcadores diagnósticos e prognósticos. *Femina.* 2007; 35(3):149-53.
67. Queiroz C, Silva TC, Alves VAF, Villa LL, Costa MC, Travassos AG, *et al.* p16<sup>INK4a</sup> expression as a potential prognostic marker in cervical pre-neoplastic and neoplastic lesions. *Pathol Res Pract.* 2006; 202(2):77-83.

68. Akasofu M, Oda Y. Immunohistochemical detection of p53 in cervical epithelial lesions with or without infection of human papillomavirus types 16 and 18. *Virchows Arch.* 1995; 425(6):593-602.
69. Jeffers MD, Richmond J, Farquharson M, McNicol AM. p53 immunoreactivity in cervical intraepithelial neoplasia and non-neoplastic cervical squamous epithelium. *J Clin Pathol.* 1994; 47(12):1073-6.
70. Giannoudis A, Herrington CS. Differential expression of p53 and p21 in low grade cervical squamous intraepithelial lesions infected with low, intermediate, and high risk human papillomaviruses. *Cancer.* 2000; 89(6): 1300-7.
71. Cheah PL, Looi LM. P53 immunohistochemical expression: messages in cervical carcinogenesis. *Pathology.* 2002; 34(4):326-31.
72. Mittal KR, Lin O, Chan W, Goswami S, Demopoulos RI. Cervical squamous dysplasias and carcinomas with immunodetectable p53 frequently contain HPV. *Gynecol Oncol.* 1995; 58(3):289-94.

## SUMMARY

**Purpose:** Evaluate the ability of various factors to predict recurrence or persistence disease, after therapeutic conization on CIN 2 and 3 and the clinical significance of p16<sup>INK4a</sup> and p53 in tumor progression. **Methods:** A retrospective review was conducted of patients who had undergone conization due to CIN 2 and 3, from January 1999 to January 2006 at Erasto Gaertner Hospital, Brazil. Univariate and multivariate analysis were utilized to define the predictive factors of recurrence of disease. Chi Square test were used for statistical analysis and p value less than or equal 0.05. **Results:** 113 women, between 16 to 86 years old ( $35 \pm 11.7$ ), divided in two groups: 48 patients with recurrence/progression of CIN (case group) and 65 without recurrence/progression of disease (control group). Recurrence rate was 14.6%. Only conization positive margins were predictors of recurrence/progression ( $p < 0.05$ ). The biological markers p16<sup>INK4a</sup> and p53 were not related to recurrence, however overexpression of both was significantly higher in CIN 3 and SCC than CIN 1 and CIN 2. **Conclusion:** the recurrence of CIN 2 and 3 was statistically related to positive margins on product of conization. The biomarkers p16 and p53 were not related to persistence disease but they presented a high predictive negative value.

**Key words:** cervical intraepithelial neoplasia, conization, recurrence.

## GLOSSÁRIO

**Apoptose.** Morte celular programada, suicídio celular programado.

**ASCUS.** Sigla (do inglês *Atypical Squamous Cell of Undetermined Significance*) para indicar a presença de células atípicas de significado não determinado.

**Carcinoma *in situ* de colo uterino.** Lesão maligna pré-invasiva do colo uterino, limitada ao epitélio e sem invasão da membrana basal. Segundo a definição da OMS é uma lesão na qual toda ou a maior parte do epitélio mostra os aspectos celulares do carcinoma, mas não ocorre invasão do estroma subjacente.

**Clearence viral.** Termo inglês que significa “depuração” e pode ser definido como a taxa pela qual um vírus é eliminado do organismo.

**Coorte.** Qualquer grupo definido de pessoas selecionadas, tendo em vista um propósito ou estudo especial.

**Forma epissomal.** Forma de vida que não está integrada ao DNA do genoma da célula hospedeira.

**HPV.** Sigla (do inglês *Human Papilloma Virus*) para indicar os papiloma vírus que acometem o ser humano.

**Metaplasia escamosa.** É um fenômeno comum na zona de transformação do colo uterino, que promove a substituição do epitélio colunar por epitélio escamoso estratificado, mais protetor, e que se inicia através da proliferação de células de reserva abaixo da camada de células colunares.

**Neoplasia intra-epitelial cervical** (NIC. Do inglês: CIN= cervical intraepithelial neoplasia). Lesão na qual parte da espessura do epitélio cervical é substituída por células indiferenciadas. Fenômeno contínuo e progressivo, com diversos graus de anomalias de diferenciação e maturação celular na espessura do epitélio cervical. Lesão pré-maligna do colo uterino.

**Odds-ratio.** Indicador para estimativa de risco relativo a partir dos valores levantados em estudo de caso controle. É uma medida do efeito do fator em estudo no desenvolvimento do desfecho clínico.

**Screening.** Do inglês, termo que descreve programa organizado que utiliza um método estandarizado para diagnosticar em fase pré-clínica ou precoce uma determinada doença numa população definida.

**Valor preditivo negativo.** Refere-se à probabilidade após teste negativo, isto é, a proporção de verdadeiros testes negativos entre todos os testes negativos.

**Valor preditivo positivo.** Refere-se à probabilidade após teste positivo, isto é, a proporção de verdadeiros testes positivos entre todos os testes positivos.

**ANEXO**

## PROTOCOLO DE CASOS DE NEOPLASIA INTRA-EPITELIAL CERVICAL

**IDENTIFICAÇÃO:****Iniciais do Nome:**.....**Idade:** .....**Prontuário:** .....**INVESTIGAÇÃO:****Tabagista:** (0) Não (1) Sim (9) Sem descrição**Etilista:** (0) Não (1) Sim (9) Sem descrição**Uso de Medicamentos contínuos:** (0) Não (1) Sim (9) Sem descrição /

Quais? \_\_\_\_\_

**Uso de Métodos contraceptivos:** (0) Não (1) Sim (9) Sem descrição

Qual? \_\_\_\_\_

**Impressão Colposcópica:** Data: ..... / ..... / .....(1) Normal (2) LEBG (3) LEAG (4) Insatisfatório (5)  
Câncer (9) Sem descrição**Comprometimento de Vagina pré-operatório:** Data: ..... / ..... / .....(0) Ausente (1) LEBG (2) LEAG (3) Insatisfatório (5) Câncer  
(9) Sem Descrição**Biópsia Pré-operatória:** Data: ..... / ..... / ..... (0) Normal (1) NIC I (2)NINC II (3) NIC III (4) ASCUS (5) AGUS (6) Cervicite (7) Câncer  
(9) Sem Descrição**Doenças Associadas:**HIV: (0) Não (1) Sim (9) Sem descrição Diabetes Mellitus: (0) Não (1) Sim  
(9) Sem descrição**CIRURGIA:****Cirurgia realizada:** Data: ..... / ..... / .....(1) Cone Clássico (2) CAF (3) Re-CAF (4) Cone de Canal (5)  
HTA (6) HTV (7) LEETZ**Cirurgião:** (1) Chefe (2) Residente

**Complicações Intra-operatória:** (0) Nenhuma (1) Hemorragia (2) Lesão  
bexiga (9) Sem Descrição

**Complicações Pós-operatória:** (0) Nenhuma (1) Hemorragia (2) Infecção  
(3) Estenose de canal (4) Colica (5) Dispareunia (6) Corrimento (7) Dor

**ANATOMO-PATOLÓGICO:**

**AP Definitivo:** Data: ..... / ..... / ..... (0) Normal (1) NIC I (2) NINC  
II (3) NIC III (4) ASCUS (5) AGUS (6) Cervicite (7) Câncer  
(9) Sem Descrição

**Margem Endocervical:** (0) Negativo (1) Positivo (2) Exígua  
(..... mm)

**Margem Ectocervical:** (0) Negativo (1) Positivo (2) Exígua  
(..... mm)

**Rigor Técnico:** (1) Mantido (2) Não Mantido

**Extensão Glandular:** (0) Ausente (1) Presente

**Recidiva:** (0) Não (1) Sim Tempo em meses:

.....

**Número de CO Normais até presente data:**

.....

**CONDUTA:**

**Conduta:** (1) Seguimento (2) Re-CAF (3) Cone (4) HTA  
(5) RXT (6) QT

**FOLLOW-UP:**

Data da Última Consulta: ..... / ..... / .....

Status do último contato:

(1) Viva, sem lesão, sem recorrência (5) Morte por câncer  
(2) Viva, sem lesão, após recorrência (6) Morte pós-operatória  
(por complicação cirúrgica)  
(3) Viva, com recorrência (7) Desconhecido//perda  
do follow-up  
(4) Morte livre de doença

**IMUNOHISTOQUÍMICA:**

**P53** (1) negativa (2) positiva

**P16** (1) negativa (2) positiva