

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GERONTOLOGIA
BIOMÉDICA

Dissertação de Mestrado

EXPRESSÃO DE P16 EM LESÕES MALIGNAS E
PRÉ-MALIGNAS DO COLO DO UTERO

Ana Paula Franco Lambert

Porto Alegre, março de 2004.

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE
DO SUL

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GERONTOLOGIA
BIOMÉDICA

EXPRESSÃO DE P16 EM LESÕES MALIGNAS E PRÉ-
MALIGNAS DO COLO DE ÚTERO

Ana Paula Franco Lambert

**Dissertação apresentada como
requisito parcial à obtenção do grau de
MESTRE, pelo Programa de Pós-
graduação em Gerontologia Biomédica
da Pontifícia Universidade Católica do
Rio Grande do Sul.**

Orientadora: Prof^a. Dra. Virgínia Minghelli Schmitt

Porto Alegre, março de 2004

Dedicatória

Aos meus pais, Huberto e Ivoni pelo exemplo de vida e dedicação à minha formação.

Aos meus irmãos, José Humberto, Daniela e Bruna pela compreensão e paciência.

Ao meu noivo, Joner pelo carinho e apoio.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Virgínia Minghelli Schmitt por sua orientação, dedicação, paciência, pelos conhecimentos transmitidos e principalmente por transmitir o amor pela busca de conhecimento e pela pesquisa, meus sinceros agradecimentos.

Ao Me. Fernando Anschau, pela dedicação e por compartilhar seus dados e conhecimentos.

Ao Prof. Dr. Emilio Antônio Jeckel Neto, Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Gerontologia Biomédica pela atenção e acolhida em seu laboratório.

Ao grupo do Laboratório de Envelhecimento Celular, principalmente a Raquel Mattos de Oliveira e as estudantes de graduação pelo apoio, auxílio e por terem me acolhido com tanto carinho e amizade.

À Profa. Dra. [Denise Cantarelli Machado](#), ao Prof. Dr. Vinicius Duval da Silva, ao Farm. Vinícius S. Michaelson, aos colegas e amigos do Curso de Pós-Graduação em Gerontologia Biomédica e do Instituto de Pesquisas Biomédicas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul pelas várias formas de ajuda.

Às pacientes, sem as quais seria impossível a realização deste estudo, os meus sinceros agradecimentos.

“Que o nosso desejo de verdade consista em transformar o mundo, sabendo que nossa parcela de participação é necessária.”

Dom Dadeus Grings

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	VII
LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE TABELAS	IX
RESUMO	X
SUMMARY	XI
INTRODUÇÃO	1
1. REFERENCIAL TEÓRICO	4
1.1 ENVELHECIMENTO CELULAR X CÂNCER	4
1.2 CÂNCER DO COLO DO ÚTERO	8
1.3 PAPILOMAVÍRUS HUMANO	11
1.4 ONCOPROTEINAS VIRAIS	13
1.5 P16 ^{INK4a}	18
2. OBJETIVOS	22
2.1 OBJETIVO GERAL	22
2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	22
3. ARTIGO	23
ABSTRACT	24
INTRODUCTION	26
MATERIAL AND METHODS	28

Imunohistochemistry	28
Interpretation of p16 ^{INK4a} staining	29
DNA isolation and HPV typing	30
Statistical analysis	31
RESULTS	30
DISCUSSION	32
ACKNOWLEDGMENTS	36
REFERENCES	37
ARTICLE PRÉCIS	41
FIGURE	42
TABLES	44
4. DISCUSSÃO	46
5. CONCLUSÕES	55
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
ANEXOS	66

LISTA DE ABREVIATURAS

CDK	Cinase dependente de ciclina (do inglês <i>cyclin dependent kinase</i>)
CIN	Neoplasia intra-epiteliais cervical (do inglês <i>cervical intraepithelial neoplasia</i>)
DAB	Tetrahydrocloroeto de Diaminobenzidina
DNA	Ácido desoxirribonucléico
E2F	Fator de Transcrição E2F
G1	Gap1, fase do ciclo celular entre Mitose e Síntese
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HPV	Papilomavírus Humano
INCA	Instituto Nacional do Câncer
KDa	Kilodáltons
M	Molar
Mol/L	Mol por litro
mRNA	RNA mensageiro
P16	Proteína celular inibidora dos complexos ciclina/ CDK
P53	Proteína celular oncossupressora p53
Pap-test	Exame citológico de Papanicolaou
pb	Pares de base
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pRB	Proteína celular oncossupressora pRB
S	Fase de síntese do ciclo celular
SIL	Lesões intra-epiteliais escamosas (do inglês <i>squamous intraepithelial lesions</i>)
TP53	Gene supressor tumoral TP53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Causas e conseqüências de danos no DNA	7
Figura 2	Representação esquemática do genoma do HPV	15
Figura 3	Representação esquemática do ciclo celular e seus mecanismos de controle	19
 Do artigo:		
Figure 1	Distribution of p16 ^{INK4a} expression level in different lesion grades	42
Figure 2	Expression levels of p16 ^{INK4a} in cervical samples	43

LISTA DE TABELAS

Do artigo:

Table 1	Frequency of HPV types in different lesion grades	44
Table 2	Distribution of p16 expression level in different lesion grades	44
Table 3	Frequency of HPV types according to p16 expression level	45

RESUMO

O envelhecimento é um processo contínuo que ocorre em todo organismo vivo com o passar do tempo. O processo de envelhecimento tem uma base celular e, portanto, pode ser melhor estudado ao nível celular. Após sofrer um determinado número de divisões, ocorre na célula um gradual declínio da sua capacidade de proliferação; este fenômeno é conhecido como senescência celular. Alguns estudos sugerem que a senescência celular seja um potente, porém, imperfeito mecanismo de supressão tumoral. Considerando que alguns supressores tumorais contribuem para o processo de envelhecimento, parece impossível aprimorar o mecanismo de supressão tumoral sem acelerar o envelhecimento, bem como retardar o envelhecimento sem acelerar ou contribuir para a formação de um tumor. O Papilomavírus Humano (HPV) é capaz de inibir a atividade de alguns supressores tumorais e levar ao desenvolvimento do câncer de colo de útero. As displasias cervicais são consequência de infecções persistentes por HPVs de alto risco. As oncoproteínas E6 e E7 dos HPVs de alto risco são capazes de interagir com uma série de proteínas reguladoras do ciclo celular como supressor tumoral p53 e pRb, respectivamente. Um exemplo destas proteínas é a pRb, que é inativada pela proteína E7 do HPV. Complexos ciclina/quinase dependente de ciclina (CDK) fosforilam a pRb, permitindo que o ciclo celular avance. A p16^{INK4a} é um supressor tumoral que inibe a ação dos complexos ciclina/CDK, retardando a progressão do ciclo celular. O aumento da expressão das oncoproteínas virais reflete no aumento da expressão da p16^{INK4a} nas células infectadas. Recentes estudos têm revelado que a expressão da p16^{INK4a} pode vir a ser um marcador de lesões pré-malignas e malignas em células epiteliais do colo do útero. Seguindo esta hipótese, a proposta desta dissertação foi de verificar a expressão da p16^{INK4a} por imunohistoquímica em lesões escamosas intraepiteliais de baixo grau (LSIL) (n=6), em lesões escamosas intraepiteliais de alto grau (HSIL) (n=21) e em câncer (n=27). A expressão da p16 foi classificada de acordo com o número de células que apresentam expressão da p16^{INK4a} em: (-) negativa, (+) menos de 5% das células, (++) 5-50% das células e (+++) mais de 50% das células. Nas amostras cervicais HPV positivas foi observada a expressão da p16^{INK4a} em 1 de 3 LSIL (33,3%), 18 de 19 HSIL (94,7%) e em todas as 26 amostras de câncer (100%). Somente 6 amostras eram negativas para HPV (3 LSIL, 2 HSIL e 1 câncer), sendo que em apenas um caso de LSIL não foi verificada a expressão da p16^{INK4a}. Estes resultados mostram que a p16^{INK4a} é expressa em lesões precursoras e sua expressão aumenta gradativamente com o aumento da gravidade das lesões (p < 0,01) confirmando que a p16^{INK4a} poderia ser utilizada como marcador das lesões precursoras e do câncer cervical.

SUMMARY

Aging is a continuous process observed in all living organisms. Once it has a cellular basis, it is better understood whether studied at cellular level. An individual cell has a limited life span, after a definite number of cell divisions its ability to proliferate declines; this phenomenon is known as cellular senescence. Several lines of evidence suggest that replicative senescence is a powerful albeit imperfect tumor suppressive mechanism. If some tumor suppressor genes show antagonistic pleiotropy and contribute to aging, then it would be impossible to improve tumor suppressive mechanism without accelerating aging, and to retard aging without accelerating tumor formation. Human Papillomavirus (HPV) have the ability to inhibit some tumor suppressor proteins, contributing to the development of cervical cancer. Cervical dysplasia is induced by persistent infections with high-risk types of Human Papillomaviruses (HR-HPV). HPV oncoproteins E6 and E7 interact with and inactivate various cell cycle regulatory proteins, like tumor suppressor p53 and the retinoblastoma protein (pRb), respectively. The tumor suppressor p16^{INK4a} is a cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor that decelerates the cell cycle by inactivating the Cdks that phosphorylate pRB. Increasing expression of the viral oncogenes in dysplastic cervical cells might thus be reflected by increased expression of p16^{INK4a}. Recent biological studies have revealed that p16^{INK4a} expression could be a marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix. In line with this hypothesis, the proposal of this study is to verify expression of p16^{INK4a} by immunohistochemistry in low grade squamous intraepithelial lesion (LSIL) (n=6), in high grade squamous intraepithelial lesions (HSIL) (n=21) and in cancer (n=27). p16^{INK4a} expression was classified as: (-) negative, (+) less than 5% of cells, (++) 5 - 50% of the cells and (+++) more than 50% of cells expressing p16^{INK4a}. In HPV positive cervical samples, p16^{INK4a} expression was observed in 1 of 3 LSIL (33.3%), in 18 of 19 HSIL (94.7%) and in all 26 cancer cases (100%). Only 6 analyzed samples were negative for HPV (3 LSIL, 2 HSIL and 1 cancer) and among these only one LSIL sample was negative for p16^{INK4A} expression. These results show that p16^{INK4A} is expressed in precursor lesions and its expression increases with lesion grade (p<0,01). These data support the proposed role for p16^{INK4A} as a molecular marker for cervical dysplastic lesions and cancer.

INTRODUÇÃO

O envelhecimento é um processo intrínseco e contínuo que ocorre com o tempo. Todas as alterações no processo do envelhecimento têm uma base celular. As células normais de um organismo vivo têm uma capacidade limitada de divisões. Quando a capacidade de proliferar decresce, considera-se que a célula atingiu um estado de senescência. Para que a célula não se torne senescente é necessário uma série de alterações no controle do ciclo celular.

As doenças neoplásicas são produtos de alterações dos controles de proliferação e sobrevivência celular; caracterizando-se por um descontrole do crescimento celular. O câncer é o resultado de uma série de alterações em diferentes mecanismos do controle do ciclo celular, tornando as células imortais e impedindo o processo normal de senescência.

O câncer do colo de útero é uma das principais causas de morte de mulheres em países desenvolvidos e em desenvolvimento. Estudos demonstraram que 90% das neoplasias intraepiteliais estão associadas à infecção por Papilomavírus Humano (HPV) .

As proteínas E6 e E7 dos HPV 16 e 18 , que são considerados de alto risco para o desenvolvimento do câncer, são responsáveis pela imortalização das células. A E6 se liga e sinaliza a degradação da proteína p53, que é ativada quando há danos no DNA e induz à apoptose. A proteína E7 se liga à pRB, que controla a proliferação celular, tornando-a inativa.

A p16 é uma proteína que está envolvida no controle da proliferação celular por ser inibidora dos complexos ciclina – quinase dependente de ciclina (CDK). Os complexos ciclina/CDK4 ou 6 são responsáveis por fosforilar a pRB que leva a progressão do ciclo celular de G1 para S. Sendo assim, a p16^{INK4a} é considerada um supressor tumoral pois tem a capacidade de inibir a proliferação celular. As alterações na expressão da p16^{INK4a} em presença das oncoproteínas virais do HPV estão relacionadas com o desenvolvimento de câncer cervical, refletindo um desequilíbrio nos processos de controle do ciclo celular e senescência.

Se analisarmos o processo de senescência e de desenvolvimento do câncer ao nível celular percebemos que são processos opostos: certos

caminhos que atuam de forma positiva na senescência atuam negativamente no desenvolvimento do câncer. Por outro lado, mecanismos que favorecem o câncer influenciam negativamente o processo de senescência celular. Desta maneira, estudando os níveis de expressão da proteína p16^{INK4a}, envolvida no controle do ciclo celular, seria possível termos uma idéia de sua importância no processo de envelhecimento celular. Além disto, se esta proteína for um marcador de lesões precursoras ao câncer, como sugere a literatura, estaremos contribuindo para uma detecção precoce destas lesões, com possibilidade de tratamento numa fase inicial, que é fundamental para que ocorra a cura.

1. REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 ENVELHECIMENTO CELULAR X CÂNCER

O envelhecimento biológico pode ser definido como uma série de mudanças cumulativas, progressivas e intrínsecas, funcional e estruturalmente deletérias, que ocorrem com o tempo e começam a se desenvolver no momento em que se atinge a maturidade sexual, levando finalmente à morte (Arking, 1998). O envelhecimento é um processo multifatorial composto por componentes ambientais e genéticos. Cada sistema fisiológico dentro de um organismo, cada tecido de um sistema e cada tipo celular de um tecido parece ter sua própria trajetória de envelhecimento. Assim, o envelhecimento precisa ser estudado como um todo e compreendido como a soma destas partes (Cristofalo *et al.*, 1994; Effros, 2001).

Todas as alterações no processo de envelhecimento têm uma base celular. Assim, o processo de envelhecimento pode ser melhor estudado na celular, em condições ambientais estabelecidas e controladas. As alterações celulares observadas no envelhecimento devem ser encaradas

como componentes de uma rede hierárquica, dinâmica e interativa, cuja integridade funcional deteriora progressivamente com o tempo (Cristofalo *et al.*,1994).

As células somáticas normais de um organismo vivo têm uma capacidade limitada de divisões. Células normais, quando colocadas em meio de cultura em condições ideais, irão crescer e se dividir até um certo momento. Após um determinado número de divisões, haverá um gradual declínio na capacidade de proliferação, que ocorre tanto “in vivo” como “in vitro”, que é chamada de senescência celular. Cada tipo celular apresenta um certo tempo de vida, que pode ser determinado pelo número de divisões que a célula sofre. Existe uma variação significativa na capacidade proliferativa das células “in vitro”, que depende da idade do indivíduo do qual as células derivam (Holland *et al.*,1997; Albert *et al.*,1999).

Durante a formação do tumor, ocorre uma série de mutações que permite que a célula ultrapasse o limite de proliferação imposto pela senescência celular. Os supressores tumorais p53 e pRb são importantes controladores do ciclo celular, pois impedem que a célula senescente ou defeituosa continue a se dividir. A maioria das células tumorais apresentam a p53 e/ou a pRb inativadas (Campisi, 2001). A proteína pRb é necessária para desenvolver o estado senescente da célula pois ela interage diretamente com fatores de transcrição que regulam o avanço do ciclo celular, impedindo que a célula continue a se dividir (Holland *et al.*,

1997). A maioria dos tumores, tanto de ocorrência natural como induzidos em laboratório, são replicativamente imortais ou apresentam um número maior de divisões em relação às células normais. Certos vírus, como o Papilomavirus Humano (HPV), bem como o produto de alguns oncogenes, atuam sobre o controle do ciclo celular permitindo que as células se tornem imortais. Tendo como base estas evidências, tem sido proposto que a senescência celular seria um potente mecanismo de supressão tumoral, porém imperfeito. (Campisi, 2001; Holland *et al.*, 1997).

Fatores endógenos, como disfunção da telomerase e estresse oxidativo, ou fatores exógenos, como estresse oxidativo, radiação γ e luz ultravioleta (UV), podem acumular danos no DNA. Estes danos no DNA ativam as vias de controle do ciclo celular mediadas pelos supressores tumorais p53 e p16-pRb que encaminham a célula à apoptose ou à senescência celular. Se o dano ocorrer nas células progenitoras e alterar a homeostasia do tecido, poderá contribuir para o processo de envelhecimento. No entanto, se estas mutações no DNA levarem à inativação dos supressores tumorais, poderá surgir o câncer (Figura1). Portanto, a inibição do processo de senescência em células progenitoras pode contribuir para a formação do câncer (Pelicci, 2004).

Visto que alguns genes supressores tumorais também contribuem para o processo de envelhecimento, parece impossível aprimorar o mecanismo de supressão tumoral sem acelerar o envelhecimento, assim

como retardar o envelhecimento sem acelerar ou contribuir para a formação do tumor (Pelicci, 2004; Bringold *et al.*, 2000).

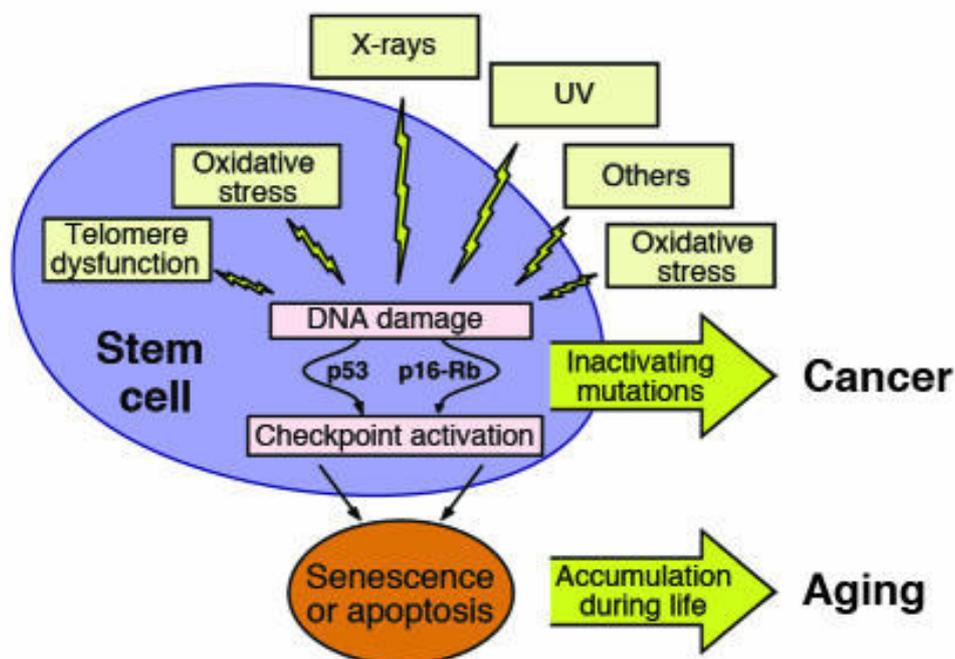


Figura 1: Causas e conseqüências de danos no DNA. (Pelicci, 2004)

Células infectadas pelo HPV, principalmente os tipos de alto risco, sofrem uma alteração no mecanismo de controle do ciclo celular, pois proteínas sintetizadas pelo vírus inativam os supressores tumorais p53 e pRb, alterando o processo de senescência celular e favorecendo a formação do tumor (Holland *et al.*, 1997).

1.2. CÂNCER DE COLO DE ÚTERO

O câncer de colo de útero é a segunda maior causa de morte por câncer em mulheres em todo o mundo com 288.000 mortes por ano (WHO, 2003). Sua frequência mundial está estimada em 510.000 casos novos por ano, sendo que 45 a 50% das mulheres afetadas irão a óbito, mesmo que tenham um tratamento adequado devido, principalmente, à falta de prevenção e à demora no diagnóstico. Perto de 80% dos casos ocorrem em países em desenvolvimento: 68.000 na África, 77.000 na América latina e 245.000 na Ásia. É o câncer mais comum no sexo feminino na América Central, América do Sul e na África (Lagunas, 2001; WHO, 2003; WHO, 1995).

As taxas brasileiras de incidência estão entre as mais elevadas do mundo. De acordo com dados absolutos sobre a incidência e mortalidade por câncer do Instituto Nacional de Câncer (INCA), o câncer de colo do útero foi responsável pela morte de 3.879 mulheres no Brasil em 1999. Para 2002, as estimativas sobre incidência e mortalidade por câncer eram 4.005 novos óbitos. As diferenças regionais são de extrema importância, sendo possível observá-las e relacioná-las à qualidade diagnóstica e condições sócio-econômicas. Existe uma discrepância entre a população urbana e a rural, sendo que as taxas nas cidades chegam a ser duas vezes maiores que no campo (INCA, 1995; INCA, 2004).

Em algumas regiões geográficas, como no nordeste brasileiro, a incidência do câncer de colo de útero está entre as mais altas do mundo (Villa, 2003), estimando-se que em torno de 40.000 mulheres por ano desenvolverão esta neoplasia no Brasil. Em geral, a incidência desta neoplasia está em declínio na maioria dos países que possuem um sistema adequado de rastreamento da doença baseado sobre tudo na citologia de Papanicolaou (Villa, 2003; Koss *et al.*, 1997).

O câncer de colo uterino é considerado uma neoplasia que pode ser prevenida, uma vez que estes tumores têm uma progressão relativamente lenta e existe uma forma simples e relativamente eficiente de detecção das lesões precursoras. Foi demonstrado que o câncer de colo invasivo é precedido por uma série de modificações do epitélio original, que constituem as lesões pré-cancerosas denominadas neoplasia intraepitelial cervical (CIN, do inglês *cervical intraepithelial neoplasia*) ou, a mais recente denominação, lesões intraepiteliais escamosas (SIL, do inglês *squamous intraepithelial lesion*) segundo classificação de Bethesda de 2001 (Anexo I). As técnicas citológicas, auxiliadas pela colposcopia, contribuíram para o conhecimento dessas lesões e instalação do seu tratamento, com uma conseqüente queda da taxa dos cânceres invasivos (Koss *et al.*, 1997; National Cancer Institute, 2001).

Uma das alterações citológicas pré-malignas freqüentes é a coilocitose, identificada pela primeira vez por Koss em 1956. Seu

significado, porém, só foi reconhecido 20 anos depois, quando Meisels e colaboradores relataram estas alterações na displasia leve. Estudos de biologia molecular demonstraram altos níveis de DNA de HPV nas células coilocíticas, indicando infecção viral produtiva. Ficando evidente uma associação entre o HPV e o câncer de colo de útero. A percentagem de neoplasias intraepiteliais associadas à infecção por HPV aproxima-se de 90% (Berek, 1998; Naomi *et al.*, 2000; DiSaia *et al.*, 1997).

O diagnóstico da infecção pelo HPV baseia-se fundamentalmente no exame ginecológico acompanhado da colposcopia, de exame citológico e, se há evidência de lesão, de exame histopatológico. A presença do vírus pode ser detectada através da reação em cadeia da polimerase (PCR), que pode também determinar qual o tipo viral envolvido, ou através da captura híbrida, que informa se o vírus presente é de alto ou baixo risco. Estas informações são importantes para o clínico, pois influenciam na conduta terapêutica a ser tomada (Carvalho *et al.*, 2000; De Luca 1991; Koss *et al.*, 1997).

A instalação do exame preventivo do câncer de colo do útero (exame citológico de Papanicolaou) foi uma das intervenções médicas de maior sucesso, com notável redução na taxa de incidência e mortalidade por câncer de colo de útero (Doeberitz, 2002).

1.3. PAPILOMAVÍRUS HUMANO

O Papilomavírus Humano é membro da família *Papillomaviridae*. O genoma é uma dupla hélice de DNA circular com aproximadamente 7.800pb e a análise da seqüência de nucleotídeos do genoma constitui a base do método de classificação dos vários tipos virais. Já foram isolados mais de 100 tipos diferentes de HPV que infectam o ser humano, destes aproximadamente 30 tipos infectam o trato anogenital (Veronesi *et al.*, 1997). Este vírus costuma infectar o epitélio escamoso de diversas partes do corpo, resultando na formação de condilomas, vulgarmente chamados de verrugas. A maioria das lesões displásicas do trato genital relacionadas com o HPV desenvolve-se nas mulheres, isto porque as células do trato genital feminino são mais propícias para a instalação do vírus e progressão das lesões. Lesões penianas são muito raras, porém, os homens estão infectados nas mesmas proporções que suas parceiras sexuais, demonstrando serem reservatório para transmissão (Doeberitz, 2002).

Estudos demonstraram que certos tipos virais têm uma maior associação com o câncer do colo do útero, classificados como de baixo (6, 11, 13, 41, 42, 44, 53, 54, 58, 61, 62, 66, 69 e outros) e alto (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56) risco de desenvolverem câncer. Os HPVs de baixo risco são relacionados com tumores benignos como verrugas comuns, papilomas e condilomas. Os tipos virais de alto risco tem uma maior associação com o câncer e são também chamados de

oncogênicos. O tipo 16 de HPV é o mais comum no carcinoma de cérvix uterina, enquanto que o HPV 18 predomina nos adenocarcinomas, sendo considerado o tipo de HPV mais agressivo (Berek, 1998; Murakami *et al.*, 1999).

O HPV tem um tropismo específico pelas células do epitélio escamoso e a infecção permanece de forma mais intensa neste tipo celular. No epitélio escamoso do colo do útero, as células basais sofrem freqüente divisão celular. O vírus infecta as células basais, induzindo uma infecção persistente (Koss *et al.*, 1997). A junção entre o epitélio colunar da endocérvice e o epitélio escamoso da ectocérvice é uma região de contínuas mudanças metaplásicas que ocorrem com maior intensidade na puberdade e durante a primeira gravidez, diminuindo depois da menopausa. Na presença viral, se desenvolve uma metaplasia escamosa atípica que pode progredir para uma lesão intraepitelial de alto grau. No período em que a atividade metaplásica é mais intensa, o risco de desenvolver uma neoplasia é maior, isto é, entre 20 e 35 anos (DiSaia *et al.*, 1997). Somente 10% das mulheres infectadas pelo HPV desenvolvem lesões clinicamente importantes (Doeberitz, 2002). A forma de transmissão do vírus é sexual. A maioria dos indivíduos expostos irá permanecer com uma infecção latente de longo prazo, sendo que nos indivíduos suscetíveis a colonização viral é seguida pela replicação viral ativa (Veronesi *et al.*, 1997; Lambert, 2001). As verrugas genitais são mais comuns em pessoas sexualmente ativas, entre 20 e 24 anos,

independente do tipo de HPV. Após esta idade, a prevalência declina gradativamente (Carvalho *et al.*, 2000; Freitas *et al.*, 1997; Junior *et al.*, 1998). A prevalência de infecção no trato genital feminino no mundo é em torno de 630 milhões, sendo que destas, 190 milhões têm alterações clínicas (WHO, 2003).

Tabagismo, início das relações sexuais precocemente, múltiplos parceiros sexuais, uso prolongado de anticoncepcionais, não realizar periodicamente o exame citopatológico preventivo, são fatores predisponentes para desenvolver o câncer de colo uterino em pacientes infectadas pelo HPV (Lagunas, 2001; Junior *et al.*, 1998). Com relação às diferenças raciais, apesar dos estudos apontarem para uma maior prevalência de HPV em indivíduos caucasianos, estes dados não são conclusivos (Carvalho *et al.*, 2000).

Indivíduos imunocomprometidos parecem manter o HPV de forma persistente. No Brasil, encontrou-se positividade para HPV por PCR em 80,8% das mulheres HIV positivas estudadas (Carvalho *et al.*, 2000; Naomi *et al.*, 2000).

1.4 ONCOPROTEÍNAS VIRAIS

O genoma do HPV pode ser dividido em duas regiões distintas: a região precoce, que é composta por genes que codificam proteínas

envolvidas na replicação do vírus, regulação da transcrição e transformação da célula, e a região tardia, que codifica as proteínas do capsídeo viral. Os genes localizados na região precoce (*early*) são denominados E (E1-E7) e os genes localizados na região tardia (*late*) são denominados L (L1 e L2). As proteínas virais E6 e E7 desempenham um papel importante no processo de oncogênese. A expressão conjunta de E6 e E7 são fundamentais para causar a imortalização das células (Figura 2) (Holland *et al.*, 1997).

Os genes E6 e E7 são normalmente expressos em câncer de cérvix uterina positivo para HPV. Nos casos de câncer, o genoma do HPV está integrado ao genoma da célula. A quebra no genoma viral ocorre na região E1/E2 e o local de integração no genoma humano é aleatório. A proteína E2 do HPV é um importante fator que regula a transcrição dos genes da região precoce, incluindo E6 e E7. Após a integração do genoma viral no DNA celular a proteína E2 não é mais expressa, liberando a expressão dos genes E6 e E7. As proteínas E6 e E7 codificadas pelos HPVs de alto risco são oncoproteínas que contribuem para a transformação celular, pois ligam-se às proteínas reguladoras do ciclo celular p53 e pRb, respectivamente (Doeberitz, 2002).

Os genes E6 e E7 do HPV de alto risco, quando expressos em conjunto, são capazes de transformar os queratinócitos humanos. Contudo, os queratinócitos transformados pelos genes E6 e E7 não são

células malignas. É necessário um longo tempo em cultura e/ou a adição de agentes mutagênicos para que a célula atinja um estado completo de malignidade. O poder de transformação de E6 ocorre através da interação com uma série de produtos de genes celulares. A proteína p53 foi o primeiro alvo de E6 identificado. As células que expressam E6 apresentam níveis de atividade de p53 diminuídos, não respondendo desta forma aos danos no DNA (Doeberitz, 2002; Holland *et al.*, 1997).

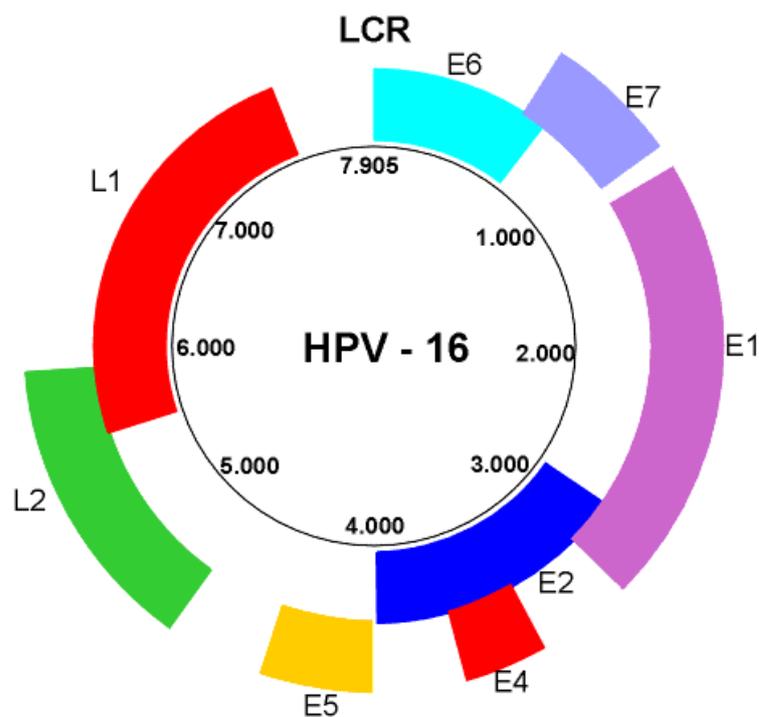


Figura 2. Representação esquemática do Genoma do HPV

A degradação da p53 acontece através da rota ubiquitina-proteasoma, mediada pela proteína Mdm2. Nas células infectadas pelo HPV, a proteína E6 dos HPVs de alto risco se liga a uma proteína celular

de 100-kDa, denominada proteína associada a E6 (E6AP) a qual funciona como proteína ligadora de ubiquitina. O complexo E6/E6AP ao se ligar na região central da p53, rapidamente ativa a sua ubiquitinação, encaminhando-a para a degradação. Esta degradação da p53 mediada por E6/E6AP não é suscetível à sinalização de dano no DNA, degradando a p53 continuamente. (Doeberitz, 2002; Skomedal *et al.*, 1999; Tomazino *et al.*, 2003).

A interação de E6 com a p53 já está bem documentada, contudo sabe-se que esta proteína viral interage também com outras proteínas celulares. A E6 interage com fatores que regulam a transcrição e replicação do DNA, a apoptose, a organização e diferenciação epitelial, a polarização da célula e a interação entre células. Está bem claro que várias interações não foram descritas ainda. Sabe-se que E6 é um modulador de uma série de funções fisiológicas, porém ainda não está claro quais destas funções são as mais importantes para o início e progressão do câncer (Doeberitz, 2002; Holland *et al.*, 1997).

A proteína E7 dos HPVs de alto risco tem a capacidade de interagir e neutralizar a função das proteínas pRb, p107 e p130. Estas proteínas têm um papel central como controladoras do ciclo celular, regulando negativamente a atividade de diversos fatores de transcrição, incluindo os membros da família E2F. Em células quiescentes, a pRb está hipofosforilada e associada ao E2F, mas quando estas células recebem sinais para a mitose ocorre a formação dos complexos ciclina/cdk. Um

destes complexos ciclina/CDK é responsável por fosforilar a pRb, liberando o E2F. O E2F livre e ativo promove a transcrição de um grupo de genes que codificam proteínas, como a DNA polimerase, dihidrofolato redutase, timidina kinase e ciclina E, essenciais para a progressão do ciclo celular. Resumindo, a principal função da proteína E7 é criar estratégias para favorecer uma maior multiplicação do vírus. Assim, a interação da E7 com a pRb libera o fator de transcrição E2F que favorece a progressão do ciclo celular, levando à multiplicação celular (Doeberitz, 2002; Eichten *et al.*, 2002; Giarrè *et al.*, 2001).

A proteína E7 do HPV de alto risco media várias outras interações que contribuem para seu potencial oncogênico. E7 é capaz de suprimir diversas atividades de p53 de forma independente da E6. As células que expressam E7 apresentam um aumento dos níveis de p53. Contudo, as atividades da p53, como a regulação da transcrição, estão reduzidas nestas células (Doeberitz, 2002; Doeberitz, Eur J Cancer 2002).

O complexo pRb-E2F impede a progressão do ciclo celular de G1 para S. Em condições normais, a pRb é fosforilada por ação dos complexos ciclina/CDK, liberando o fator de transcrição E2F, o que leva à progressão do ciclo celular. A inativação da pRb é uma característica comum em diversos tipos de câncer e pode ocorrer como consequência de mutação no gene pRb ou, no caso do câncer cervical, por ação da oncoproteína viral E7. Contudo, a superexpressão de ciclinas pode resultar em aumento da atividade dos complexos ciclina/CDK, com

conseqüente inativação da pRb por hiperfosforilação. A atividade dos complexos ciclina/CDK é regulada pelos inibidores destes complexos, e p16^{INK4a} é um destes inibidores (Figura 3) (Alberts *et al.*, 1999; Doeberitz, 2002; Doeberitz, Eur J Cancer 2002).

1.5 p16^{INK4a}

O gene p16, localizado no cromossomo 9p21 foi descoberto por um geneticista americano em 1995, durante investigações sobre o ciclo celular (Zhou *et al.*, 2002). Este gene codifica uma proteína que inibe as quinases dependentes de ciclina, como CDK4 e CDK6, as quais promovem a fosforilação e conseqüentemente a inativação da pRb. A atividade de supressão tumoral p16/pRb freqüentemente está inativa em muitos tipos de cânceres humanos. A inativação tanto da p16 como da pRb tem um impacto na regulação de um grupo de genes envolvidos no controle da progressão do ciclo celular, permitindo que a célula entre na fase S, ultrapassando o ponto de checagem G1/S (Sano *et al.*, 1998).

Mutações na p16^{INK4a} estão ligadas à perda da aptidão de controlar o ciclo celular, tendo como resultado um crescimento exagerado e seletivo das células afetadas. Estudos subseqüentes relataram que sutis mutações em um alelo do gene p16^{INK4a} costumam estar presentes em alguns pacientes com melanoma de origem familiar. Mutações somáticas nos dois alelos da p16^{INK4a} estão presentes de forma significativa em

diferentes tipos de câncer, como gliomas, câncer de bexiga e leucemias (Holland *et al.*, 1997; Zhao *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2002).

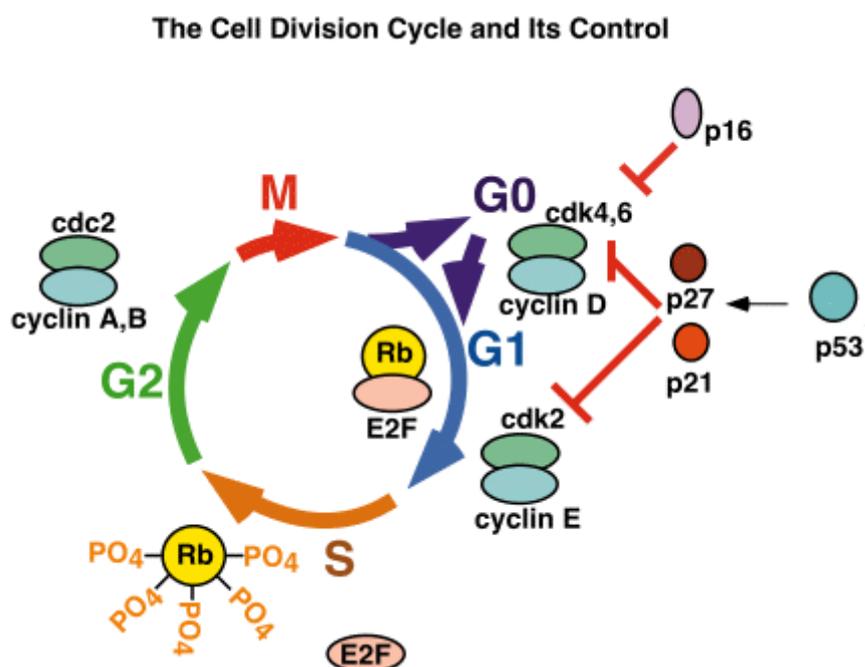


Figura 3 Representação esquemática do ciclo celular e seus mecanismos de controle (Hewlett, 2003).

Alguns estudos revelaram que a inativação da pRb é freqüentemente acompanhada da superexpressão de p16^{INK4a} em vários cânceres (Piccinin *et al.*, 1997; Sano *et al.*, 1998; Zhao *et al.*, Zhou *et al.*, 2003). Foi observado que o complexo pRb-E2F tem um efeito inibidor da transcrição da p16^{INK4a}. Conseqüentemente, a perda da função da pRb,

por mutação ou por interação com a proteína viral E7, resulta na liberação do controle negativo da transcrição do gene p16^{INK4a}. Porém, o aumento da expressão da p16^{INK4a} pode não estar relacionado com o aumento da atividade da proteína, pois esta pode estar funcionalmente inativa. Concordando com esta hipótese, níveis elevados de p16^{INK4a} foram encontrados em células infectadas pelo HPV, tanto em lesões pré-cancerosas como cancerosas. Embora outros trabalhos sugiram que em lesões cervicais a expressão do gene da p16^{INK4a} pode estar regulado negativamente por hipermetilação ou mutações, esta hipótese não foi confirmada nos últimos estudos (Doeberitz, 2002; Doeberitz, Eur J Cancer 2002; Skomedal *et al.*, 1999). No câncer de colo do útero não foram encontradas mutações ou deleção homozigótica da p16^{INK4a} ou foi detectada somente em 5% dos carcinomas (Langosch *et al.*, 2001).

A superexpressão da p16^{INK4a} em lesões displásicas cervicais e em câncer cervical tem sido o objetivo de muitos estudos. Estes estudos têm confirmado alta expressão na maioria das lesões cervicais avançadas, porém no epitélio cervical normal não foi observada a expressão da p16^{INK4a}, indicando que a expressão da p16^{INK4a} em lesões cervicais e em câncer pode ser usada para observar células transformadas pelo HPV (Doeberitz, 2002; Doeberitz, Eur J Cancer 2002; Sano *et al.*, 1998).

O acúmulo de mRNA e da proteína p16^{INK4a} tem sido observado em resposta à inativação da pRB pela proteína E7 do HPV de alto risco. Contudo, a relação entre a p16^{INK4a} e a pRb é mais complexa do que se

acreditava: o nível de expressão da p16^{INK4a} não somente reflete o *status* funcional da pRb; a expressão da p16^{INK4a} permanece constante durante a transição da fase quiescente para a fase de proliferação e durante toda a progressão do ciclo celular. É possível que a indução da expressão da p16^{INK4a} ocorra somente depois de um prolongado período de proliferação, na ausência da função da pRb (Cho *et al.*, 2002).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Verificar a expressão da proteína supressora tumoral p16^{INK4a} em amostras de cérvix uterina com alterações citológicas.

2.2. Objetivos específicos

- Verificar a expressão da p16^{INK4a} em amostras de lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau (LSIL), de lesões intraepiteliais escamosas de alto grau (HSIL) e de câncer de cérvix uterina.
- Relacionar os níveis de expressão da p16^{INK4a} com a gravidade das lesões cervicais.
- Pesquisar a relação entre HPV e a expressão da p16^{INK4a} nas amostras de LSIL, HSIL e câncer de cérvix uterina.

3. ARTIGO

P16^{INK4A} EXPRESSION IN CERVICAL PRE-MALIGNANT AND MALIGNANT LESIONS

Ana Paula Franco Lambert^{1*}, Fernando Anschau² and Virgínia Minghelli Schmitt¹³.

¹Programa de Pós-Graduação em Gerontologia Biomédica e Laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Pesquisas Biomédicas,

²Serviço de Ginecologia e Obstetrícia do HSL,

³Faculdade de Farmácia; Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, BRAZIL

* Corresponding author: Rua Prof. Cristiano Fischer 1118, CEP 91410-000 Porto Alegre-RS, Brazil. phone: 55 51 33344486 fax: 55 51 33341634. E-mail address: pumbol@bol.com.br

ABSTRACT

Objectives: p16^{INK4a} is a cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor that decelerates the cell cycle by inactivating the CDKs that phosphorylate pRB. Increasing expression of the viral oncogenes in dysplastic cervical cells might thus be reflected by increased expression of p16^{INK4a}. Recent biological studies have revealed that p16^{INK4a} expression could be a marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix. The aim of this study was to analyze p16^{INK4a} expression in cervical preneoplastic and neoplastic lesions and correlate with lesion grade.

Methods: Expression of p16^{INK4a} was analyzed by immunohistochemistry using a mouse antihuman p16^{INK4A} monoclonal antibody (Novocastra Laboratories Ltd) in low grade squamous intraepithelial lesion (LSIL) (n=6), in high grade squamous intraepithelial lesions (HSIL) (n=21) and in cancer (n=27) samples. p16^{INK4a} expression was classified as: (-) negative, (+) less than 5% of cells, (++) 5 - 50% of the cells and (+++) more than 50% of cells expressing p16^{INK4a}.

Results: In HPV positive cervical samples, p16^{INK4a} expression was observed in 1 of 3 LSIL (33.3%), in 18 of 19 HSIL (94.7%) and in all 26 cancer cases (100%). Only 6 analyzed samples were negative for HPV (3 LSIL, 2 HSIL and 1 cancer) and among these only one LSIL sample was negative for p16^{INK4A} expression.

Conclusions: These results show that p16^{INK4A} is expressed in precursor lesions and its expression increases with lesion grade (p<0,01). These data support the proposed role for p16^{INK4A} as a molecular marker for cervical dysplastic lesions and cancer.

Keywords: HPV, p16^{INK4a}, cervical cancer, tumor suppressor, LSIL, HSIL.

INTRODUCTION

Cervical cancer is one of the most common cancers in women worldwide, with about 510,000 new cases and nearly 288,000 deaths each year. In developing countries, cancer of the uterine cervix is ranked second, with a relative frequency of 15% of all cancer in women, whereas in developed countries cervical cancer is ranked fifth, with a relative frequency of 4,4% [1,2]. The Papanicolaou (Pap) test, as described by G. Papanicolaou, is a cytological staining technique, which allows the identification of asymptomatic women with preneoplastic lesions or early cancer of the uterine cervix [3]. Over the past 40 years, cervical cancer screening programs have led to a significant reduction on the incidence of cervical cancer mortality and morbidity rates in many countries [4,5]. Many studies have shown that human papillomavirus (HPV) infection plays an important role in cervical carcinogenesis [6-9]. In fact, HPV infection has been detected in almost all preneoplastic and neoplastic lesions of the cervix. Recent extensive studies have revealed the existence of more than 70 types of HPV, approximately 30 of which can infect the cervical epithelium and give rise to various lesions of the cervix [9]. Moreover, each HPV type has been shown to be associated with a different risk of neoplastic transformation by cervical epithelial cells, and the HPV subtypes have been classified into two categories according to the frequency they appear associated with cervical cancer: high and low oncogenic risk [6,9,10]. High-risk HPV types (HR-HPV), particularly HPV type 16 and 18, have been identified in the majority of cervical cancer [4].

HPV contributes to neoplastic progression predominantly through the action of two viral oncoproteins, namely E6 and E7, which interact with various cell cycle regulatory proteins [3,5]. The E6 oncoprotein induces premature degradation of the p53 tumor suppressor protein. The E7 oncoprotein binds to the tumor suppressor protein pRb, which inhibits progression into the S phase of cell cycle and is regulated via phosphorylation by the complex cyclin D1/CDK. Progressive and prolonged phosphorylation of the Rb protein leads to its inactivation and reduction of its growth suppressive activity. The probe inactivation by E7 favors the release of E2F-like transcription factors from probe, which allows the activation of CDK and transcription activation of genes encoding protein related to cell cycle progression [3,4,11].

In normal cells, the activity of CDKs is tightly regulated by several CDK inhibitors, including p16^{INK4a}. This CDK inhibitor is inactivated in many cancers by mutation, deletion or hypermethylation of the gene, resulting in reduced or absent expression of the p16 gene product [4,11-14]. P16^{INK4a} is a tumor suppressor protein that inhibits cdk4 and cdk6, which phosphorylate the Rb protein. A reciprocal relation between p16 and pRb expression has been observed, suggesting the presence of a negative feedback loop allowing pRb to limit the concentration of p16. p16^{INK4a} overexpression has been demonstrated in cervical cancer as a result of functional inactivation of pRb by the HPV E7 protein [9,11,15]. This overexpression could suggest a possible potential of p16 as a marker for cervical intraepithelial lesions and cervical cancer.

In the present work, we report the analysis of p16^{INK4a} expression in cervical preneoplastic and neoplastic lesions and compare the analysis of p16^{INK4a} expression with lesion grade.

MATERIAL AND METHODS

Paraffin embedded cervical samples from 54 women with no normal histological results were analyzed for p16 expression. Cervical samples were obtained from subjects with colposcopic referral to biopsy of the uterine cervix attending the Gynecology Service of São Lucas Hospital – PUCRS, from December 1999 to December 2001, with a complete medical history report. This study was approved by the local ethical committee. (Protocol nº 288/03-CEP)

Immunohistochemistry

Cervical biopsy samples were selected from pathology files of São Lucas Hospital – PUCRS. All samples were fixed in formalin and embedded in paraffin by conventional techniques. Haematoxylin and eosin stained slides of all samples were classified by a certified pathologist.

Serial sections (5 µm thick) of formalin-fixed and paraffin embedded biopsy samples were cut and mounted on *Novobond*[®] (Novocastra laboratories Ltd) slide tissue adhesive coated glass slides. Sections were dewaxed by passage

through xylene and then rehydrated in graded alcohol (100%, 90%, 80% and 70%). Endogenous peroxidase activity was blocked by incubating the section in 3% H₂O₂ for 10 minutes. Slides were then rehydrated with 0,01M citrate buffer (pH 6) and microwaved 3 times, without boiling, for antigen retrieval. After rinsing with 0,01 mol/L phosphate buffered saline (PBS), pH 7,4, nonspecific antibody binding was reduced by incubating the sections with prediluted blocking serum (normal horse serum, Novostain universal detection kit, Novocastra laboratories Ltd) for 10 minutes. After decanting excess serum, sections were incubated overnight at 4°C with a mouse antihuman p16^{INK4A} monoclonal antibody (Novocastra laboratories Ltd) at a 1:150 dilution in PBS. After washing thoroughly with PBS, sections were incubated with biotinylated universal secondary antibody (Novostain universal detection kit, Novocastra laboratories Ltd) for 10 minutes, followed by incubation with Ready-to-use streptavidin-peroxidase conjugate (Novostain universal detection kit, Novocastra laboratories Ltd) for 10 minutes. Slides were developed with diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) for 10 minutes and counterstained lightly with haematoxylin.

Interpretation of p16^{INK4A} staining

Immunostaining of the formalin-fixed, paraffin embedded sections was reviewed three times to confirm the results, and strong nuclear as well as cytoplasmic staining was considered a positive reaction. The distribution of p16

^{INK4A} positive was scored on a semiquantitative scale as follows: (-) none, (+) less than 5% of the cells, (++) 5-50% of the cells, and (+++) more than 50% of the cells.

DNA isolation and HPV typing

DNA from cervical samples was extracted according to proteinase K standard protocols [16]. In HPV detection, a polymerase chain reaction using consensus degenerate primers My 09 (5'-CGT CC^A/_C AA^A/_G GGA ^A/_TAC TGA TC-3') and My 11 (5'-GC^A/_C CAG GG^A/_T CAT AA^C/_T AAT GG-3') was performed. Reaction mix was: 20mM Tris-HCl (pH 8.4), 50mM KCl, 2mM MgCl₂, 200nM dNTP mix, 50 pmol of each primer, 1U *Taq* DNA polymerase (CenbiotTM), 2 µl of extracted DNA. Amplification conditions were: 95° for 5 minutes; 40 cycles 95°C/1 minute, 55°C/1 minute, 72°C/1 minute; 72°C for 10 minutes. DNA viability of the negative samples was checked by a PCR with primers complementary to the human beta-globin gene [17]. PCR products were electrophoresed on a 2% agarose gel containing 0.5µg/ml ethidium bromide in TAE buffer and analysed under UV light. All HPV positive samples were tested by a type specific PCR for HPV 16, 18, 31 and 33. PCR conditions and primers used are described in Cuzick et al [18].

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using chi-square using *P*- values of 0,05 or less were considered statistically significant. Using software EPI INFO 2000 (version 3), EPI INFO 6.0 and Microsoft Office-Excel (version 97).

RESULTS

A total of 54 samples from patients with cervical lesions were analyzed for p16 expression consisting on 6 (11.1%) cases of LSIL, 21 (38.9%) of HSIL and 27 (50%) of cancer (23 cervical squamous cell carcinoma and 4 adenocarcinoma). Patients' age ranged from 17 to 59 (40.9 ± 10.86) years. Mean age of patients with LSIL was 30,3 (± 12.48), HSIL was 38,2 (± 10.41) and cancer was 45,4 (± 8.66).

HPV status was obtained from each patient file, and correspond to My09/11 PCR results. HPV typing was determined by type specific PCR for HPV 16, 18, 31 and 33. HPV data is summarized in Table 1.

When considering single or multiple infections, HPV16 was the predominant type, present in 45.8% of HPV positive cases. The association of HPV16/31 was the most frequent multiple infection observed (7 of 15 multiple infection cases), followed by HPV16/18/31 (4 of 15), HPV16/18 (2 of 15), HPV18/31 (1 of 15) and HPV16/18/33 (1 of 15). Analyzing the proportion of cancer cases according to HPV type we observed that among HPV16 positive samples 59.1% were cancer, HPV18 positive samples 83.3% were cancer, HPV31

positive samples 47.1% were cancer and types different from the tested ones 43.7% samples were cancer.

The results for p16 expression in relation to lesion grades are summarized in Table 2. A statistically significant association was observed between lesion grade and p16 expression ($\lambda^2=39.74$ and $p= 0.00000051$) (Figure 1).

In all p16-positive samples, both nuclear and cytoplasmic staining were observed. Figure 2 show the classification of p16 expression (Figure 2).

Expression of p16 was also analyzed according to HPV type. Results are summarized in Table 4.

DISCUSSION

According to the Brazilian National Institute of Cancer (*Instituto Nacional do Câncer-INCA*) women most frequently develop cervical cancer at the age of 45 to 49 years old [19]. In North America, the median age at cervical cancer diagnosis is 47 years, and nearly half of the cases are diagnosed before the age of 35 [5]. The mean age of women with SIL is 15.6 years younger than that of women with invasive cancer, suggesting a slowed progression of SIL to invasive cancer [20]. Our study showed similar mean age for patients with cancer suggesting the same slow progression; mean age of LSIL was 30.3 years, HSIL was 38.2 years and cancer 45.4 years. The difference between mean age of cancer and LSIL was 15.1 years.

HPV-16 is the most prevalent type worldwide. It is frequently detected in SIL and cancer cases. In our study, HPV-16 was the most frequent HPV type (45,8%) and 59,1% of these samples were cancer cases. HPV-18 is considered the most aggressive HPV type and may be a negative prognostic factor [7]. HPV-18 has been associated with poorly differentiated carcinomas and a high rate of disease recurrence [20]. In our study, 83.3% of HPV18 positive samples were cancer. These results corroborate the hypothesis that HPV-18 is a more aggressive HPV type.

The pRb and p53 pathways of the cell cycle regulatory cascade are central to the regulation of the G1 to S phase transition and to the understanding of human cancer [21]. HPV infection is critically involved in cervical carcinogenesis and plays an important role in this regulatory cascade by the binding of its oncoproteins E6 and E7 to the tumor suppressor genes p53 and pRb respectively [22].

In our study, 96.3% (26/27) of cancer cases were HPV positive. According to Walboomers in cervical cancer 99.7% is HPV positive suggesting that HPV is a necessary but not sufficient cause of cervical cancer [23].

P16^{INK4a} plays an important role in the regulation of cell cycle. CDK4/6 form complexes with cyclin D, which regulates the progression of the cell cycle. pRb binds to E2F transcription factors and suppresses their role in transcription during the G1 phase. pRb is inactivated and dissociated from the pRb-E2F complex after phosphorylation by cyclin D-CDK4/6 during G1 phase. The activity of cyclin D-CDK4/6 is negatively regulated by inhibitors of the

cyclin/CDK complex, such as p16^{INK4a}, which bind directly to CDK4/6 or the cyclin D-CDK4/6 complexes. Therefore, lack of functional p16^{INK4a} results in abnormal cell cycle progression, which is associated with carcinogenesis of cancers [24-26]. The overexpression of p16^{INK4a} in cervical neoplasia has been reported to be associated with HPV and an inverse correlation has been found between pRb function and overexpression of p16^{INK4a}. Inactivation of pRb results in overexpression of p16^{INK4a}, and transcriptional activity of p16^{INK4a} appeared to be repressed by pRb. HPV E7 protein is responsible for an increase in p16^{INK4a} level. p16^{INK4a} mRNA was strongly induced by E2F and accumulation of E2F might induce the overexpression of p16^{INK4a} [3, 25]. According to these hypotheses, dysfunction of pRb through HPV E7 protein should increase free E2F and results in both abnormal cell cycle progression and p16^{INK4a} overexpression [27]. Our results are in accordance with this hypothesis showing a high expression of p16^{INK4a} in 93.75% of all samples (n=48) HPV positive with the exception of 5 cervical lesions negative for HPV and positive for p16^{INK4a} expression (2 LSIL, 2 HSIL and 1 cancer). These results suggest that HPV independent mechanisms can lead to p16 expression in these cervical lesions.

Our work showed negative p16 expression in 2 LSIL and 1 HSIL HPV positive cases, suggesting a possible inactivation of the p16 gene. Mutation and deletion of p16 were thought to be rare events. Methylation of the p16 was thought to be one of the important mechanisms of p16 loss. There may yet exist an alternative translational mechanism, or posttranslational degradative mechanism, for the loss of p16 protein expression [28].

A study conducted by Sano T. and col concluded that p16^{INK4a} is overexpressed in most cervical lesions and the status of its immunoreactivity allows differentiation between infection with low risk HPV and high risk HPV [9]. Klaes R. and col. demonstrated that p16-specific immunohistochemical staining allows the sensitive and specific identification of dysplastic cervical cells in tissue sections or cervical smear [4]. Murphy N. and col. suggest that p16^{INK4a} marks dysplastic squamous and glandular cells of the cervix with a sensitivity of 99,9 % and specificity of 100% [11].

In our study we found that p16^{INK4a} is expressed in precursor lesions and the expression is higher in cervical cancer. In samples HPV positive p16^{INK4a} expression was observed in 1 of 3 LSIL, in 18 of 19 HSIL and in all cancer (26). These results corroborate the hypothesis that functional inactivation of pRb by HPV-E7 protein induces p16^{INK4a} expression in cervical lesions and the inactivation of pRb and p53 pathways in the cell cycle regulatory cascade occurs during the early immortalization step by HPV in cervical carcinogenesis, not during late malignant transformation [15]. We could consider the p16^{INK4a} a good marked for cervical dysplastic lesions and cancers cases. The use of this approach will help to reduce interobserver variation in interpretation of the respective samples and thus might substantially contribute to improved quality of current cervical cancer screening programs.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Emilio Antônio Jeckel Neto, Dra. Denise Cantarelli Machado, Dr. Vinicius Duval da Silva, Vinícius S. Michaelsen and Raquel Mattos de Oliveira for technical assistance.

REFERENCES

- [1] Lagunas IA. Câncer cérvico uterino. Centro Universitário de Ciências de la Salud [página da universidade] 2001 março [capturado 2001 abril 25] [10 telas] Disponível em: <http://www.imformador.com.mx/lastest/ene97/21ene97/univz.htm> .
- [2] Who (World Health Organization)- Initiative for Vaccine Research (IVR)- Human papilloma virus. [Capturado em 2003 Apr 30]; Disponível em: : http://www.who.int/vaccine_research/documents/new_vaccines/en/index8.html
- [3] Doeberitz MVK. Searching for new biomarkers for cervical cancer: molecular accidents and the interplay of papillomavirus oncogenes and epithelial differentiation Part I e II. Papillomavirus Report 2002; 13 (2):35-74.
- [4] Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U. Overexpression of p16INK4a as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. Int Journal Cancer 2001;92: 276-284.
- [5] Waggoner SE. Cervical Cancer. The Lancet 2003 Jun;361:2217-2225.
- [6] Berek JS. Novak Tratado de Ginecologia. 12a edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogam;1998.
- [7] DiSaia P.J., Creasman W.T.. Clinical Gynecologic Oncology. 5th ed. Library of Congress; 1997.

- [8] Naomi Jay NP; Anna-Barbara Moscicki. Human Papillomavirus Infections in Women With HIV Disease: Prevalence, Risk, and Management .The AIDS Reader. 2000; 10(11):659-668.
- [9] Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, Fukuda T, Nakajima T. Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. American Journal of Pathology 1998 Dec; 153 (6):1741-1748.
- [10] Murakami M, Gurski KJ, Steller MA. Human Papillomavirus Vaccines for Cervical Cancer. J Immunother 1999 May;22(3):212-8.
- [11] Murphy N, Ring M, Killalea AG, Uhlmann V, O'Donovan M, Mulcahy F. p16INK4a as a marker for cervical dyskaryosis: CIN and cGIN in cervical biopsies and ThinPrep™ smear. J Clin Pathol 2003; 56:56-63.
- [12] Piccinin S, Doglioni C, Maestro R, Vukosavljevic T Gasparotto D, D'Orazi C, Boiocchi M. p16/CDKN2 and CDK4 gene mutations in sporadic melanoma development and progression. Int J Cancer 1997;74: 26-30.
- [13] Zhao P, Hu YC, Talbot I. Expressing patterns of p16 and CDK4 correlated to prognosis in colorectal carcinoma. World J Gastroenterol 2003 Oct; 9 (10): 2202-2206.
- [14] Zhou Y, Gao SS, Li YX, Fan ZM, Zhao X. Tumor suppressor gene p16 and Rb expression in gastric cardia precancerous lesions from subjects at a high incidence area in northern China. World J Gastroenterol 2002;8 (3):423-425.
- [15] Langosch KM, Riethdorf S, Pöppighaus AK, Riethdorf L, Löning T. Expression of cyclin-dependent kinase inhibitors p16MTS1, p21WAF1 and

- p27KIP1 in HPV –positive and HPV- negative cervical adenocarcinomas. *Virchows Arch* 2001; 439: 55-61.
- [16] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Appendix E: Commonly used techniques in molecular cloning. Purification of Nucleic Acids. *In: Molecular Cloning: a laboratory manual*. 3rd Ed. New York: Cold Spring Harbor, 1999, 3v., p. E. 3-4
- [17] Bauer, HM & Manos, MM. PCR Detection of Genital Human Papillomavirus. *In: Diagnostic Molecular Microbiology*, Persing, D. (ed.) American Society for Microbiology. 1993;407-413.
- [18] Cuzick J, Terry G, Ho L, Hollingworth T, Anderson M. Type-specific human papillomavirus DNA in abnormal smears as a predictor of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Br. J. Cancer*. 1994;69: 167-171.
- [19] INCA (Instituto nacional do Câncer) – Ministério da Saúde. [Capturado em 2004]. Disponível em URL: [.http://www.inca.gov/](http://www.inca.gov/)
- [20] DeVita VT, Hellman S, Rosenberg, SA. *Cancer : principles and practice of oncology*. Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins, 2001. 3235 p.
- [21] Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K e Walter P. *Fundamentos de Biologia Celular. Uma Introdução a Biologia Molecular da Célula*. Porto Alegre. Editora Artes Médicas, 1999.
- [22] Sano T, Masuda N, Oyama T, Nakajima T. Overexpression of p16 and p14ARF is associated with human papillomavirus infection in cervical squamous cell carcinoma and dysplasia. *Patho Int* 2002; 52:375-383.
- [23] Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM Bosch FX, Kummer JÁ, Sh KV.

Human Papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide 1999 Sep;189 (1): 12-19.

- [24] Bringold F, Serrano M. Tumor suppressors and onogenes in cellular senescence. *Esperimental Gerontology* 2000;35: 317-329.
- [25] Masumoto N, Fujii T, Ishikawa M, Saito M, Nozawa S. p16INK4a overexpression and Human Papollomavirus infection in small cell carcinoma of the uterine cervix. *Human Pathology* 2003 Aug; 34(8): 778-783.
- [26] Serrano M. The tumor suppressor protein p16INK4a. *Exp Cell Res* 1997;237: 7-13.
- [27] Cho NH, Kim YT, Kim JW. Alteration of cell cycle in cervical tumor associated with human papillomavirus –cyclin-dependent kinase inhibitors. *Yonsei Medical Journal* 2002;43 (6):722-728.
- [28] Tsuda H, Hashiguchi Y, Nishimura S, Kawamura N, Inoue T Yamamoto K. Relationship between HPV typing and abnormality of G1 cell cycle regulators in cervical neoplasm. *Gyn Oncol* 2003; 91: 476-485.

ARTICLE PRÉCIS

Correlate the expression levels of the tumor suppressor p16^{INK4a} with lesion grade in cervical samples with diagnosis of LSIL, HSIL and cancer.

FIGURES

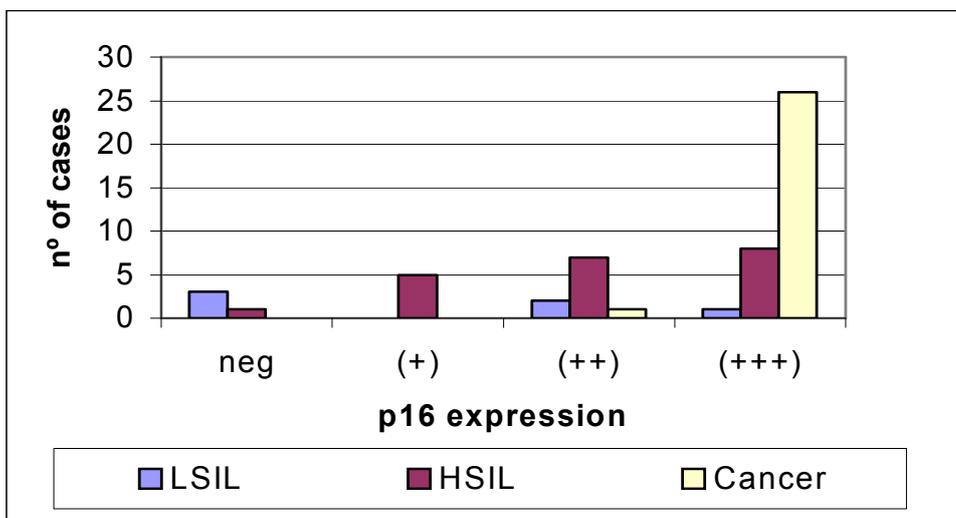


Figure 1. Distribution of p16^{INK4a} expression level in different lesion grades ($\chi^2=39.74$ and $p= 0.00000051$).

LSIL = low squamous intraepithelial lesions,
HSIL = high squamous intraepithelial lesions

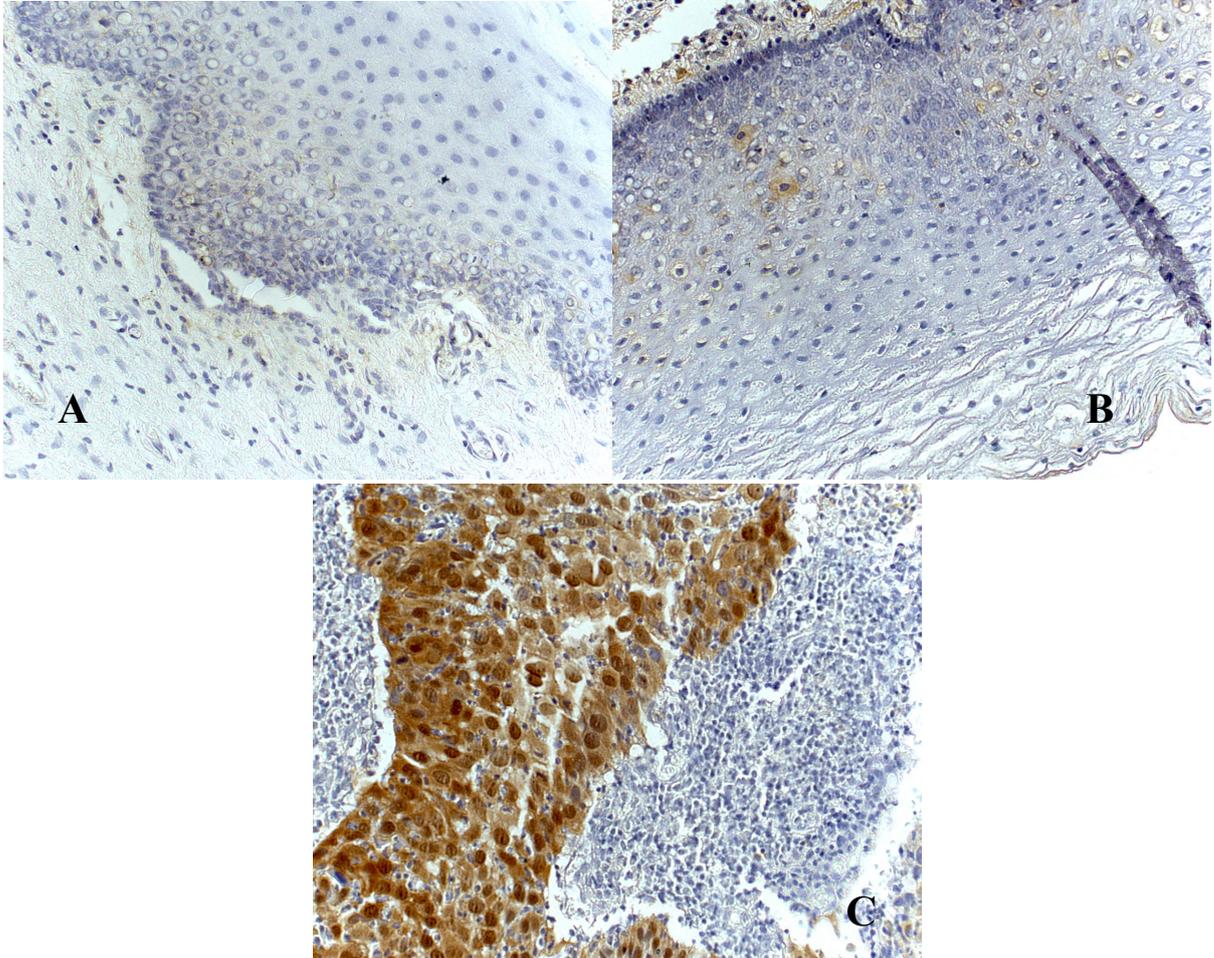


Figure 2: Expression levels of p16^{INK4a} in cervical samples (x 400). A) Positive +, HSIL sample. B) Positive ++, HSIL sample. C) Positive +++, cancer sample.

TABLES

Table 1: Frequency of HPV types in different lesion grades

	HPV16 (%)	HPV18 (%)	HPV31 (%)	Multiple* (%)	NI** (%)	Negative (%)	Total (%)
LSIL	1(16.7)	-	-	1(16.7)	1(16.7)	3(50)	6(100)
HSIL	2(9.5)	-	4(19.1)	5(23.8)	8(38.1)	2(9.5)	21(100)
Cancer	5(18.5)	4(14.8)	1(3.7)	9(33.4)	7(25.9)	1(3.7)	27(100)
Total	8(14.8)	4(7.4)	5(9.3)	15(27.8)	16(29.6)	6(11.1)	54(100)

* Infection with multiple HPV types

** NI - not identified HPV type or different from 16,18,31 and 33

LSIL= low squamous intraepithelial lesions,

HSIL= high squamous intraepithelial lesions

Table 2: Distribution of p16 expression level in different lesion grades

	<i>P16 expression</i>			
	Negative (%)	+	++	+++ (%)
LSIL (n=6)	3(50.0)	-	2(33.3)	1(16.6)
HSIL (n=21)	1(4.8)	5(23.8)	7(33.3)	8(38.1)
Câncer (n=27)	-	-	1(3.7)	26(96.3)

LSIL= low squamous intraepithelial lesions,

HSIL= high squamous intraepithelial lesions

Table 3: Frequency of HPV types according to p16 expression level

P16 expression	<i>HPV type</i>					<i>HPV</i>
	16(%)	18(%)	31(%)	Multi*(%)	NI**(%)	<i>Negative</i>
negative	1 (12.5)	-	-	1 (6.7)	1 (6.3)	1 (16.7)
+	-	-	2 (40)	1 (6.7)	2 (12.5)	-
++	1 (12.5)	-	-	4 (26.7)	2 (12.5)	3 (50)
+++	6 (75)	4 (100)	3 (60)	9 (60)	11 (68.7)	2 (33.3)
Total	8 (100)	4 (100)	5 (100)	15 (100)	16 (100)	6 (100)

* Infection with multiple HPV types

** NI - not identified HPV type or different from 16,18,31 and 33

LSIL= low squamous intraepithelial lesions,

HSIL= high squamous intraepithelial lesions

4. DISCUSSÃO

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), a maioria das mulheres desenvolvem o câncer cervical na idade entre 45 e 49 anos (INCA, 2004). Segundo Waggoner, o câncer de colo do útero geralmente é diagnosticado antes dos 50 anos, alguns anos antes da média de idade do diagnóstico do câncer de mama, pulmão e ovário. Na América do Norte, a média de idade para o diagnóstico do câncer cervical é 47 anos, porém o diagnóstico da metade destes casos foi feito antes dos 35 anos (Waggoner,2003).

DeVita e colegas relatam que a média de idade das pacientes com SIL é 15,6 anos inferior à média das pacientes com câncer (DeVita *et al.*, 2001). DiSaia e colegas apontam que a média de idade das pacientes com lesões displásicas é entre 10 e 15 anos menor do que a média de idade das pacientes com câncer invasor (DiSaia *et al.*, 1997).

Neste estudo, a média de idade das pacientes com LSIL foi de 30,3 anos, com HSIL foi de 38,2 e com câncer foi de 45,3 anos. A diferença observada entre a média de idade das pacientes com câncer e a média de idade das pacientes com LSIL foi de 15,1 anos. Esta análise está de

acordo com os dados da literatura, confirmando a lenta progressão das lesões precursoras do câncer até a instalação do câncer cervical invasivo.

Schiffman e colegas, revisando estudos epidemiológicos sobre o papel do HPV no câncer cervical, constataram que mulheres sem HPV não desenvolvem câncer e que não necessariamente mulheres que tem HPV vão desenvolver câncer (Schiffman *et al.*, 2003).

Segundo Waggoner, ao revisar a literatura sobre câncer cervical, mais de 90% dos cânceres cervicais apresentam o DNA do HPV (Waggoner, 2003). De acordo com Walboomers, 99,7% dos cânceres cervicais apresentam infecção pelo HPV (Walboomers *et al.*, 1999).

Os resultados deste estudo estão de acordo com a literatura pois nos casos de câncer 96,3% (26/27) eram positivos para HPV. Observando nossos dados e os dados de literatura podemos concluir que o HPV é um agente necessário para o desenvolvimento do câncer mas somente o HPV não é suficiente. É necessário que outros fatores de risco estejam associados para o desenvolvimento do câncer.

O HPV16 é o tipo de HPV mais comum em todo o mundo, representando 53% entre todos os tipos. Este tipo viral é freqüentemente encontrado tanto em SIL como em câncer (DiSaia *et al.*, 1997; Muñoz, 2000). Neste estudo o HPV16 foi também o tipo mais freqüente, representando 40,8% das amostras HPV positivas. Das amostras positivas para HPV16, 59,1% eram de casos de câncer, mostrando assim o poder oncogênico deste tipo viral.

O HPV18 é considerado o tipo de HPV mais agressivo e está relacionado com prognóstico ruim (DiSaia *et al.*, 1997). Este tipo viral está também relacionado com carcinomas pouco diferenciados e com altas taxas de recorrência da doença (DeVita *et al.*, 2001).

Neste estudo, 83,3% das amostras positivas para o HPV18 eram casos de câncer. Estes dados concordam com os dados que apontam o HPV18 como o tipo de HPV mais agressivo. A amostra deste estudo tem se mostrado de acordo com os dados da literatura, mesmo sendo uma amostra pequena.

Estudos epidemiológicos de Franco e colegas e de Kirwan e colegas demonstraram que além do HPV, outros fatores são importantes para o desenvolvimento do câncer cervical. Estes fatores são: idade do início da atividade sexual, número de parceiros sexuais, promiscuidade do parceiro sexual, número de partos, uso de contraceptivo oral e tabagismo (Franco *et al.*, 2001; Kirwan *et al.*, 2001).

Além dos fatores de risco mencionados anteriormente, Schiffman e colegas apresentaram como fator de risco aliado à presença do HPV, o *status* da imunidade mediada pela célula, fatores genéticos, inflamações cervicais, infecções por *Chlamydia trachomatis* e aquisição de outras doenças sexualmente transmissíveis. Isto mostra a deficiência e a necessidade de uma nova geração de marcadores biológicos do risco, que vai distinguir infecções por HPV com tipos oncogênicos, com

preditividade positiva dos que tem preditividade negativa para o risco de desenvolvimento do câncer cervical (Schiffman *et al.*, 2003).

Entre diversos tipos de estudos para o estabelecimento de fatores de risco associados ao HPV, a análise do polimorfismo do códon 72 do gene *TP53* sugere que pacientes homozigotas para o alelo que codifica arginina (Arg/Arg p53) teriam um risco aumentado de câncer cervical associado ao HPV. Anschau e colegas investigaram o polimorfismo em pacientes com câncer cervical associado ao HPV e em pacientes sem alterações cervicais, avaliando implicações do mesmo no desenvolvimento do câncer cervical. As pacientes Arg/Arg p53 possuem 3,6 vezes mais risco de desenvolver câncer em comparação com pacientes Pro/Pro p53 (prolina) (Anschau, 2002).

Putte e colegas pesquisaram a expressão da p16^{INK4a} em câncer cervical como fator prognóstico, porém não foi encontrada uma relação positiva. No entanto, os autores sugerem estudos adicionais para confirmar os resultados. Alguns estudos em outros tipos de câncer, como câncer de endométrio e no melanoma, sugerem que a perda da expressão de p16 está relacionada com a diminuição de sobrevida das pacientes (Putte *et al.*, 2002).

Campisi sugere que a senescência celular pode ser um potente, porém imperfeito, mecanismo de supressão tumoral (Campisi, 2001). Sendo assim, parece impossível retardar o envelhecimento sem estimular

os mecanismos da carcinogênese ou bloquear a formação do tumor sem acelerar o processo de envelhecimento (Pelicci,2004).

Estudos seguindo esta mesma linha, têm demonstrado o papel do supressor tumoral p16^{INK4a} na senescência celular. A senescência requer a ativação dos mecanismos de controle do ciclo celular como p16-pRb e p53 (Parkinson *et al.*, 2000; Sharpless *et al.*, 2004). Segundo Bringold, a característica mais importante da p16^{INK4a} é de ter sua transcrição regulada em resposta à senescência e ao estresse oncogênico (Bringold *et al.*, 2000).

O potencial oncogênico e de imortalização do oncogene *Bmi-1* foi recentemente ligado à sua capacidade de regular negativamente a expressão do gene da p16^{INK4a}. A ativação anormal de *Bmi-1* ainda não foi relatada em cânceres humanos, mas existem fortes evidências de que a superexpressão de *Bmi-1* em camundongos resulta em leucemia. Um estudo realizado por Jacobs e colegas utilizando fibroblastos de embriões de camundongos geneticamente modificados deficientes em *Bmi-1* mostrou que os fibroblastos apresentavam alta expressão de p16^{INK4a} e entravam prematuramente em senescência. Ao contrário, células duplamente deficientes em p16^{INK4a} e *Bmi-1* não entravam prematuramente em senescência. Este estudo demonstrou a importância da p16^{INK4a} como supressor tumoral e no processo de senescência (Bringold *et al.*, 2000; Jacobs *et al.*, 1999).

Pelicci sugere que as células progenitoras sofrem uma série de lesões no DNA e se as proteínas p53 e p16-pRb, que controlam o ciclo celular, não forem eficientes, ocorre a formação de tumores. No entanto, se estes controladores do ciclo celular agirem de forma eficiente, inibindo a carcinogênese, essas células vão ser encaminhadas à apoptose ou à senescência celular, e ao longo da vida esse processo leva ao envelhecimento do organismo (Pelicci, 2004).

A infecção pelo HPV está envolvida no desenvolvimento do câncer cervical. As proteínas E6 e E7 dos HPVs de alto risco são capazes de se ligar à p53 e à pRb, respectivamente, inibindo suas atividades de supressão tumoral (Sano *et al.*, 2002). A superexpressão da p16^{INK4a} em lesões precursoras e no câncer, observada neste estudo, sugere que esta alta expressão seria um mecanismo compensatório, na tentativa de ativar o processo de senescência celular com a finalidade de inibir o desenvolvimento do câncer. Entretanto, estudos complementares são necessários para podermos avaliar o real papel da p16^{INK4a} na senescência como tentativa de bloquear o câncer cervical.

A disfunção da pRb causada pela proteína E7 do HPV favorece o aumento do fator de transcrição E2F livre, que resulta na progressão anormal do ciclo celular e na superexpressão da p16^{INK4a} (Cho *et al.*, 2002). Os resultados deste trabalho estão de acordo com esta hipótese, mostrando alta expressão de p16^{INK4a} na grande maioria das lesões precursoras e no câncer cervical (Table 2 e 3). Discordando desta

hipótese 5 amostras negativas para HPV (2 LSIL, 2 HSIL e 1 câncer) apresentaram expressão da p16^{INK4a}. Estes resultados sugerem que um mecanismo independente do HPV tenha resultado na expressão da p16^{INK4a}, por exemplo mutações alterando a função da pRB.

Em 3 amostras positivas para HPV (2 LSIL e 1 HSIL), não foi observada a expressão da p16^{INK4a}, podendo ser sugerida a inativação do gene da p16^{INK4a}. Tsuda e colegas relatam os possíveis mecanismos que podem levar à perda da expressão da p16^{INK4a}: i) mutação e deleção no gene da p16 parece ser um evento raro; ii) a metilação da p16 parece ser um dos mecanismos mais importantes relacionados à perda da p16^{INK4a}; iii) a existência de um mecanismo alternativo de translação ou de degradação pós-transcricional, levando à perda da expressão da p16^{INK4a} (Tsuda *et al.*, 2003).

Alguns estudos têm sugerido e testado a viabilidade de observar a expressão da p16^{INK4a} em amostras citológicas (Reichert, 2004; Trunk-Gehmacher, 2004). Seria muito interessante analisar a expressão da p16^{INK4a} em amostras citológicas, pois forneceria uma melhor idéia da gravidade das lesões antes mesmo da realização da biópsia, ou no caso de células com sutis alterações mas com alta expressão de p16^{INK4a} poderia indicar a necessidade de exames complementares.

Na tentativa de compreender melhor a relação entre a supressão da p16^{INK4a} e a infecção pelo HPV na carcinogênese do colo do útero, Sano e colegas observaram a expressão da p16^{INK4a} em

amostras cervicais. Os autores constataram que a expressão da p16^{INK4a} em lesões com HPV de alto e intermediário risco para o desenvolvimento do câncer difere da expressão em amostra com HPV de baixo risco. Esta diferença está provavelmente relacionada à eficiência com que a proteína E7 dos diferentes tipos de HPV age para inativar a pRb (Sano *et al.*, 1998).

Klaes e colegas observaram a marcação da superexpressão da p16^{INK4a} na maioria das amostras com CIN I, CIN II, CIN III e em câncer. Ao contrário, não foi observada expressão da p16^{INK4a} em amostras de epitélio cervical normal. Assim, os autores concluíram que a p16^{INK4a} é um marcador específico para identificar displasia no epitélio cervical, em biópsias e em raspados cervicais (Klaes *et al.*, 2001).

Murphy e colegas analisaram o potencial da p16^{INK4a} como marcador de displasias cervicais de células escamosas e glandulares em amostras de tecido e de raspado cervical. Os autores verificaram que a marcação pela p16^{INK4a} apresenta sensibilidade de 99,9% e especificidade de 100% para displasias cervicais, concluindo que a p16^{INK4a} é um bom marcador para estes tipos de displasias (Murphy *et al.*, 2002).

Masumoto e colegas observaram a expressão da p16^{INK4a} em carcinomas de células pequenas do colo do útero. Este tipo de carcinoma é considerado um dos tipos de câncer cervical mais agressivo o que geralmente está relacionado com prognóstico ruim. Foi constatado que a p16^{INK4a} é superexpressa neste tipo de carcinoma e que em 90% dos

casos a infecção era pelo HPV18, considerado um dos tipos mais agressivos (Masumoto *et al.*, 2003).

Neste estudo foi relacionada a gravidade das lesões cervicais com a expressão da p16^{INK4a}, sendo observada uma relação direta entre a gravidade das lesões e os níveis de expressão. Nas amostras cervicais HPV positivas foi observada a expressão da p16^{INK4a} em 1 das 3 LSIL (33,3%), em 18 das 19 HSIL (94,7%), e em todas as 26 amostras de câncer (100%). Ao relacionar a alta expressão da p16^{INK4a} (+++) com as lesões observou-se: que nenhuma amostra era (+++) nos casos de LSIL; que 42,1% das amostras eram (+++) nos casos de HSIL e que 96,1% das amostra eram (+++) nos casos de câncer, comprovando-se claramente que em lesões mais graves há uma maior expressão da p16^{INK4a}. Os resultados sugerem que a p16^{INK4a} é expressa em lesões precursoras e que sua expressão aumenta gradativamente com o aumento da gravidade das lesões ($p < 0,01$). Esses dados estão de acordo com a literatura e sustentam a hipótese de que o caminho da inativação da pRb e da p53 pelo HPV ocorre durante o início da carcinogênese. Os resultados encontrados apóiam a proposta de que a p16^{INK4a} pode ser utilizada como marcador das lesões precursoras e do câncer cervical.

5. CONCLUSÕES

1. Foi observada a expressão da p16^{INK4a} em 3 de 6 casos de LSIL (50%), 20 de 21 HSIL (95,2%) e em todas as 27 amostras de câncer cervical (100%).
2. Foi verificado que a expressão da p16^{INK4a} aumentou de forma estatisticamente significativa com o aumento da gravidade das lesões ($p < 0,001$) podendo, portanto, a p16^{INK4a} ser considerada um bom marcador de lesões pré-malignas e malignas do colo do útero.
3. Dentre as amostras positivas para HPV (n=48), foi observada a expressão de p16^{INK4a} em 1 de 3 LSIL (33.3%), 18 de 19 HSIL (94.7%) e em todas as 26 amostras de câncer (100%). Nas amostras negativas para HPV (n=6), foi observada a expressão da p16^{INK4a} em 2 de 3 LSIL (66,6%), em todas amostras de HSIL (n=2) e em todos os casos de câncer (n=1). Apesar do número pequeno de amostras HPV-negativas analisadas neste estudo, a alta expressão de p16^{INK4a} sugere a existência de um mecanismo independente de HPV que afeta a sua expressão nas amostras de cérvix alteradas negativas para HPV.

4. Neste trabalho, o tipo de HPV encontrado com maior frequência nas lesões pré-malignas e malignas do colo uterino foi o HPV16.
5. Analisando a frequência de casos de câncer em cada tipo de HPV encontrado, o maior valor observado foi para HPV18, onde 83,3% das amostras positivas para este tipo correspondiam a casos de câncer.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K e Walter P. Fundamentos de Biologia Celular. Uma Introdução a Biologia Molecular da Célula. Porto Alegre. Editora Artes Médicas, 1999.
- Anschau F. O polimorfismo no códon 72 do gene TP53 e o risco para câncer do colo uterino associado ao papilomavírus humano. Porto Alegre (RS):PUCRS (Dissertação de Mestrado) ; 2002.
- Arking R. Biology of Aging. Sunderland: Sinauer Associates; 1998.
- Bauer, HM & Manos, MM. PCR Detection of Genital Human Papillomavirus. In: Diagnostic Molecular Microbiology, Persing, D. (ed.) American Society for Microbiology. 1993;407-413.
- Berek JS. Novak Tratado de Ginecologia. 12a edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogam;1998.
- Bringold F, Serrano M. Tumor suppressors and onogenes in cellular senescence. *Esperimental Gerontology* 2000;35: 317-329.
- Campisi J. From cells to organisms: can we learn about aging from cells in culture? *Experimental Gerontology*. 2001, 36 (4-6): 607-18.
- Carvalho JJM, Oyakawa N, editores. I Consenso Brasileiro de HPV. 1a

edição. São Paulo: BG cultural; 2000.

Cho NH, Kim YT, Kim JW. Alteration of cell cycle in cervical tumor associated with human papillomavirus –cyclin-dependent kinase inhibitors. *Yonsei Medical Journal* 2002;43 (6):722-728.

Cristofalo VJ, Gerhard GS, Pignolo RJ. Biologia molecular do envelhecimento. In: Clínicos cirúrgicos da América do Norte. Zewman & Rosly J.J. vol. I., Interlivros edições Ltda. Rio de Janeiro, 1994.

Cuzick J, Terry G, Ho L, Hollingworth T, Anderson M. Type-specific human papillomavirus DNA in abnormal smears as a predictor of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Br. J. Cancer*. 1994;69: 167-171.

De Luca LA. Ginecologia: semintologia clínica e laboratorial. São Paulo: Sarvier; 1991.

DeVita VT, Hellman S, Rosenberg, SA. *Cancer : principles and practice of oncology*. Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins, 2001. 3235 p.

DiSaia P.J., Creasman W.T.. *Clinical Gynecologic Oncology*. 5th ed. Library of Congress; 1997

Doeberitz MVK. New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. *European Journal of Cancer* 2002; 38: 2229-2242.

Doeberitz MVK. Searching for new biomarkers for cervical cancer: molecular accidents and the interplay of papillomavirus oncogenes and epithelial differentiation Part I e II. *Papillomavirus Report* 2002; 13 (2):35-74.

Effros R. Handbook of the Biology of Aging. 5th ed.:2001.

Eichten A, Westfall M, Pietenpol J, Münger K. Stabilization and functional impairment of the tumor suppressor p53 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Virology*. 2002, 295: 74-85.

Franco EL, Duarte-Franco E, Ferenczy A. Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. *CMAJ*.2001;164:1017-1025.

Freitas F, Menke CH, Rivoire W, Passos EP. Rotina em Ginecologia. 3a edição. Porto Alegre: Artes Médicas; 1997.

Giarrè M, Caldeira S, Malanchi I, Ciccolini F, Leão M, Tommasino M. Induction of pRb degradation by the human papillomavirus type 16 E7 protein is essential to efficiently overcome p16INK4a – imposed G1 cell cycle arrest. *Journal of Virology* 2001 May;75 (10): 4705-4712.

Hewlett M. The Molecular biology of Cancer. Webct Course. Module 19. [capturado em 2003 Dez] Disponível em: www.blc.arizona.edu/marty/411/Modules/mod19.html

Holland J, Bast Jr R, Morton D, Frei III E, Kufe D, and Weichselbaum R. Cancer Medicine. 4th edition. Williams & Wilkins, Baltimore, 1997.

INCA (Instituto Nacional do Câncer)– Ministério da Saúde. [Capturado em 2004]. Disponível em URL: <http://www.inca.gov/>

INCA (Instituto Nacional do Câncer). Câncer no Brasil- dados dos registros de base populacional. Rio de Janeiro: Pro- onco;1995.

Jacobs JJ, Kieboom K, Marino S, DePinho RA. The oncogene and

polycomb-group gene bmi-1 regulates cell proliferation and senescence through the ink4a locus. *Nature* 1999; 397:164-168.

Junior ARD, Oyakawa N, Okada MMK, Nobumoto CT, Ramos LO, Pinotti JÁ. Incidência de HPV genital em pacientes menores de 20 anos. *Revista de Ginecologia e Obstetrícia* 1998 março; 9 (1): 22-24.

Keating JT, Riethdorf L , Riethdorf S, Cviko A ,Crum C. Ki-67, cyclin E and p16INK4a are complimentary surrogate biomarkers for human papilloma virus-related cervical neoplasia. *The American Journal of Surgical Pathology* 2001;25(7): 884-891.

Kirwan MJM, Herrington S. Human papillomavirus and cervical cancer: where are we now? *Br J Cancer* 2001;108:1204-1213.

Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U. Overexpression of p16INK4a as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int Journal Cancer* 2001;92: 276-284.

Koss LG, Gompel C. *Citopatologia Ginecológica e suas bases anatomoclínicas*. 1a. edição brasileira. São Paulo: Manole; 1997.

Lagunas IA. Câncer cérvico uterino. Centro Universitário de Ciências de la Salud [página da universidade] 2001 março [capturado 2001 abril 25] [10 telas] Disponível em: <http://www.imformador.com.mx/lastest/ene97/21ene97/univz.htm> .

Lambert E. College Students' Knowledge of Human Papillomavirus and Effectiveness of a Brief Educational Intervention *J Am Board Fam*

Pract.. 2001;14(3):178-183. Disponível em:
<http://www.medscape.com/ABFP/JABFP/2001/v14.n03/fp1403.03.lamb/fp1403.03.lamb-01.html>

Langosch KM, Riethdorf S, Pöppighaus AK, Riethdorf L, Löning T. Expression of cyclin-dependent kinase inhibitors p16MTS1, p21WAF1 and p27KIP1 in HPV –positive and HPV- negative cervical adenocarcinomas. *Virchows Arch* 2001; 439: 55-61.

Masumoto N, Fujii T, Ishikawa M, Saito M, Nozawa S. p16INK4a overexpression and Human Papillomavirus infection in small cell carcinoma of the uterine cervix. *Human Pathology* 2003 Aug; 34(8): 778-783.

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

Murakami M, Gurski KJ, Steller MA. Human Papillomavirus Vaccines for Cervical Cancer. *J Immunother* 1999 May;22(3):212-8.

Murphy N, Ring M, Killalea AG, Uhlmann V, O'Donovan M, Mulcahy F. p16INK4a as a marker for cervical dyskaryosis: CIN and cGIN in cervical biopsies and ThinPrep™ smear. *J Clin Pathol* 2003; 56:56-63.

Naomi Jay NP; Moscicki AB. Human Papillomavirus Infections in Women With HIV Disease: Prevalence, Risk, and Management .*The AIDS Reader*. 2000; 10(11):659-668.

National cancer institute workshop. Bethesda 2001 workshop. [capturado em 2001 dez 07]. Disponível em www.bethesda2001.cancer.gov .

- Negri G, Vigl EE, Kasal A, Romano F, Haitel A, Mian C. p16INK4a is a useful marker for the diagnosis of adenocarcinoma of the cervix uteri and its precursors. *Am J Surg Pathol* 2003; 27(2): 187-193.
- Parkinson EK, Munro J, Steeghs K, Morrison V, Bryce S. Replicative senescence as a barrier to human cancer. *Biochem Soc Trans.* 2000 feb; 28(2): 226-233.
- Pellicci P. Do tumor-suppressive mechanisms contribute to organism aging by inducing stem cell senescence?. *J Clin Invest* 2004 Jan; 113 (1):4-7.
- Piccinin S, Doglioni C, Maestro R, Vukosavljevic T, Gasparotto D, D'Orazi C, Boiocchi M. p16/CDKN2 and CDK4 gene mutations in sporadic melanoma development and progression. *Int J Cancer* 1997; 74: 26-30.
- Putte GV, Holm R, Lie K, Tropé C, Kristensen G. Expression of p27, p21, p16 proteins in early squamous cervical cancer and its relation to prognosis. *Gynecol. Oncol.* 2003; 89:140-147.
- Reichert A, Trunk-Gehmacher M, Petry KU, Ikenberg H, Lang H, Von Knemmel Doeberitz M. p16INK4a immunocytochemistry as a conjunctive test in cervical cytology. 21st International Papillomavirus conference 2004; 137: 138.
- Riethdorf L, Riethdorf S, Lee K, Cviko A, Loning T, Crum C. Human Papillomavirus, expression of p16INK4a, and early endocervical glandular neoplasia. *Human Pathology* 2002 Sep; 33(9): 899-904.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Appendix E: Commonly used techniques in molecular cloning. Purification of Nucleic Acids. In:

- Molecular Cloning: a laboratory manual. 3rd Ed. New York: Cold Spring Harbor, 1999, 3v., p. E. 3-4
- Sano T, Masuda N, Oyama T, Nakajima T. Overexpression of p16 and p14ARF is associated with human papillomavirus infection in cervical squamous cell carcinoma and dysplasia. *Patho Int* 2002; 52:375-383.
- Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, Fukuda T, Nakajima T. Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. *American Journal of Pathology* 1998 Dec; 153 (6):1741-1748.
- Schiffman MH, Castle P. Epidemiologic studies of a necessary causal risk factor: human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *J Nat Cancer Int* 2003 Mar; 95(6):E2 1-8.
- Serrano M. The tumor suppressor protein p16INK4a. *Exp Cell Res* 1997;237: 7-13.
- Sharpless N, DePinho RA. Telomeres, stem cells senescence, and cancer. *J. Clin. Invest.* 2004; 113(2):160-168.
- Skomedal H, Kristensen G, Lie A and Holm R. Aberrant expression of the cell cycle associated proteins TP53, MDM2, p21, cdk4, cyclin D1, RB and EGFR in cervical carcinoma. *Gynecologic Oncology* 1999, 73: 223-228.
- Tommasino M, Accardi R, Caldeira S, Dong W, Malanchi I, Zehbe I. The role of TP53 in cervical carcinogenesis. *Human Mutation* 2003; 21: 307-312.

Trunk-Gehmacher M, Hellweg GD, Ridder R, Petry KU, Ikenberg H, Von Knemmel Doeberitz M. Morphological characteristics of p16INK4a positive cells in cervical cytology samples. 21st International Papillomavirus conference 2004; 135: 137.

Tsuda H, Hashiguchi Y, Nishimura S, Kawamura N, Inoue T Yamamoto K. Relationship between HPV typing and abnormality of G1 cell cycle regulators in cervical neoplasm. *Gyn Oncol* 2003; 91: 476-485.

Veronesi R, Focaccia R. Veronesi: Tratado de Infectologia. São Paulo: Ateneu; 1997.

Villa LL. Papilomavírus Humano e Câncer do Colo do Útero. Centro de tratamento e pesquisa do Hospital do Câncer - Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer. [capturado em 2003 Jul 11]; Disponível em: <http://www.hcanc.org.br/outrasinfs/ensaios/hpv1.html> .

Waggoner SE. Cervical Cancer. *The Lancet* 2003 Jun;361:2217-2225.

Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM Bosch FX, Kummer JÁ, Sh KV. Human Papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide 1999 Sep;189 (1): 12-19.

WHO (World Health Organization)- Initiative for Vaccine Research (IVR)- Human papilloma virus.[Capturado em 2003 Apr 30]; Disponível em : http://www.who.int/vaccine_research/documents/new_vaccines/en/index8.html

Who (World Health Organization). Food, nutrition and the prevention of cancer : a global perspective. Washington, DC : World Cancer Research

1995: 670 p.

Zhao P, Hu YC, Talbot I. Expresssing patterns of p16 and CDK4 correlated to prognosis in colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003 Oct; 9 (10): 2202-2206.

ANEXOS

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)