

**FACULDADE DE MEDICINA
DOUTORADO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
FERNANDO ANSCHAU**

**DO CARCINOMA CERVICAL *IN SITU* AO INVASOR:
O PAPEL DA EXPRESSÃO DA P16^{INK4a}
NA PROGRESSÃO E NA RECORRÊNCIA**

Porto Alegre

2008

FERNANDO ANSCHAU

**DO CARCINOMA CERVICAL *IN SITU* AO INVASOR:
O PAPEL DA EXPRESSÃO DA P16^{INK4a}
NA PROGRESSÃO E NA RECORRÊNCIA**

Porto Alegre

2008

FERNANDO ANSCHAU

**DO CARCINOMA CERVICAL *IN SITU* AO INVASOR:
O PAPEL DA EXPRESSÃO DA P16^{INK4a}
NA PROGRESSÃO E NA RECORRÊNCIA.**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul para obtenção do título de Doutor em Medicina e Ciências da Saúde.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Denise Cantarelli Machado
Co-orientadores: Prof^a. Dr^a. Virgínia Minghelli Schmitt
Prof. Dr. Manoel Afonso Guimarães Gonçalves

Porto Alegre

2008

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

A617c Anschau, Fernando

Do carcinoma cervical *in situ* ao invasor: o papel da expressão da p16^{INKa} na progressão e na recorrência / Fernando Anschau. Porto Alegre: PUCRS, 2008.

xiii, 79f.: gráf. il. tab.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Denise Cantarelli Machado.

Co-orientadores: Prof. Dr. Manoel Afonso Guimarães Gonçalves
Prof^a. Dr^a. Virginia Minghelli Schmitt.

Tese(Doutorado) - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Doutorado em Medicina e Ciências da Saúde. Área de concentração: Biologia Molecular.

1. NEOPLASIAS DO COLO DO ÚTERO. 2. CARCINOMA IN SITU. 3. INVASIVIDADE NEOPLÁSICA. 4. PROGRESSÃO DA DOENÇA. 5. RECIDIVA. 6. FATORES DE RISCO. 7. GENES p16. 8. GENES SUPRESSORES DE TUMOR. 9. IMUNOISTOQUÍMICA. 10. HUMANOS. 11. ESTUDOS DE COORTES. I. Machado, Denise Cantarelli. II. Gonçalves Manoel Afonso Guimarães. III. Schmitt, Virginia Minghelli. IV. Título.

C.D.D. 616.99466

C.D.U. 618.146-006.6:575.117 (043.3)

N.L.M. QU 325

Rosária Maria Lúcia Prenna Geremia
Bibliotecária CRB 10/196

Aos meus pais e ao meu irmão

pelo incentivo, pelo apoio
e, acima de tudo, pelo exemplo.

À minha esposa, Cassandra,

pelo carinho, compreensão e ajuda
na busca de meus sonhos.

Ao meu filho, Arthur

obrigado pela própria existência,
símbolo de amor e carinho

AGRADECIMENTOS

À **Profa. Dra. Denise Cantarelli Machado**, pela colaboração, pela orientação e pelo incentivo, de modo especial, nos momentos decisivos da realização deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Manoel Afonso Guimarães Gonçalves**, pelo exemplo, pela competência, pela amizade e pelo apoio na orientação deste trabalho.

À **Prof. Dra. Virgínia Minghelli Schmitt**, pela dedicação, pela amizade e pela disposição, marcantes na condução deste trabalho.

À **Me. Ana Paula Lambert**, pela dedicação e auxílio na execução do projeto.

Ao **amigo Prof. Dr. Ivo Behle**, pela compreensão, pelo exemplo de conduta e pelo carinho, sempre importantes em todos os passos da construção deste caminho.

Aos **amigos e colegas** do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, do Serviço de Patologia do Hospital São Lucas, do Instituto de Pesquisas Biomédicas do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, do Hospital Padre Jeremias e do Hospital de Alvorada, pelo apoio e pela compreensão sempre demonstrados.

Aos **médicos residentes** dos Serviços de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, pela amizade e afetividade.

Aos **colegas professores e aos alunos** da Faculdade Nossa Senhora de Fátima de Caxias do Sul, pelo incentivo e apoio.

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

Ao **Dr. Paulo Baptista Soares**, amigo inigualável, modelo de carácter e incentivo às minhas conquistas.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	vi
SUMÁRIO.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 CÂNCER DE COLO UTERINO	3
2.2 PAPILOMAVÍRUS HUMANO	7
2.3 ONCOPROTEÍNAS VIRAIS.....	8
2.4 O CICLO CELULAR	9
2.5 OS GENES DE SUPRESSÃO TUMORAL.....	10
2.6 P16 ^{INK4a}	11
2.7 O PONTO CRÍTICO	12
3 OBJETIVOS	14
3.1 OBJETIVO GERAL	14
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
4 PACIENTES E MÉTODOS	15
4.1 DELINEAMENTO E AMOSTRA.....	15
4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	16
4.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	17
4.4 PESQUISA DO DNA DE HPV.....	17

4.5 DETERMINAÇÃO DO POLIMORFISMO ARG/PRO DO CÓDON 72 DA P53	18
4.6 PESQUISA IMUNOHISTOQUÍMICA DE P16 ^{INK4a}	18
4.7 VARIÁVEIS DO ESTUDO	19
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	19
4.9 ÉTICA.....	20
5 RESULTADOS.....	21
6 DISCUSSÃO	31
7 CONCLUSÕES.....	37
8 REFERÊNCIAS	38
9 ANEXOS	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Arg	Arginina
CDK	Cinase dependente de ciclina (do inglês <i>cyclin dependent kinase</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucléico
E2F	Fator de Transcrição E2F
G1	Gap1, fase do ciclo celular entre as fases M (mitose) e S (síntese)
HE	Hematoxilina-eosina
HPV	Papilomavírus Humano
HSL	Hospital São Lucas
IC	Intervalo de confiança
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IPB	Instituto de Pesquisas Biomédicas
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
OR	Razão de chance (do inglês <i>Odds Ratio</i>)
P16	Proteína celular de peso molecular 16 kDa
P53	Proteína celular de peso molecular 53 kDa
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PRB	Proteína celular do Retinoblastoma
Pro	Prolina
PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
S	Fase de síntese do ciclo celular
SLD	Sobrevida livre de doença
TP53	Gene que codifica a proteína p53
VPN	Valor preditivo negativo
VPP	Valor preditivo positivo
X^2	Teste estatístico qui-quadrado

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – História natural das lesões precursoras do câncer cervical.....	5
Figura 2 – Carcinoma cervical in situ (HE 50X).....	6
Figura 3 – Carcinoma cervical invasor (HE 50X).....	6
Figura 4 – Distribuição de pacientes por estádios do câncer de colo uterino.....	21
Figura 5 – Sobrevida livre de doença entre os grupos com lesão <i>in situ</i> e invasora (método de Kaplan-Meier) n=90.....	25
Figura 6 – Sobrevida livre de doença das pacientes com super expressão de p16^{INK4a} presente e ausente (método de Kaplan-Meier) n=57.	26
Figura 7 – Sobrevida livre de doença de acordo com o estadiamento do câncer cervical (método de Kaplan-Meier) n=90.....	27
Figura 8 – Grupos com carcinoma cervical (lesão <i>in situ</i> e lesão invasora) X sobrevida livre de doença.....	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tipos de HPV mais freqüentes e seu tropismo tecidual.....	8
Tabela 2 – Estadiamento do câncer de colo uterino (FIGO)⁵¹	16
Tabela 3 – Variáveis de risco x Grupo (n=90)	22
Tabela 3a – Variáveis de risco x Grupo (n=57).....	23
Tabela 4 – Grupo x Expressão da p16^{INK4a}	23
Tabela 5 – Grupo x Super expressão da p16^{INK4a}	24
Tabela 6 – Super expressão da p16^{INK4a} X Estadiamento.....	24
Tabela 7 – Sobrevida livre de doença.....	27
Tabela 8 – Sobrevida livre de doença – influência do estadiamento e da expressão da p16^{INK4a}	28
Tabela 9 – Super expressão da p16^{INK4a} como preditor da sobrevida livre de doença	30

RESUMO

A fim de investigar a expressão da p16^{INK4a} no carcinoma cervical e sua relação com a transformação de carcinoma *in situ* em invasor, além de seu papel na recorrência das lesões cervicais, uma série de 90 pacientes com carcinoma cervical (49 com lesão *in situ* e 41 com lesão invasora) foi selecionada, entre julho de 2001 e setembro de 2002. Os grupos com lesão *in situ* e invasora foram pareados para uma série de variáveis de risco do câncer cervical e as pacientes mantidas em acompanhamento por 60 meses. As visitas de acompanhamento ocorreram a cada 6 meses nos primeiros três anos e anualmente até o quinto ano. 87,9% das pacientes com lesão invasora apresentavam super expressão da p16^{INK4a}, em comparação com 37,6% daquelas com lesão *in situ* (X^2 :13,68; 2GL; p=0,0002; OR:12,08), demonstrando ser a super expressão da p16^{INK4a} um risco de invasão da membrana basal por células displásicas. Também observamos associação entre super expressão da p16^{INK4a} e estadiamento do câncer (X^2 :18,38; 6GL; p=0,0003). A análise prospectiva, quando controlada a interação com os grupos de lesão cervical (cálculo de regressão de Cox), demonstra risco de 4,83 atribuído à super expressão da p16^{INK4a} para recorrência, mas sem significância estatística (p=0,14).

Palavras chave: expressão da p16^{INK4a}, carcinoma cervical, recorrência, fator de risco, imunohistoquímica.

ABSTRACT

To investigate the expression of p16^{INK4a} in cervical carcinoma and its relation to the transition of carcinoma *in situ* to invasive carcinoma, and its role in recurrence of cervical lesions as well, a series of 90 patients with cervical carcinoma (49 with *in situ* lesion and 41 with invasive lesion) were selected between July 2001 and September 2002. Groups with *in situ* and invasive lesions were paired for a series of risk variables for cervical cancer and followed up for 60 months. The follow-up visits occurred every 6 months in the first three years and annually up to the fifth year. It was seen that 87.9% of the patients with invasive lesion had overexpression of p16^{INK4a}, in comparison with 37.6% of those with *in situ* lesion (X^2 : 13.68; 2 df; p=0.0002; OR: 12.08), demonstrating the overexpression of p16^{INK4a} as a risk of invasion of the basal layer by dysplastic cells. We also observed an association between overexpression of p16^{INK4a} and staging of cancer (X^2 : 18.38; 6 df; p=0.0003). A prospective analysis, when controlled for interaction with cervical lesion groups (by Cox regression), demonstrated a risk of recurrence of 4.83 times attributed to overexpression of p16^{INK4a}, albeit not statistically significant (p=0.14).

Key words: expression of p16^{INK4a}, cervical carcinoma, recurrence, risk factor, immunohistochemistry.

1 INTRODUÇÃO

Dentro dos conhecimentos sobre oncologia e de métodos de rastreamento e prevenção do câncer, a neoplasia maligna do colo uterino é o modelo no qual existe maior poder de detecção e tratamento precoce. Os conhecimentos acumulados com o passar dos anos nos trouxeram a história natural deste câncer, ao ponto de sabermos até mesmo situações que antecedem o seu aparecimento.

Já está bem estabelecido que o câncer de colo uterino possui estágios precursores nos quais ainda não temos invasão do estroma. Nestes estágios podemos observar alterações celulares no colo uterino que comprometem o epitélio da região e se traduzem na neoplasia intraepitelial cervical (NIC), dividida em graus I, II e III (carcinoma *in situ*). Como regra, décadas são necessárias desde a infecção, por via sexual, das células basais do epitélio cervical, pelo papilomavírus humano (HPV), agente etiológico do câncer cervical, até o desenvolvimento da neoplasia invasora.

Alguns tipos específicos de HPV, como o HPV 16 e o 18, tem sido fortemente identificados em uma série de carcinomas e lesões pré-malignas cervicais. Os HPVs infectam as células epiteliais cervicais e as suas oncoproteínas E6 e E7 se ligam e inativam as proteínas hospedeiras reguladoras do ciclo celular, p53 e pRb, respectivamente.

A p16 é uma proteína que está envolvida no controle da proliferação celular por ser inibidora dos complexos ciclina-cinase dependente de ciclina. Os complexos ciclina/CDK4 ou 6 são responsáveis por fosforilar a pRB que leva à progressão do ciclo celular da fase 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 no processo de controle do ciclo celular e senescência.

Outro fato a ser considerado é que quanto maior a graduação da NIC maior seu poder de progressão e, assim, de transformação maligna. Apesar de compreendermos que a progressão ao câncer cervical a partir de uma lesão *in situ* deve ser tempo dependente, a busca por marcadores desta progressão é importante para o entendimento da dinâmica de todas as alterações pré-malignas. Tendo em vista a baixa faixa etária na qual as alterações cervicais pré-malignas são

mais prevalentes, o entendimento do risco de progressão de cada paciente poderá nos fornecer substrato para manejarmos de maneira mais conservadora estas alterações cervicais.

O ponto crítico no qual ocorre a transformação de carcinoma *in situ* a invasor ainda não está claramente estabelecido. Neste estudo nós investigamos a relação entre a expressão da p16^{INK4a} e o carcinoma cervical *in situ* e invasor, além de acompanharmos a evolução destas entidades nosológicas, relacionando-a com a expressão da p16^{INK4a}.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CÂNCER DE COLO UTERINO

Com aproximadamente 500.000 casos novos por ano no mundo, o câncer do colo uterino ou cervical é o segundo tipo de câncer mais comum entre as mulheres, sendo responsável pelo óbito de aproximadamente 230.000 mulheres/ano. Sua incidência é cerca de duas vezes maior em países menos desenvolvidos quando comparada com a dos mais desenvolvidos¹.

A América possui uma população de 336,5 milhões de mulheres com idade superior a 15 anos, com risco potencial de desenvolverem câncer de colo uterino. Estima-se que 86.532 casos de câncer cervical sejam diagnosticados a cada ano e 38.436 mulheres morram por esta doença no continente americano¹.

O câncer cervical é o quarto em frequência nas americanas em geral e o segundo mais frequente entre as mulheres com idade de 15 a 44 anos. Mais da metade destes casos de câncer e de morte atribuída ao câncer são relatados na América do Sul. No Brasil a estimativa para o ano de 2008 é de 18.680 novos casos de câncer de colo uterino, com um risco estimado de 19 casos a cada 100.000 mulheres^{2,3}.

O estado do Rio Grande do Sul apresenta uma taxa estimada de 28,17 casos de câncer de colo uterino para cada 100.000 mulheres no ano de 2008. Esta taxa está muito acima daquela esperada para o Brasil e é uma das mais elevadas do país. Um fato importante para chamarmos atenção neste ponto é a incidência crescente de casos de câncer de colo uterino em pacientes jovens. No Rio Grande do Sul, no ano de 2004, 22,7% dos casos de câncer cervical foram diagnosticados em pacientes com idade inferior a 39 anos. Em 2006 esta incidência aumentou para 51% e em 2007 para 59%, demonstrando uma mudança no comportamento biológico do câncer cervical³.

A história natural do câncer cervical faz desta neoplasia um bom modelo para programas de rastreamento. Como regra, décadas são necessárias desde a introdução do papilomavírus

humano (HPV), agente etiológico fundamental, nas células basais do epitélio cervical, por via sexual, até o desenvolvimento da neoplasia invasora. Apesar da alta prevalência das infecções por HPV no colo uterino, a maioria é transitória e assintomática. A infecção persistente por alguns tipos de HPV, chamados de oncogênicos, é um dos fatores mais importantes para a progressão ao câncer cervical⁴. O período de latência desta doença oportuniza a identificação de alterações citológicas e colposcópicas ou até mesmo o próprio HPV.

Desde 1925, com a invenção do colposcópio por Hinselmann, permitindo a observação do colo uterino com magnificação, foram acrescentadas observações que serviram de base para o conceito atual da origem do câncer cervical. O câncer começaria não em um foco estático de tecido, mas em uma lâmina de epitélio em constante processo de transformação⁵.

Também em 1925, Papanicolaou, envolvido com suas pesquisas com células cervicais esfoliadas, diagnosticou uma paciente com câncer de colo uterino assintomática. Apesar de apresentar seus relatórios em 1928, até 1941 a citologia de Papanicolaou permaneceu com pouca credibilidade como forma de rastreamento do câncer. Quando introduzida nos programas de rastreamento do câncer de colo uterino, a citologia proporcionou grande impacto na incidência desta entidade nosológica, com redução aproximada de 75%⁶. Apesar desta redução importante, o câncer cervical continua sendo uma causa de mortalidade e morbidade alta entre as mulheres⁷.

Já está bem estabelecido que o câncer de colo uterino possui estágios precursores nos quais ainda não temos invasão do estroma. Nestes estágios podemos observar alterações celulares que comprometem o epitélio da região e se traduzem na neoplasia intraepitelial cervical (NIC), dividida em graus I, II e III⁸. A história natural da NIC tem três possibilidades de desfecho: regressão, persistência e progressão. Cerca de 60% das neoplasias intraepiteliais de grau I (NIC I) regridem, 30% persistem, 10% progridem para carcinoma *in situ* (NIC III) e 1% progride para câncer. Os desfechos possíveis correspondentes para a NIC II são de 40%, 40%, 20% e 5%, respectivamente. A taxa de regressão para a paciente com carcinoma *in situ* é de 33% e de progressão para invasão acima de 12%^{9,10}. (Figuras 1, 2 e 3).

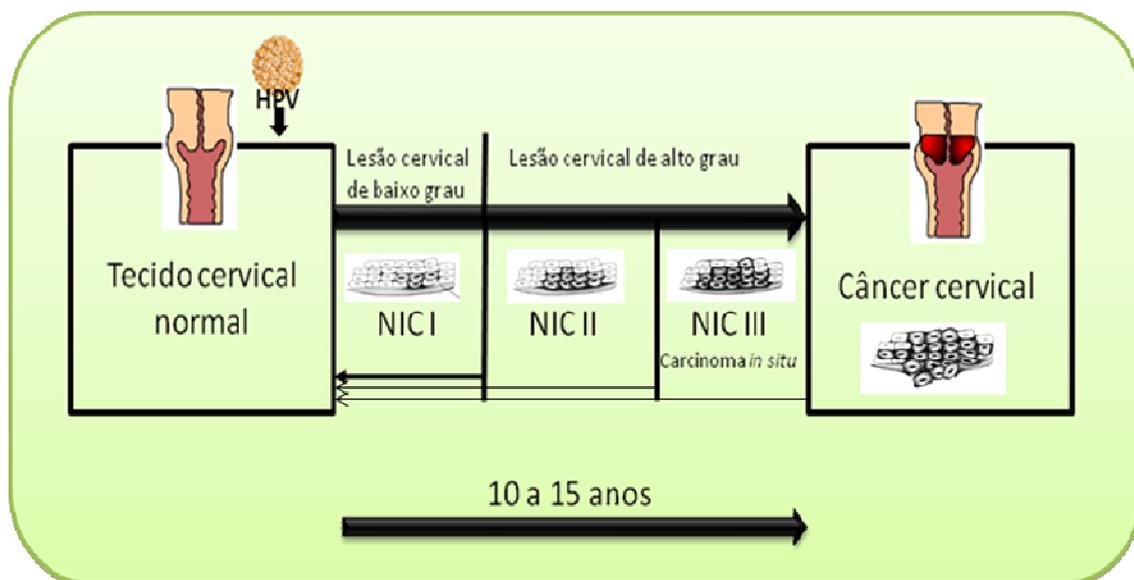


Figura 1 – História natural das lesões precursoras do câncer cervical
(Arquivo do autor)

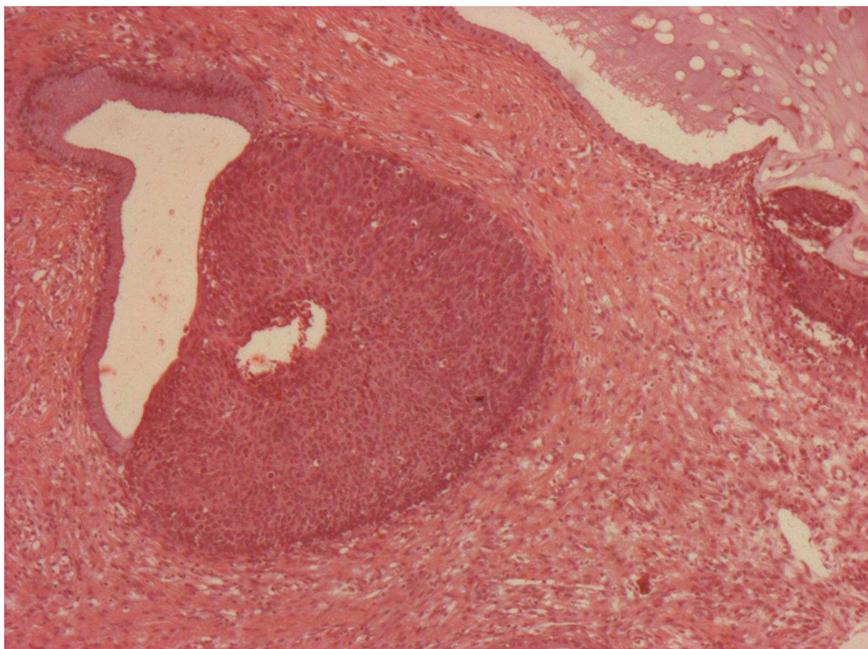


Figura 2 – Carcinoma cervical in situ (HE 50X)
Presença de atipia envolvendo toda a espessura do epitélio.
Membrana basal sem invasão. (Arquivo do autor).

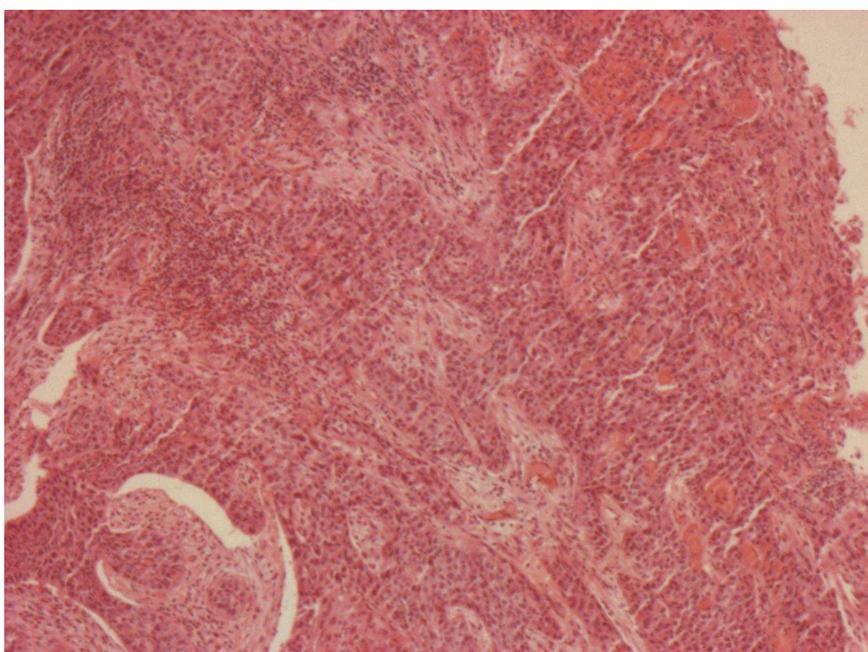


Figura 3 – Carcinoma cervical invasor (HE 50X)
Membrana basal com invasão.
Infiltração do estroma por células atípicas. (Arquivo do autor).

Apesar de compreendermos que a progressão ao câncer cervical a partir de uma lesão *in situ* deve ser tempo dependente, a busca por marcadores desta progressão é importante para o entendimento da dinâmica de todas as alterações pré-malignas. Tendo em vista a baixa faixa etária na qual as alterações cervicais pré-malignas são mais prevalentes, o entendimento do risco de progressão de cada paciente poderá nos fornecer substrato para manejarmos de maneira mais conservadora estas alterações cervicais.

Vários marcadores capazes de predizer o desfecho de lesões precursoras do câncer cervical foram estudados durante os últimos anos^{11,12}. Um dos mais promissores candidatos é a proteína supressora tumoral p16^{INK4a}, que mostrou estar super expressa em lesões pré-malignas e malignas cervicais^{13,14,15}. Isto provavelmente ocorra devido a uma infecção persistente por papilomavírus humano de alto risco, como o HPV 16 e o HPV 18, na cérvix uterina. HPVs de alto risco são fatores fundamentais na carcinogênese do colo uterino. De fato, DNA de HPV tem sido fortemente identificado em uma série de carcinomas e lesões pré-malignas cervicais¹⁶. Os HPVs de alto risco infectam as células epiteliais cervicais e as suas oncoproteínas E6 e E7 se ligam e inativam as proteínas hospedeiras reguladoras do ciclo celular, p53 e pRb, respectivamente¹⁷.

2.2 PAPILOMAVÍRUS HUMANO

A patologia associada ao papilomavírus humano é por definição uma doença infecciosa. Entretanto, ao longo das últimas décadas, ela adquiriu importância no campo da oncologia, uma vez que alguns tipos de papilomavírus humano têm se mostrado envolvidos no desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas.

O HPV é um membro da família *Papillomaviridae*. Existem mais de 100 tipos, agrupados em HPVs de alto e baixo risco, de acordo com a frequência em que aparecem associados a processos cancerígenos. Aqueles de alto risco também são conhecidos como tipos oncogênicos. Pelo menos 30 tipos exibem um tropismo pela mucosa anogenital. Os HPVs podem ser agrupados de acordo com seu tropismo em tipos cutâneos e mucosos (Tabela 1)¹⁷.

Tabela 1 – Tipos de HPV mais freqüentes e seu tropismo tecidual

Grupo	Protótipos	Local	Lesão
Cutâneos	HPV 1, HPV2	Pele	Verrugas / assintomático
Cutâneos - alto risco	HPV5, HPV 8	Pele	Verrugas / Carcinoma escamoso
Mucosos - baixo risco	HPV6, HPV 11	Mucosa anogenital	Verrugas / assintomático
Mucosos - alto risco	HPV 16, HPV 18, HPV 31, HPV 33, HPV 45	Mucosa anogenital	Lesões pré-malignas / Carcinoma escamoso / assintomático

(Adaptado de Sheurer e colaboradores, 2005)¹⁷.

Lesões que progridem para o carcinoma são comumente associadas aos papilomavírus de alto risco, mais freqüentemente os tipos 16 e 18 e, ocasionalmente os tipos 30, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56. Histologicamente eles são reconhecidos pela ruptura da arquitetura do epitélio estratificado e pela anaplasia nuclear¹⁸.

2.3 ONCOPROTEÍNAS VIRAIS

O genoma do HPV é constituído por uma molécula de DNA circular de fita dupla, de aproximadamente 8000 pares de base. O ciclo viral apresenta uma fase precoce (“early” = E) e uma fase tardia (“late” = L). Três proteínas sintetizadas pelo vírus durante a fase precoce do ciclo replicativo, E6, E7 e E5, desempenham um papel fundamental na patogenicidade do vírus. A proteína E6 atua como ativador do processo de degradação da proteína supressora tumoral p53, um importante regulador negativo do crescimento celular¹⁹. A proteína E7, por sua vez, liga-se e inativa a proteína do retinoblastoma (pRb), que também é um supressor tumoral que apresenta função reguladora do ciclo celular²⁰. A proteína E5 interfere na reciclagem dos receptores do fator de crescimento epitelial promovendo a proliferação celular²¹. Durante o processo de infecção e multiplicação do vírus, a síntese de E5, E6 e E7 é controlada através da ativação ou repressão de uma região reguladora presente no genoma viral em que participa a proteína E2. No caso de tumores positivos para papilomavírus humano de tipo oncogênico, observa-se o genoma viral integrado ao DNA cromossômico celular. O local de integração no genoma celular é aleatório, mas o local de quebra no genoma viral é sempre interno à região que codifica a proteína reguladora E2. Como consequência, a síntese das proteínas E5, E6 e E7 acontece de forma

descontrolada nas células que contém a forma proviral do HPV. O efeito final será uma inativação significativa dos supressores tumorais p53 e pRb, falta de regulação adequada do ciclo celular e conseqüente multiplicação celular descontrolada^{21,22}.

2.4 O CICLO CELULAR

O ciclo celular é tradicionalmente dividido em 4 fases distintas: G1, S, G2 e M, das quais a mais visível é a mitose, ou **fase M**. A fase de mitose do ciclo celular compreende uma série de etapas contínuas: prófase, pró-metáfase, metáfase, anáfase, telófase e citocinese. Nestas etapas, ocorre a separação dos cromossomos duplicados na **fase S** e a divisão de uma célula em duas^{23,24}.

O período que vai de uma fase M à outra é chamado de **interfase**. A **interfase** compreende fases importantes e distintas: G1, S e G2. Na **fase S** do ciclo celular (S = síntese) acontece a duplicação do material genético da célula. O intervalo entre o término da mitose e o começo da síntese de DNA é chamado de **fase G1** (G = gap ou lacuna) e o intervalo entre o final da síntese de DNA e o início da mitose é chamado de **fase G2**. G1 é a fase em que a célula permanece até receber um estímulo para a duplicação e corresponde à fase mais longa do ciclo. G2 propicia um tempo adicional para o crescimento celular, permite que a célula aumente a quantidade de citoplasma e o volume da membrana celular antes de se dividir^{23,20}.

Em um ciclo celular padrão existe um sistema-controle constituído por uma série de proteínas que interagem entre si e que regulam o ciclo celular através de paradas temporárias do ciclo em pontos de controle estratégicos específicos (pontos de checagem). Existem pontos de checagem no final de G1, no final de G2 / início de M e no final de M que controlam se existem condições favoráveis para a divisão celular, como por exemplo: replicação completa do DNA, ausência de danos ou anormalidades no DNA, perfeita associação dos cromossomas aos fusos mitóticos, tamanho e volume ideais da célula²⁰.

As interrupções são importantes também para permitir que o sistema-controle do ciclo celular seja regulado por sinais provenientes do meio ambiente. Estes controles ambientais geralmente agem sobre o sistema-controle em um ou outro dos dois importantes pontos de checagem do seu ciclo: em G1, exatamente antes de entrar na fase S, e em G2, no início da mitose^{23,20}.

Este sistema de controle está baseado em duas famílias de proteínas que são chave para o seu funcionamento: a família das proteinoquinases dependentes de ciclinas (CDK) e a família das ciclinas, que se ligam às moléculas de CDK²⁰. O comando deste sistema de controle parte de alguns genes chamados de genes de supressão tumoral

2.5 OS GENES DE SUPRESSÃO TUMORAL

O câncer normalmente se desenvolve como consequência de um acúmulo de alterações genéticas que incluem ativação dos oncogenes e inativação dos genes supressores de tumores. As mutações dos genes supressores tumorais RB e *TP53* foram associadas a doenças malignas hereditárias (retinoblastoma e síndrome de Li-Fraumeni, respectivamente) e haviam sido encontradas em diferentes percentagens em tumores malignos esporádicos como osteossarcoma, câncer de mama e câncer de bexiga²⁵.

O principal supressor tumoral é o gene *TP53*, localizado no cromossoma 17, cuja proteína codificada, p53 responde pelo controle da proliferação celular e da apoptose (morte celular programada). A proteína p53 se liga ao DNA e exerce seu efeito, em parte, por indução da transcrição de outros genes reguladores. Um destes genes codifica uma proteína de 21 quilodaltons (p21), que se liga e inibe o complexo ciclina G1 / proteína CDK2 que fosforilaria pRb, liberando o fator de transcrição E2F ao qual se associa, promovendo assim a passagem de G1 para S. Pelo bloqueio da atividade de cinase destes complexos, a proteína p21 impede a célula de progredir para a fase S e replicar seu DNA¹⁷.

A proteína de supressão tumoral p53 possui três funções principais: controle do ciclo celular, ativação do reparo do DNA e regulação da apoptose. A p53 atua como “guardião do genoma” e diante de um dano extenso ou irreparável no DNA, ativa o controle do ciclo celular, induzindo o reparo ou apoptose, e previne a proliferação de células com mutações genéticas. O efeito da inativação funcional da p53 pela proteína E6 dos HPVs de alto risco sobre a célula parece ser equivalente a qualquer mutação do gene *TP53* que afete a função normal da p53²⁶.

O gene *TP53* apresenta um polimorfismo no códon 72 que resulta em uma arginina (Arg) ou uma prolina (Pro) nesta posição. Apesar de as duas variantes alélicas serem equivalentes de uma perspectiva funcional, não interferindo na atividade da proteína, foi sugerido que pacientes homocigoto para Arg (Arg/Arg p53) teriam um risco maior de desenvolver câncer cervical

associado ao HPV^{27,28,29,30}. Contudo, vários estudos não encontraram evidências de uma correlação entre o polimorfismo no códon 72 do gene *TP53* e risco para câncer cervical HPV positivo^{31,32,33}.

Alguns indivíduos que apresentam retinoblastoma (tumor que se origina a partir de células precursoras neurais na retina imatura) possuem cariótipo visivelmente anormal, com uma deleção de uma banda específica no cromossoma 13, determinando que este câncer seja causado por perda de um gene supressor de tumor mais do que por aquisição de um oncogene. O gene cuja perda é crítica para o desenvolvimento deste câncer é chamado gene RB¹⁷.

O gene RB é normalmente expresso em todas as células do corpo e seu produto atua como um dos principais freios da progressão do ciclo da divisão celular. A ação da frenagem é normalmente regulada por fosforilação. A proteína RB se alterna entre um estado fosforilado e não-fosforilado nas diferentes fases do ciclo celular e, em células que foram removidas do ciclo se mantém não-fosforilado. À medida que permanece não-fosforilada, RB se liga fortemente a E2F, um fator de transcrição de genes que codificam proteínas que regulam a passagem da fase G1 para S, impedindo a progressão do ciclo celular e conseqüente proliferação celular. A perda do gene mantém a célula livre deste impedimento¹⁷.

A inativação da pRb tem um impacto na regulação 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, mesmo em condições onde esta passagem deveria ser bloqueada³⁴. A p16^{INK4a} inibe as quinases dependentes de ciclina que promovem a fosforilação e conseqüente inativação da pRb. Uma relação inversa foi relatada entre a presença de pRb fosforilada e a super expressão de p16^{INK4a}³⁵.

2.6 P16^{INK4a}

O gene p16, localizado no cromossomo 9p21, codifica uma proteína que inibe as quinases dependentes de ciclina, como CDK4 e CDK6, as quais promovem a fosforilação e conseqüente 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/S³⁶.

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. Mutações somáticas nos dois alelos da p16^{INK4a} estão presentes de forma significativa em diferentes tipos de câncer, como câncer colorretal, câncer gástrico e gliomas^{36,37,38}.

Alguns estudos revelaram que a inativação da pRb é freqüentemente acompanhada da super expressão de p16^{INK4a} em vários cânceres^{39,40,41}. 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-neoplásicas como cancerosas. Embora alguns trabalhos sugiram que em lesões cervicais a expressão do gene p16^{INK4a} pode estar regulado negativamente por hipermetilação ou mutações, esta hipótese não foi confirmada por outros estudos^{42,43}. No câncer de colo uterino não foram encontradas mutações ou deleção homozigótica da p16^{INK4a} ou foi detectada somente em 5% dos carcinomas⁴⁴.

A super expressão da p16^{INK4a} em lesões displásicas cervicais e em câncer cervical tem sido o objetivo de alguns estudos. Estes estudos têm confirmado a alta expressão na maioria das lesões cervicais avançadas, mas não no epitélio cervical normal, indicando que a expressão da p16^{INK4a} em lesões cervicais e em câncer pode ser usada para observar células transformadas pelo HPV^{14,15,42,43,44,45,46}.

O acúmulo 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 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^{47,48}.

2.7 O PONTO CRÍTICO

No carcinoma uterino, fatores prognósticos como estadiamento clínico, metástases linfonodais e o envolvimento parametrial já são bem conhecidos^{49,50}. Também são conhecidos

fatores de risco para o desenvolvimento das lesões pré-neoplásicas e do próprio câncer cervical. Entre os fatores de risco podemos citar: a idade da paciente, o grau de escolaridade, o nível sócio-econômico, a menarca, a idade precoce da primeira relação sexual, a paridade, o número de parceiros sexuais, a infecção pelo HPV, a presença de doenças sexualmente transmissíveis, o uso de anticoncepcionais orais e o tabagismo^{7,12}. Contudo, o ponto crítico no qual ocorre a transformação de carcinoma *in situ* a invasor ainda não está claramente estabelecido. Neste estudo nós investigamos a relação entre a expressão da p16^{INK4a} e o carcinoma cervical *in situ* e invasor, além de acompanharmos a evolução destas entidades nosológicas, relacionando-a com a expressão da p16^{INK4a}.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a expressão da proteína p16^{INK4a} em espécimes de neoplasia cervical *in situ* e invasora.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Relacionar a super expressão da p16^{INK4a} com a neoplasia cervical *in situ* e invasora, com o estadiamento do câncer cervical e com a sobrevida livre de doença.

Demonstrar o risco atribuível à super expressão da p16^{INK4a} na determinação da invasão da membrana basal do epitélio cervical por células neoplásicas.

4 PACIENTES E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO E AMOSTRA

Para realização do presente trabalho, foi efetuado estudo retrospectivo de coorte histórico, no qual foi selecionada uma série de 90 pacientes, tratadas no Ambulatório de Oncologia Pélvica do Serviço de Ginecologia do Hospital São Lucas da PUCRS, que buscaram assistência para realização de exame colposcópico e realizaram biópsia de colo uterino identificando carcinoma, no período correspondente a julho de 2001 e setembro de 2002.

Todas as pacientes, após apresentação e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, realizaram anamnese, exame ginecológico, colposcopia, coleta de material ecto e endocervical para citologia, pesquisa de DNA de HPV e do polimorfismo no códon 72 da p53 através da reação em cadeia da polimerase, além de biópsia de colo uterino para diagnóstico histológico e determinação da expressão da proteína p16^{INK4a}.

As visitas de acompanhamento foram realizadas a cada 6 meses nos primeiros três anos e anualmente até o quinto ano. As pacientes foram acompanhadas por 60 meses (média de 54,9 meses). Nas visitas foram realizados exame ginecológico, citopatológico cervical, colposcopia e biópsia cervical na evidência de lesão recorrente ou progressão da doença.

Todas as pacientes receberam o tratamento padrão recomendado por estágio da Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO)⁵¹: 67 (74,5%) apenas cirurgia, 4 (4,5%) cirurgia e radioterapia, 12 (13,3%) radioterapia e quimioterapia, 7 (7,7%) cirurgia com radioterapia e quimioterapia. Nenhuma das pacientes que foi submetida apenas a tratamento cirúrgico apresentou margens cirúrgicas comprometidas. O estadiamento clínico do carcinoma cervical foi determinado pela classificação da FIGO (Tabela 2). Assim, 49 (54%) pacientes encontravam-se no estágio 0 (carcinoma *in situ*), 19 (21%) em estágio I (1 IA e 18 IB), 11 (12%) em estágio II (4 IIA e 7 IIB) e 11 (12%) em estágio III (2 IIIA e 9 IIIB) (Figura 4).

Tabela 2 – Estadiamento do câncer de colo uterino (FIGO)⁵¹

Estádio	Características
0	Carcinoma <i>in situ</i>
I	Carcinoma limitado ao colo uterino
IA	carcinoma pré-clínico (diagnóstico somente pela microscopia)
IA1:	invasão estromal mínima: 3x7mm.
IA2:	invasão de até 5x7mm de largura.
IB	dimensões superiores a IA2.
IB1:	tumores com diâmetro < 4cm.
IB2:	tumores com diâmetro ≥ 4cm.
II	Tumor além do colo, mas que não atinge a parede pélvica. Comprometimento da vagina até no máximo o terço médio.
IIA:	sem comprometimento evidente de paramétrio (apenas vagina).
IIB:	com comprometimento evidente de paramétrio.
III	Tumor no terço inferior da vagina ou até a parede pélvica. Todos os casos com uretero-hidronefrose ou exclusão renal.
IIIA:	não há extensão à parede pélvica (só da vagina).
IIIB:	extensão à parede pélvica e/ou uretero-hidronefrose ou exclusão renal.
IV	Tumor além da pelve verdadeira ou na mucosa da bexiga ou do reto .
IVA:	envolvimento órgãos adjacentes, como reto e bexiga.
IVB:	envolvimento de órgãos distantes.

De acordo com o diagnóstico histológico, as pacientes foram divididas em dois grupos: aquelas com lesão *in situ* e aquelas com lesão invasora cervical. Foram excluídas as pacientes que apresentavam tratamento prévio para neoplasia intraepitelial ou câncer cervical e aquelas que sofreram tratamento radioterápico prévio sobre a região pélvica. A idade média das pacientes foi de 41 anos (variando entre 21 e 75 anos), aquelas com carcinoma *in situ* apresentaram idade média de 39 anos enquanto que as com invasão cervical por células malignas apresentaram idade média de 43,3 anos. 11 pacientes do grupo com lesão invasora morreram no período de acompanhamento em decorrência de sua doença. Não houve nenhuma morte entre as pacientes do grupo com lesão *in situ*.

4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídas as pacientes com diagnóstico histológico de neoplasia cervical *in situ* ou invasora do Ambulatório de Oncologia Pélvica do Serviço de Ginecologia do HSL PUCRS, no período referido anteriormente.

4.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídas do estudo todas as pacientes que apresentaram uma ou mais das condições abaixo:

- pacientes submetidas à radioterapia ou quimioterapia previamente à biópsia de colo uterino.
- pacientes cujo exame histológico cervical não foi realizado no HSL PUCRS.

4.4 PESQUISA DO DNA DE HPV

A retirada de células endo e ectocervicais para a pesquisa de DNA de papilomavírus humano pela reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada com cytobrush. Tal material era deixado em suspensão em 10 ml de tampão T.E. (10mM TrisHCl pH 8,5; 1mM EDTA), estocadas à temperatura de -20°C até a extração do DNA.

As amostras para a pesquisa de DNA de papilomavírus humano, após descongelamento, foram centrifugadas a 5200 rpm, sob refrigeração, e o sedimento ressuspendido em 500µl de TE. Destes, 100µl foram tratados com 100µl de Proteinase K/TE-50 (200 µg/ml de proteinase K 'DNase/RNase free' Gibco, 2% Tween 20, 1mM EDTA, 50 mM TrisHCl pH 8,5) e incubados durante 12 horas a 37°C. Após inativação a 94 °C por 10 minutos, as amostras foram desproteinizadas e conservadas a -20°C até o momento da análise.

O DNA total extraído das amostras foi submetido a uma amplificação por PCR, utilizando-se como primers consenso os seguintes oligonucleotídeos My09 (5' .. CGT CC^A/_C AA^A/_G GGA ^A/_TAC TGA TC .. 3') e My11 (5' .. GC^A/_C CAG GG^A/_T CAT AA^C/_T AAT GG .. 3') complementares à região L1 do genoma viral. As condições para amplificação das amostras foram: 95°C por 5 minutos; 40 ciclos de 95°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C por 1

minuto; 72°C por 10 minutos. Todas as amostras resultantes positivas na triagem acima foram tipadas para HPV 16, 18, 31 e 33, utilizando-se primers específicos para cada tipo, complementares à região E6 do genoma viral. As condições de amplificação (com pequenas alterações) e os primers utilizados foram baseados na metodologia descrita por Cuzick e colaboradores⁵².

Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2%, em tampão TAE, contendo 1 ug/ml de brometo de etídio e analisados sob luz ultravioleta.

As pacientes que possuíam algum dos tipos de HPV acima descritos (HPV 16, 18, 31 ou 33) foram classificadas como positivas para “HPV de alto risco”. As pacientes nas quais foram identificados mais de um tipo de DNA de HPV foram classificadas como “com infecção múltipla por HPV”.

4.5 DETERMINAÇÃO DO POLIMORFISMO ARG/PRO DO CÓDON 72 DA P53

A pesquisa do polimorfismo Arg/Pro foi efetuada com o uso de PCR utilizando os primers: 72S (5'... TTG CCG TCC CAA GCA ATG GAT GA ... 3') e 72A (5'... TCT GGG AAG GGA CAG AAG ATG AC ... 3'). As pacientes homozigotas para o alelo que codifica arginina na posição 72 do gene *TP53* foram caracterizadas como tendo genótipo Arg/Arg p53; as homozigotas para o alelo que codifica prolina na posição 72 do gene *TP53* foram denominadas Pro/Pro p53 e as heterozigotas, Arg/Pro p53⁵³.

4.6 PESQUISA IMUNOHISTOQUÍMICA DE P16^{INK4a}

As amostras fixadas foram submetidas à imunohistoquímica utilizando o anticorpo primário específico para p16^{INK4a}. Por encontrarmos alguns blocos de parafina com conservação inadequada para análise imunohistoquímica, foi necessário restringir a pesquisa do anticorpo para p16^{INK4a} em 57 amostras. Os blocos de parafina foram cortados e fixados em lâminas preparadas com poli-L-lisina. Os cortes tratados seqüencialmente com xilol, etanol absoluto, etanol 90%, etanol 80%, etanol 70% e água destilada para a desparafinização. Para o bloqueio da peroxidase

endógena, a amostra foi tratada com peróxido de hidrogênio 3% por 10 minutos. As lâminas foram incubadas por uma hora com o anticorpo monoclonal anti-p16 (Novocastra laboratories Ltd) e, a seguir, tratadas com o anticorpo secundário marcado com biotina (Novostain universal detection kit, Novocastra laboratories Ltd) por 10 minutos e estreptavidina-peroxidase por mais 10 minutos. Após, foi colocado o substrato, Diaminobenzidina (DAB). Como contraste foi utilizado a coloração com hematoxilina-eosina (mergulhando a lâmina por 15 segundos).

As lâminas foram analisadas no microscópio ótico e classificadas como negativas (se não apresentassem reação), + (se menos de 5% das células fossem reagentes), ++ (de 5 a 50% reagentes), +++ (mais de 50% reagentes) para a expressão das proteínas. Para análise posterior classificamos as pacientes com +++ para a expressão da p16^{INK4a} como “super expressão presente” e a as outras pacientes foram referidas como “super expressão ausente”.

4.7 VARIÁVEIS DO ESTUDO

As variáveis analisadas em relação à super expressão da p16^{INK4a} foram:

- grupos com lesão cervical *in situ* e invasora
- estadiamento do câncer de colo uterino
- sobrevida livre de doença

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A razão de chance (odds ratio (OR)) com um intervalo de confiança (IC) de 95% foi calculada para examinar a força e a precisão da associação entre a super expressão da p16^{INK4a} e o risco de invasão da membrana basal do epitélio cervical pelas células displásicas. O teste de qui-quadrado (X^2) foi utilizado para examinar as diferenças nas proporções de fatores de risco para o câncer cervical. A análise univariada da sobrevida livre de doença e recorrência na medição do acompanhamento foi baseada no método de Kaplan-Meier, usando o teste log-rank para comparar os grupos. A análise multivariada (para controlar os fatores de confusão da amostra) foi realizada

pelo cálculo de regressão de Cox (Cox's proportional hazards model). Também foram utilizados cálculos de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo.

4.9 ÉTICA

Este estudo encontra-se em conformidade com os itens III.3.i e III.3.t das Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas envolvendo Seres Humanos (Resolução CNS 196/96), bem como a diretriz 12 das Diretrizes Éticas Internacionais para Pesquisas Biomédicas envolvendo Seres Humanos (CIOMS 1993), tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – adendo ao Protocolo 002/99.

5 RESULTADOS

Foram analisados os dados de 90 pacientes com carcinoma cervical, classificadas de acordo com o estadiamento da FIGO da seguinte maneira: 49 (54%) pacientes no estágio 0 (carcinoma *in situ*), 19 (21%) em estágio I (1 IA e 18 IB), 11 (12%) em estágio II (4 IIA e 7 IIB) e 11 (12%) em estágio III (2 IIIA e 9 IIIB) (Figura 4).

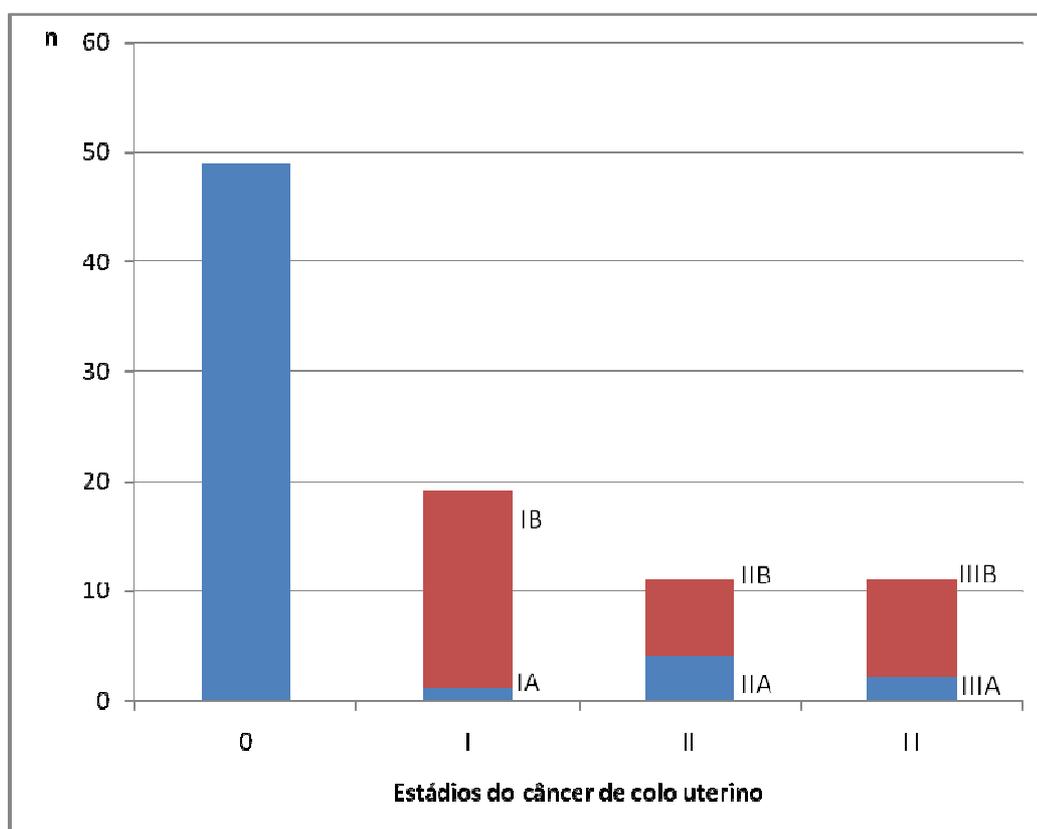


Figura 4 – Distribuição de pacientes por estádios do câncer de colo uterino

Uma série de fatores clínicos e moleculares de risco para o câncer cervical, como idade, cor da pele, número de parceiros sexuais, uso de contraceptivo oral, idade da menarca, idade da primeira relação sexual, gestações, partos, idade no primeiro parto, tabagismo, escolaridade,

estado civil, parceiro sexual fixo, presença de DNA de HPV de alto risco, múltipla infecção pelo HPV e o polimorfismo no códon 72 do gene *TP53*, foi pesquisada nos grupos com lesão *in situ* e invasora. Como observado nas Tabelas 3 e 3a, nenhum destes fatores de risco apresentou diferença significativa entre os grupos, evidenciando uma distribuição homogênea (pareamento) de tais fatores nas pacientes com lesão *in situ* e invasora. A Tabela 3 chama atenção para o grupo todo de 90 pacientes, já a Tabela 3a demonstra as variáveis distribuídas pelas 57 pacientes nas quais foi possível a pesquisa da expressão da p16^{INK4a}. Nenhuma paciente do estudo apresentava ou tinha história de doenças sexualmente transmissíveis outras além do HPV.

Tabela 3 – Variáveis de risco x Grupo (n=90)

Variáveis de risco	Grupo (Carcinoma cervical)		Valor de p
	Lesão <i>in situ</i> (n:49)	Lesão invasora (n:41)	
	Valor	Valor	
Idade média (anos)	39,0	43,3	0,054
Cor da pele (branca)	73,5%	80,5%	0,433
Número médio de parceiros sexuais	3	2,56	0,617
Uso de método contraceptivo	73,5%	61,0%	0,200
Idade média da menarca (anos)	13,1	12,7	0,204
Idade média da 1ª relação sexual (anos)	16,6	16,9	0,605
Número médio de gestações	3,5	4,3	0,132
Número médio de partos	2,8	3,7	0,054
Número médio de partos normais	2,6	3,2	0,959
Média de idade no primeiro parto (anos)	20,3	19,8	0,668
Tabagismo	55,1%	46,3%	0,400
Presença de DNA de HPV de alto risco	77,6%	85,4%	0,345
Infecção múltipla por HPV	34,0%	42,0%	0,534
Escolaridade - 1º Grau incompleto	59,2%	65,9%	0,111
Estado Civil – Casada	67,3%	78,0%	0,253
Com parceiro sexual atual fixo	77,6%	82,9%	0,711
Arg/Arg p53	50,0%	58,0%	0,321

Tabela 3a – Variáveis de risco x Grupo (n=57)

Variáveis de risco	Grupo (Carcinoma cervical)		Valor de p
	Lesão <i>in situ</i> (n:24)	Lesão invasora (n:33)	
	Valor	Valor	
Idade média (anos)	38,6	42,7	0,057
Cor da pele (branca)	70,8%	81,8%	0,329
Número médio de parceiros sexuais	2	2,6	0,323
Uso de método contraceptivo	73,3%	57,6%	0,173
Idade média da menarca (anos)	13	12,6	0,388
Idade média da 1ª relação sexual (anos)	16,3	16,9	0,366
Número médio de gestações	3,2	4,5	0,061
Número médio de partos	2,7	3,8	0,061
Número médio de partos normais	2,4	3,3	0,156
Média de idade no primeiro parto (anos)	19,8	20,4	0,679
Tabagismo	62,5%	48,5%	0,294
Presença de DNA de HPV de alto risco	79,2%	87,9%	0,601
Infecção múltipla por HPV	31,0%	41,8%	0,305
Escolaridade - 1º Grau incompleto	66,7%	69,7%	0,808
Estado Civil – Casada	62,5%	78,8%	0,176
Com parceiro sexual atual fixo	66,7%	81,8%	0,189
Arg/Arg p53	40,9%	57,6%	0,235

Entre as pacientes com lesão cervical *in situ* observamos a seguinte característica da expressão da p16: 2 pacientes eram negativas, 6 com (+) para expressão, 7 com (++) e 9 com (+++). Já no grupo com lesão invasora, 4 pacientes apresentaram (++) e 29 pacientes (+++) de expressão da p16 (X^2 :18,38; 3 graus de liberdade (GL); $p=0,0003$) (Tabela 4).

Tabela 4 – Grupo x Expressão da p16^{INK4a}

Grupo	Expressão da p16 ^{INK4a}				Total (%)
	Negativa (%)	+ (%)	++ (%)	+++ (%)	
Lesão invasora	0 (0)	0 (0)	4 (12,1)	29 (87,9)	33 (100)
Lesão <i>in situ</i>	2 (8,3)	6(25)	7 (29,1)	9 (37,6)	24 (100)
Total	2 (3,5)	6 (10,5)	11 (19,3)	38 (66,7)	57 (100)

Valor de $p=0,0003$
 X^2 :18,38

Ao analisarmos os dois grupos de pacientes em relação à expressão da p16^{INK4a} como variável dicotomizada, identificamos a maioria do grupo com lesão invasora (29/33 pacientes) com super expressão, ao contrário do grupo com lesão *in situ* onde a maior parte das pacientes (15/24) não apresentava super expressão da p16^{INK4a}. Esta associação se mostrou estatisticamente significativa (X^2 :13,68; 2GL; $p=0,0002$ com uma razão de chance (OR) de 12,08 (2,74<OR<58,43) (Tabela 5).

Tabela 5 – Grupo x Super expressão da p16^{INK4a}

Grupo	Super expressão da p16 ^{INK4a} (+++)		Total
	Presente	Ausente	
Carcinoma invasor	29	4	33
Carcinoma <i>in situ</i>	9	15	24
Total	38	19	57

Valor de $p=0,0002$

X^2 (Yates): 13,68

OR: 12,08 (2,74<OR<58,43)

Na Tabela 6 podemos identificar uma associação entre a super expressão da p16^{INK4a} e o estadiamento do câncer cervical (X^2 :18,69; 6GL; $p=0,0047$), quanto maior o estadiamento, maior a frequência de super expressão da p16^{INK4a}. Observando a Figura 5, verificamos que também existe uma associação presente entre a invasão da membrana basal do colo uterino por células carcinomatosas e os índices de recorrência. A análise univariada (Kaplan-Meier) de recorrência demonstrou diferença significativa entre a sobrevida livre de doença (SLD) e os grupos (lesão *in situ* e lesão invasora), assim como entre a SLD e a super expressão de p16^{INK4a}. Uma paciente com lesão invasora apresenta 2,8 vezes o risco de recorrência daquela com lesão *in situ*.

Tabela 6 – Super expressão da p16^{INK4a} X Estadiamento

Super expressão da p16 ^{INK4a}	Estadiamento							Total
	0	IA	IB	IIA	IIB	IIIA	IIIB	
Presente	9	6	6	1	6	2	8	38
Ausente	15	0	2	1	0	0	1	19
Total	24	6	8	2	6	2	9	57

Valor de $p=0,0047$

X^2 : 18,69

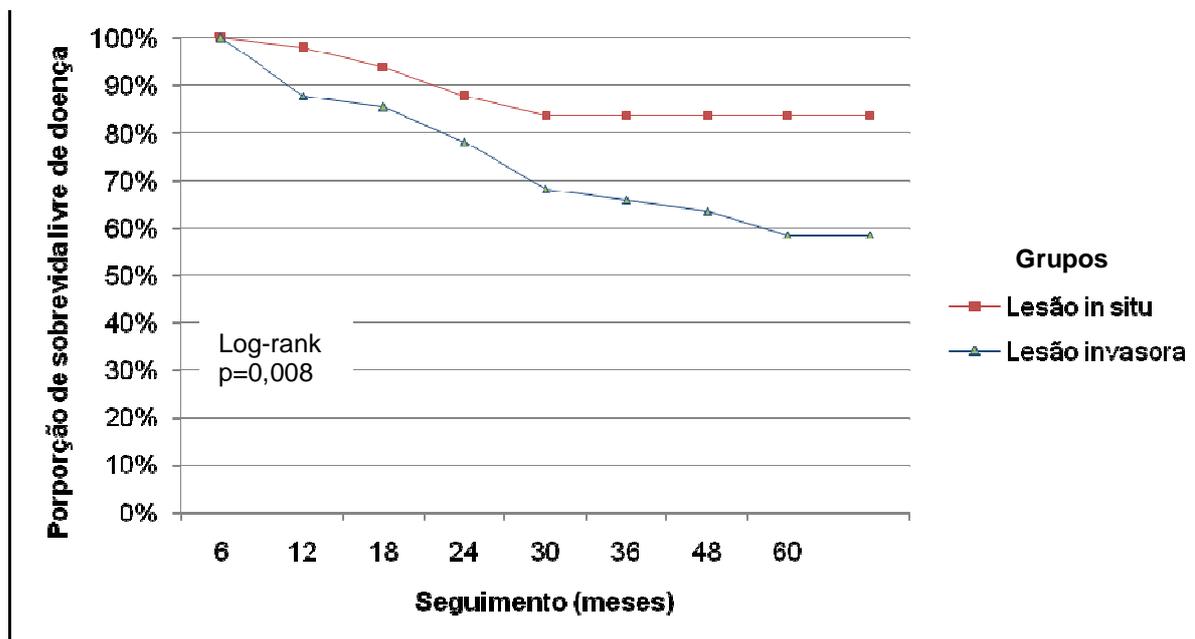


Figura 5 – Sobrevida livre de doença entre os grupos com lesão *in situ* e invasora (método de Kaplan-Meier) n=90.

A Figura 6 demonstra a relação entre a super expressão da $p16^{INK4a}$ e a SLD. Podemos notar que existe uma relação estatisticamente significativa entre estas variáveis. A super expressão da $p16^{INK4a}$ traria um risco de 10,01 vezes aquele das pacientes sem este fator para a recorrência (HR:10,01; valor de $p=0,004$). Quando controlado para a interação com os grupos de lesão cervical (cálculo de regressão de Cox), este risco cai para 4,83, mas não demonstra significância estatística (valor de $p=0,14$) (Tabela 7).

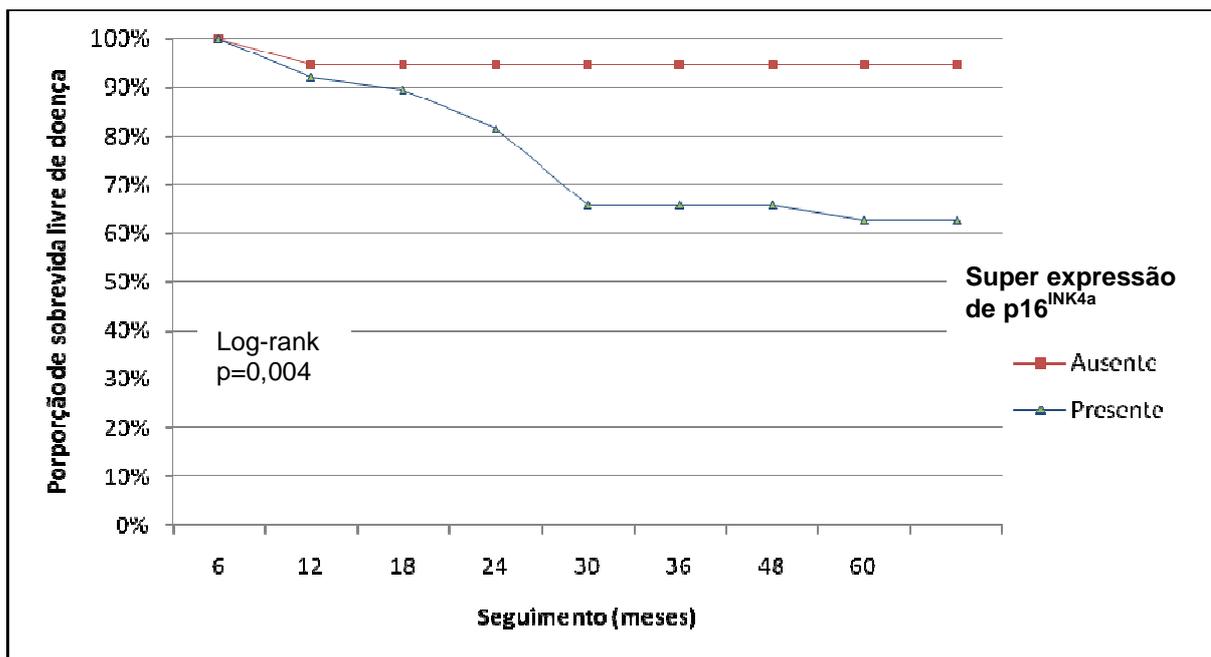


Figura 6 – Sobrevida livre de doença das pacientes com super expressão de p16^{INK4a} presente e ausente (método de Kaplan-Meier) n=57.

Tabela 7 – Sobrevida livre de doença

Grupos	N	Recorrência	Sobrevida livre de doença (%)								HR	p	HR*	p*
			6 meses	12 meses	18 meses	24 meses	30 meses	36 meses	48 meses	60 meses				
Lesão <i>in situ</i>	49	8 (16,3%)	97,9	93,8	87,7	83,7	83,7	83,7	83,7	83,7	Referência			
Lesão invasora	41	17 (41,4%)	87,8	85,3	78,0	68,2	65,8	63,4	58,5	58,5	2,8 (1,33 a 6,75)	0,008		
Super expressão de p16^{INK4a}														
Ausente	19	1 (5,2%)	94,6	94,6	94,6	94,6	94,6	94,6	94,6	94,6	Referência			
Presente	38	18 (47,3%)	92,1	89,4	81,5	65,7	65,7	65,7	62,7	62,7	10,01(1,55 a 11,1)	0,004	4,83 (0,57 a 40,52)	0,14

HR = hazard ratio

HR* = hazard ratio ajustado (controlado para interação com os grupos)

P = valor de p

P* = valor de p ajustado (controlado para interação com os grupos)

A Figura 7 ilustra a SLD de acordo com o estadiamento do carcinoma cervical. Nesta figura podemos observar o prognóstico mais reservado das pacientes com estágio avançado da doença.

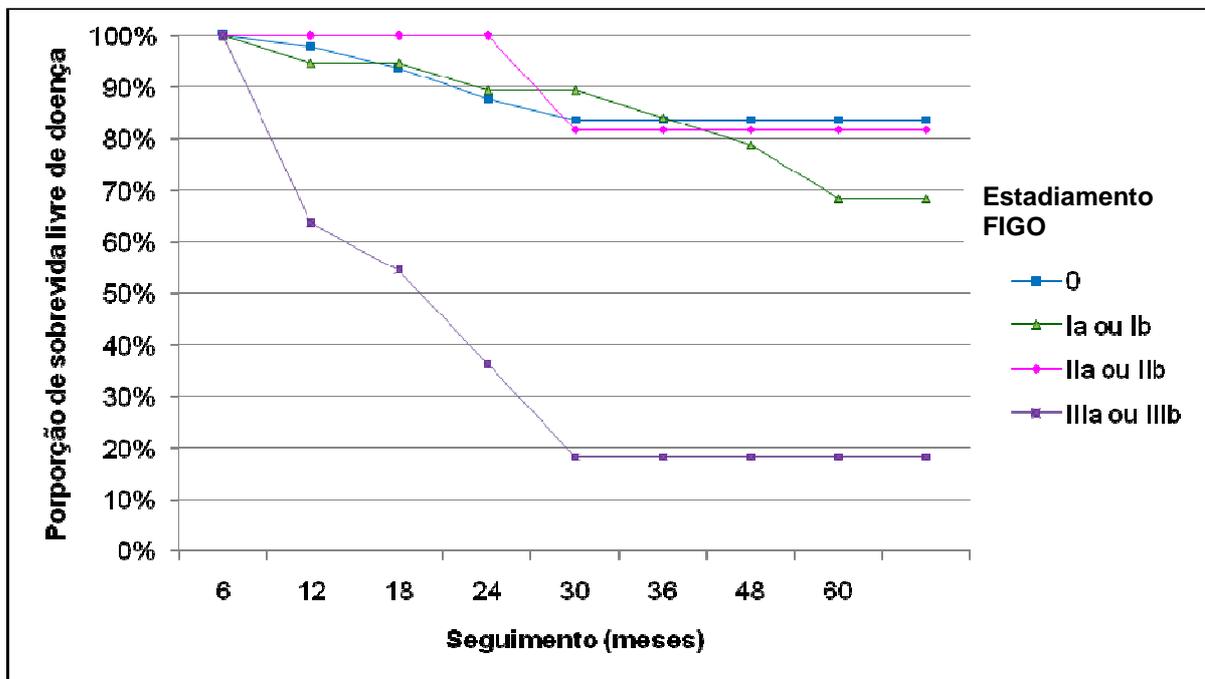


Figura 7 – Sobrevida livre de doença de acordo com o estadiamento do câncer cervical (método de Kaplan-Meier) n=90.

A Tabela 8 traz a análise univariada de Kaplan-Meier para SLD de acordo com o estadiamento clínico. Assim, observamos uma diferença significativa na SLD entre os estádios III (IIIa ou IIIb) e 0. Porém, apesar de apresentar uma tendência ao aumento do risco de recorrência entre os estádios iniciais e o estágio 0, esta diferença não foi significativa (valor de $p=0,2$ para os estádios Ia ou Ib e valor de $p=0,9$ para os estádios IIa ou IIb). Na análise de regressão de Cox, a relação entre fator de exposição e de confusão também foi controlada pela inclusão de interação dos termos “expressão de $p16^{INK4a}$ ” e “estádio clínico pela FIGO” no modelo. Esta análise nos possibilitou identificar a presença marcante de uma associação entre estadiamento e SLD (valor de $p=0,001$), independente da expressão da $p16^{INK4a}$. Foi também identificado um risco de 3,9 para a recorrência entre as pacientes com super expressão da $p16^{INK4a}$, independente do estágio clínico, porém, sem significância estatística (valor de $p=0,20$).

Tabela 8 – Sobrevida livre de doença – influência do estadiamento e da expressão da $p16^{INK4a}$

	n	Recorrência	Sobrevida livre de doença (%)								HR	p	HR*	p*	
			6 meses	12 meses	18 meses	24 meses	30 meses	36 meses	48 meses	60 meses					
Estádio FIGO															
0	49	8 (16,3%)	97,9	93,8	87,7	83,7	83,7	83,7	83,7	83,7	Referência				
Ia ou Ib	19	6 (31,5%)	94,7	94,7	89,4	89,4	84,2	78,9	68,5	68,5	1,9 (0,66 a 7,03)	0,2			
IIa ou IIb	11	2 (18,1%)	100	100	100	81,8	81,8	81,8	81,8	81,8	1,0 (0,21 a 5,42)	0,9			
IIIa ou IIIb	11	9 (81,8%)	63,6	54,5	36,3	18,2	18,2	18,2	18,2	18,2	8,1 (13,79 a 284,74)	<0,0001	2,2 (1,37 a 3,62)	0,001	
Super expressão de $p16^{INK4a}$															
Ausente	19	1 (5,2%)	94,6	94,6	94,6	94,6	94,6	94,6	94,6	94,6	Referência				
Presente	38	18 (47,3%)	92,1	89,4	81,5	65,7	65,7	65,7	62,7	62,7	10,01 (1,55 a 11,1)	0,004	3,9 (0,47 a 32,09)	0,20	

HR = hazard ratio

HR* = hazard ratio ajustado (controlado para interação estadiamento FIGO / $p16^{INK4a}$)

P = valor de p

P* = valor de p ajustado (controlado para interação estadiamento FIGO / $p16^{INK4a}$)

Se considerarmos apenas as pacientes no qual foi possível pesquisar a expressão da $p16^{INK4a}$, estaremos trabalhando com um grupo de 57 mulheres, distribuído da seguinte maneira: grupo com lesão *in situ* com 24 pacientes e grupos com lesão invasora com 33 pacientes. Visto

que se trata de um grupo homogêneo, pareado pelas possíveis variáveis de risco e, portanto, sem os prováveis fatores de confusão, poderemos fazer a análise que segue.

Vinte e duas pacientes do grupo com lesão *in situ* atingiram o desfecho SLD no período do estudo. 68,1% destas pacientes não apresentavam super expressão da p16^{INK4a}. Das pacientes com lesão invasora, apenas 16 atingiram este desfecho, outras 17 evoluíram com recorrência e/ou morte. 94,1% destas últimas apresentaram super expressão da p16^{INK4a} (Figura 8).

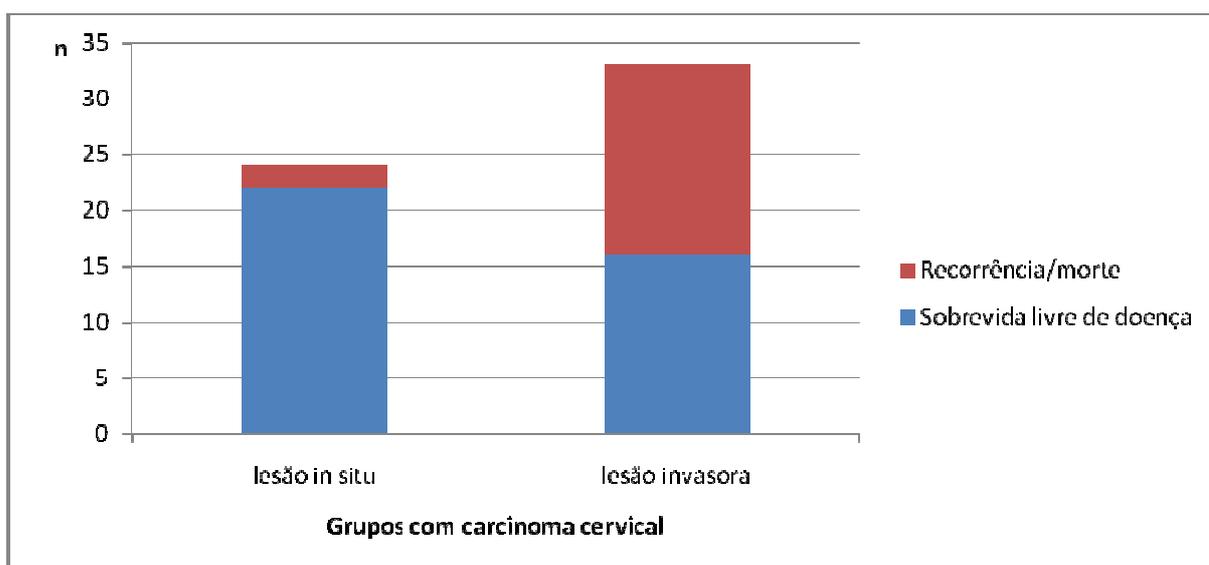


Figura 8 – Grupos com carcinoma cervical (lesão *in situ* e lesão invasora) X sobrevida livre de doença

Em 94,7% (18/19) das pacientes que apresentaram pior prognóstico (recorrência) foi demonstrado super expressão da p16^{INK4a}. Entre as pacientes com SLD, este percentual foi de 52,3% (20/38). Como fator prognóstico determinante da SLD, ao considerarmos todo o grupo de pacientes, a expressão da p16^{INK4a} demonstra alto valor preditivo negativo (94,7%) e sensibilidade (94,7%), mas baixa especificidade (47,4%) e valor preditivo positivo (47,4%) (Tabela 9).

Tabela 9 – Super expressão da p16^{INK4a} como preditor da sobrevida livre de doença

Grupo	Evolução		Total	Análise univariada
	Recorrência	SLD		
Carcinoma invasor (n=33)				
p16 ^{INK4a}				Sensibilidade 94,1%
com super expressão	16	13	29	Especificidade 18,8%
sem super expressão	1	3	4	VPP 55,2%
				VPN 75%
Carcinoma <i>in situ</i> (n=24)				
p16 ^{INK4a}				Sensibilidade 100%
com super expressão	2	7	9	Especificidade 68,2%
sem super expressão	0	15	15	VPP 22,2%
				VPN 100%
Total (n=57)				
p16 ^{INK4a}				Sensibilidade 94,7%
com super expressão	18	20	38	Especificidade 47,7%
sem super expressão	1	18	19	VPP 47,7%
				VPN 94,7%

SLD = sobrevida livre de doença

VPP = Valor preditivo positivo

VPN = Valor preditivo negativo

6 DISCUSSÃO

O diagnóstico de carcinoma *in situ* traduz um risco significativo de lesão invasiva se não tratado, sendo que a proporção de casos propensos à progressão ao câncer cervical aumenta com a duração do seguimento. Vários autores investigaram este risco de desenvolver câncer, encontrando valores entre 12% a 71% de progressão^{9,54,55}.

A média de idade para o diagnóstico do câncer de colo uterino é apontada como 47 anos⁵⁶. Entretanto, nos últimos anos tem ocorrido o diagnóstico desta doença em pacientes mais jovens. Em 2007, 59% dos casos de câncer cervical registrados no estado do Rio Grande do Sul eram de mulheres com menos de 39 anos².

Alguns autores relatam que a média de idade das pacientes com lesões cervicais pré-malignas é entre 10 e 15 anos inferior à média de idade das pacientes com câncer^{57,58}. O tempo de evolução das lesões pré-malignas seria, desta forma, fator determinante na transformação das lesões cervicais displásicas em câncer. Na história natural das lesões malignas cervicais precisaríamos mais de uma década para o desenvolvimento do câncer a partir de uma lesão pré-neoplásica.

A identificação, cada vez mais freqüente, de pacientes jovens com câncer de colo uterino nos faz pensar que a evolução desta doença é determinada por fatores diversos do próprio tempo. Portanto, precisamos ficar atentos à mudança do comportamento biológico do câncer de colo uterino. Neste estudo identificamos uma média de idade similar entre as pacientes com lesão *in situ* (39 anos) e as com lesão invasora (43,3 anos) (valor de $p=0,054$). Este pareamento etário visa diminuir a influência temporal como fator de confusão no estudo da transformação de um carcinoma *in situ* a invasor. Também identificamos similaridade nos dois grupos em relação a uma série de variáveis sociais, demográficas e de risco para o câncer cervical (Tabela 3 e 3a).

Os HPVs de alto risco estão criticamente envolvidos com a carcinogênese cervical, apesar de a grande maioria das infecções ser transitória, com a eliminação do vírus em um período inferior a 12 meses^{59,60}. O HPV é dito fator fundamental, mas não único, para o desenvolvimento do câncer cervical. Assim, é necessário que outros fatores ou condições de risco estejam

presentes para a carcinogênese. Estudos epidemiológicos apontam os seguintes fatores como importantes para o desenvolvimento do câncer quando associados à presença do HPV: idade do início da atividade sexual, paridade, número de parceiros sexuais, promiscuidade, tabagismo, nível sócio-econômico, fatores imunológicos e doenças sexualmente transmissíveis^{17,60,61}.

A análise molecular que simplesmente indica a presença do HPV possui baixo valor preditivo positivo na evolução das lesões pré-malignas cervicais, pois a integração do DNA viral na célula hospedeira, que é necessária para o desenvolvimento do câncer, ocorre apenas em algumas células infectadas. Isto explicaria porque a maioria das infecções por HPV apresenta remissão espontânea, especialmente em mulheres mais jovens⁶².

Na procura por fatores de risco associados ao HPV, alguns estudos buscaram características da relação do hospedeiro, a paciente, com o vírus. Diversos trabalhos analisaram o polimorfismo do códon 72 do gene *TP53* em relação à hipótese de que pacientes homozigotas para a variante alélica que codifica arginina (Arg/Arg p53) teriam um risco aumentado de câncer cervical associado ao HPV. Os resultados neste ponto foram bastante controversos na literatura²⁶. Contudo, alguns autores apontam um risco de 3,6 a 7,2 vezes para o desenvolvimento de câncer cervical associado ao HPV entre as pacientes Arg/Arg p53^{26,28,29,30,31,32,33,63}.

Apesar desta gama de variáveis de risco associadas ao câncer cervical, o fator decisivo, preditor da transformação do carcinoma *in situ* em invasor ainda não está estabelecido. Neste trabalho avaliamos dois grupos de pacientes com carcinoma cervical bastante homogêneos em relação aos possíveis fatores e condições de risco da doença, como ressaltado nas Tabelas 3 e 3a onde não há diferença estatisticamente significativa entre tais variáveis. Desta forma, possuímos dois grupos diferentes apenas no risco de invasão da membrana basal por células displásicas cervicais. Na busca do fator responsável por esta invasão investigamos a expressão da p16^{INK4a}.

Biomarcadores são indicadores mensuráveis da exposição e status de susceptibilidade ou doença, muito utilizados no entendimento da progressão ao câncer^{46,64,65}. O uso de marcadores moleculares como ferramenta de rastreamento na patologia cervical tem sido acessado na literatura recente. A necessidade de marcadores para identificar células que estão não apenas infectadas por HPV, mas que provavelmente transcorram com transformação maligna mediada pela atividade viral é premente.

A expressão da p16^{INK4a} já foi utilizada como marcador diagnóstico e prognóstico das lesões pré-malignas e malignas cervicais, com resultados discordantes, em alguns estudos^{66,67,68,69,70,71,72}. Também já foi associada com o diagnóstico de infecção por HPVs de alto risco e com a atividade oncogênica destes^{67,74}. Contudo, este é o primeiro estudo a investigar a expressão da p16^{INK4a} como preditor da invasão da membrana basal pelas células displásicas cervicais. 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.

As oncoproteínas E6 e E7 dos HPVs de alto risco 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 inativa⁷³.

A p16^{INK4a} é uma proteína que está envolvida no controle da proliferação celular por ser inibidora dos complexos ciclina – cinase dependente de ciclina (CDK). Os complexos ciclina /CDK4 ou 6 são responsáveis por fosforilar a pRb que leva à 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^{25,73}.

Neste estudo a expressão da p16^{INK4a} foi identificada em 91,7% das lesões *in situ* e em 100% das lesões invasoras (Tabela 4). Estudos recentes também identificaram altas taxas, entre 80% e 92%, de expressão da p16^{INK4a} em lesões pré-malignas cervicais de alto grau (NIC II e NIC III)^{66,72,74}. Murphy e colaboradores encontraram super expressão da p16^{INK4a} em 61% dos carcinomas cervicais *in situ* (28/46 casos) e em 100% das lesões invasoras (10/10 casos), demonstrando ser este fator um marcador da displasia celular cervical, com uma sensibilidade de 99,9% e especificidade de 100%⁷⁵. Um estudo italiano demonstrou ser a super expressão da p16^{INK4a} um fator de risco para a NIC III e/ou câncer de colo uterino, com um OR de 4,07. Porém, os estudos não trazem o risco de lesão invasora atribuído a uma paciente com carcinoma *in situ* e super expressão da p16^{INK4a}, além de identificarem diferença significativa entre as idades das pacientes com lesões pré-malignas e malignas cervicais^{46,74,75}.

Ao parearmos os grupos com lesão cervical *in situ* e invasora, isolamos fatores de confusão importantes como o tempo (idade), a infecção por HPV, o tabagismo, o polimorfismo do códon 72 do gene *TP53*, múltiplos parceiros sexuais e variações demográficas; determinamos então uma associação significativa entre a presença de super expressão da p16^{INK4a} e o carcinoma invasor. Uma paciente com lesão cervical *in situ* e super expressão da p16^{INK4a} teria 12,08 vezes o risco de apresentar invasão da membrana basal por células displásicas quando comparada com aquela sem a super expressão da p16^{INK4a} (X^2 :13,68; $p=0,0002$; OR:12,08).

Estudos prévios já demonstraram um aumento da expressão da p16^{INK4a} associado ao aumento do grau das lesões pré-malignas e malignas cervicais, sugerindo um aumento na desordem do ciclo celular causado pelo HPV^{13,67,70,74}. Ao analisarmos nosso grupo de pacientes, encontramos 54% classificadas como estágio 0 da FIGO, 21% como estágio I, 12% como estágio II e 12% como estágio III (Figura 4). Nossos dados apontam naquela mesma direção, quanto maior o estadiamento do câncer cervical, maior a frequência da super expressão da p16^{INK4a} (Tabela 6).

Em relação à evolução da doença, apontamos 16,3% das pacientes do grupo com lesão *in situ* com recorrência, enquanto que no grupo com lesão invasora este percentual foi de 41,4%. A invasão da membrana basal por células displásicas (grupo com lesão invasora) apresentou risco de recorrência 2,8 vezes aquele do grupo com lesão *in situ* ($p=0,008$). Estes dados confirmam os encontrados na literatura em relação aos fatores prognósticos no câncer cervical⁴⁹.

Também chama atenção a relação estatisticamente significativa (X^2 :18,38; $p=0,0003$) presente entre a graduação da própria expressão da p16^{INK4a} com os grupos de paciente com lesão *in situ* e invasora. O grupo com lesão invasora concentra o maior percentual de super expressão da p16^{INK4a} (87,9%), enquanto que o grupo com *in situ* apresenta todas as possibilidades de expressão da p16^{INK4a}: 8,3% negativas, 25% positivas +, 29,1% positivas ++ e 37,6% com super expressão (Tabela 4). A super expressão da p16^{INK4a} tem sido associada com o HPV e inversamente correlacionada com a função da pRb. De fato, a proteína E7 do HPV é responsável pelo aumento nos níveis de p16^{INK4a}, que refletiriam um descontrole do ciclo celular^{45,76}.

Existem discrepâncias em estudos iniciais no valor prognóstico e preditivo da expressão da p16^{INK4a} e pRb. Para vários investigadores a super expressão da p16 estaria associada com

prognóstico mais reservado^{77,78}. Entretanto, outros têm demonstrado que a baixa expressão da p16^{INK4a} é um indicador de pior prognóstico^{79,80}.

Para Bahnassy e colaboradores, as alterações na expressão da p16^{INK4a} são consideradas eventos precoces na carcinogênese do colo uterino. Testes imunohistoquímicos para p16^{INK4a} poderiam auxiliar no diagnóstico precoce do câncer cervical. Porém, a p16^{INK4a} não seria um dos fatores envolvidos no prognóstico do câncer cervical⁸¹.

Em um estudo sobre o papel da p16^{INK4a} na história natural das lesões pré-malignas cervicais, Hariri & Oster encontraram apenas 1 caso de progressão entre 26/91 casos com NIC I negativos para p16^{INK4a}. Estes autores enfatizaram as lesões pré-malignas de baixo grau e demonstraram um valor preditivo negativo de 96% para a expressão da p16^{INK4a} em prever a evolução da NIC I⁸².

Guedes e colaboradores apresentaram um trabalho sobre a expressão da p16^{INK4a} na evolução de 45 pacientes com neoplasia intraepitelia de grau II que se mantiveram em acompanhamento, sem tratamento cirúrgico, no período de um ano (média de 6,8 meses). Para estes autores, não existe associação significativa entre a p16^{INK4a} e a evolução das NIC II⁶⁸.

Branca e colaboradores, em seu estudo sobre marcadores moleculares no câncer cervical, avaliaram 13 biomarcadores em relação a prognóstico e presença de HPV. A super expressão da p16^{INK4a} esteve associada com um melhor prognóstico nas pacientes com câncer (OR=2,17), achado que foi de encontro a outro que demonstrou íntima relação entre p16^{INK4a} e a presença de HPV de alto risco (OR=4,9)⁴⁶. Assim como Branca e colaboradores, Nam e colaboradores também demonstraram um valor menor na expressão da p16 associado com a recorrência^{46,83}. Estes achados são contrários a outros estudos que apontam o aumento da expressão da p16^{INK4a} como fator determinante de prognóstico reservado^{35,65}. O valor prognóstico da expressão da p16^{INK4a} nas lesões pré-malignas e no carcinoma de colo uterino ainda não está bem estabelecido.

Alguns autores têm sugerido que a falha no tratamento das lesões precursoras do câncer cervical e as taxas de recorrência estão intimamente relacionadas com a persistência de infecção por HPVs de alto risco^{84,85}. Por isso, a super expressão da p16^{INK4a}, agindo como marcador da atividade oncogênica do HPV, poderia ser utilizada como preditor da sobrevida livre de doença / recorrência do carcinoma *in situ* e extrapolada para as lesões invasoras.

No presente estudo, 94,7% (18/19) das pacientes que apresentaram pior prognóstico foram classificadas com super expressão da p16^{INK4a}. Entre as pacientes com SLD este percentual foi de 52,3% (20/38) (p=0,004). Como fator prognóstico determinante da SLD, ao considerarmos todo o grupo de pacientes, a expressão da p16^{INK4a} demonstra alto valor preditivo negativo (94,7%) e sensibilidade (94,7%), mas baixa especificidade (47,4%) e valor preditivo positivo (47,4%) (Tabela 9).

A análise univariada (Kaplan-Meier) da presença de super expressão da p16^{INK4a} evidenciou um risco de 10,01 para a recorrência no período de até 60 meses na nossa amostra (HR:10,01; p=0,004). Este risco diminui para 4,83 e 3,9 quando ajustamos, na análise multivariada (regressão de Cox), o HR para os grupos e para o estadiamento clínico, respectivamente. Contudo, estas associações ocorreram sem significância estatística (p=0,14 e p=0,20, respectivamente). Neste modelo de análise multivariada, assim como sugerido por outros autores^{46,74}, apenas a invasão da membrana basal (grupos com lesão *in situ* x com lesão invasora) e o estadiamento clínico se mostraram como fatores preditivos independentes de recorrência (p=0,008 e p=0,004, respectivamente).

Podemos concluir que existe uma associação estatisticamente significativa entre a presença de super expressão da p16^{INK4a} e a invasão da membrana basal por células displásicas. Este fator, provavelmente, é determinante na diferenciação de lesão *in situ* à invasora cervical. A super expressão da p16^{INK4a} possui alta sensibilidade e VPN na identificação da recorrência das lesões cervicais. Contudo, não demonstrou relação significativa, na análise multivariada, com o prognóstico das lesões cervicais, mas sim associação direta e proporcional com o estadiamento clínico. Desta forma, corroboramos o achado anterior de fator importante e ponto crítico na transformação de carcinoma *in situ* a invasor da cérvix uterina.

Baseados nestes achados é dedutível que a investigação da expressão da p16^{INK4a} tornará mais fácil o entendimento da carcinogênese do colo uterino, possibilitando o controle diferenciado das lesões precursoras do câncer cervical. A determinação da expressão da p16^{INK4a} virá como auxílio na decisão das condutas clínicas frente às pacientes com lesões pré-malignas cervicais. Assim, poderemos optar por condutas mais conservadoras quando na ausência de super expressão da p16^{INK4a} e sermos mais intervencionistas quando na presença daquela super expressão.

7 CONCLUSÕES

A análise dos resultados do presente estudo permitiu chegarmos às seguintes conclusões:

1 - As neoplasias cervicais *in situ* demonstram toda a gama de possibilidades de expressão da p16^{INK4a}, desde a negatividade (8,3%) até a super expressão (37,6%).

2 - Nas lesões invasoras nenhuma foi negativa para expressão da p16^{INK4a} ou apresentou baixa expressão, sendo que a maioria apresentou super expressão (87,9%) e o restante (12,1%) expressão ++.

3 - Existe uma associação estatisticamente significativa entre a super expressão da p16^{INK4a} e a neoplasia cervical *in situ* e invasora (p=0,0002).

4 - A super expressão da p16^{INK4a} possui alta sensibilidade e VPN na identificação da recorrência das lesões cervicais.

5 - A super expressão da p16^{INK4a} não demonstrou relação significativa, na análise multivariada, com o prognóstico das lesões cervicais.

6 - A super expressão da p16^{INK4a} mostrou associação direta e proporcional com o estadiamento clínico.

7 - A super expressão da p16^{INK4a} confere 12,08 vezes o risco de uma paciente com lesão cervical *in situ* apresentar invasão da membrana basal por células displásicas quando comparada com aquela sem a super expressão da p16^{INK4a} (X^2 :13,68; p=0,0002; OR:12,08).

8 REFERÊNCIAS

-
- ¹ WHO (World Health Organization). World Health Statistics. Global health indicators. [Capturado em 28 de junho de 2008]. Disponível em <http://www.who.int/entity/hpvcntr/statistics/en>.
- ² INCA (Instituto Nacional do Câncer). Estimativa 2008. Incidência de câncer no Brasil. [Capturado em 28 de junho de 2008]. Disponível em <http://www.inca.gov.br/estimativa/2008>.
- ³ Ministério da Saúde do Brasil. Pactos de indicadores de atenção básica. SISCAM (Sistema de informação do câncer da mulher). Capturado em 28 de junho de 2008]. Disponível em <http://www.datasus.gov.br/siscam/pacto.php>.
- ⁴ Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, et al. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002; 55:244-65,
- ⁵ Burke L, Mathews BE. Colposcopy in clinical practice. Philadelphia: Davis Company; 1977.
- ⁶ Wright TC, Cox JT, Massad LS, et al. 2001 Consensus Guidelines for the management of women with cervical cytological abnormalities. *JAMA* 2002; 287(16):2120-29.
- ⁷ Collège National des Gynécologues et Obstétriciens Français. Prevention of cervical cancer. Guidelines. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 2008; 37(Suppl 1):167-72.
- ⁸ El Hamidi A, Koejan G, Du MQ. Clonality analysis of archival cervical smears. Correlation of monoclonality with grade and clinical behavior of cervical intraepithelial neoplasia. *Acta Cytol* 2003; 47:117-23.
- ⁹ Östor AG. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: the critical review. *Int J Gynecol Pathol* 1993;12:186-92.
- ¹⁰ Waxman AG. Guidelines for cervical cancer screening: history and scientific rationale. *Clin Obstet Gynecol* 2005; 48(1):77-97.

-
- ¹¹ Syrjänen KJ. Immunohistochemistry in assessment of molecular pathogenesis of cervical carcinogenesis. *Eur J Gynaecol Oncol* 2005; 26:5-19.
- ¹² Moreno V, Muñoz N, Bosch FX. Risk factors for progression of cervical intraepithelial neoplasm grade III to invasive cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1995; 4:459-67.
- ¹³ Lambert APF, Anschau F, Schmitt VM. P16^{INK4A} expression in cervical premalignant and malignant lesions. *Exp Mol Pathol* 2006; 80:192-6.
- ¹⁴ Dachez R. Interest of new biomarkers in cervical precancerous lesion management. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 2008; 37(Suppl 1):152-4.
- ¹⁵ Focchi GR, Silva ID, Nogueira-de-Souza NC, Dodo C, Oshima CT, Stavale JN. Immunohistochemical expression of p16(INK4a) in normal uterine cervix, nonneoplastic epithelial lesions, and low-grade squamous intraepithelial lesions. *J Low Genit Tract Dis* 2007; 11(2):98-104.
- ¹⁶ Nakagawa H, Sugano K, Fujii T, et al. Frequent detection of human papilloma viruses in cervical dysplasia by PCR single-strand DNA-conformational polymorphism analysis. *Anticancer Res* 2002; 22:1655-60.
- ¹⁷ Scheurer ME, Tortolero-Luna G, Adler-Storthz K. Human papillomavirus infection: biology, epidemiology, and prevention. *Int J Gynecol Cancer* 2005; 15:727-46.
- ¹⁸ Quan MB, Moy RI. The role of human papillomavirus in carcinoma. *J Am Acad Dermatol* 1991; 25:693-8.
- ¹⁹ Zur Hausen H, De Villers EM. Human papillomaviruses. *Annu Rev Microbiol* 1994 ; 48:427-47.
- ²⁰ Levine AJ. The tumor suppressor genes. *Annu Rev Biochem* 1993; 62:623-51.
- ²¹ Vousden KH. Interactions between papillomavirus proteins and tumor suppressor gene products. *Adv Cancer Res* 1994; 64:1-24.

-
- ²² Boyle DCM, Smith JR. Infection and cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Gynecol Cancer* 1999; 9:177-86.
- ²³ Alberts A, Bray D, Lewis J, et al. *Biologia molecular da célula*. 3ª edição. Porto Alegre: Artes Médicas; 1997.
- ²⁴ Thomson MW, McInnes RR, Wilard HF. *Thompson & Thompson – Genética Médica*. 5ª Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993.
- ²⁵ Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)* 2006; 110:525-41.
- ²⁶ Lu X & Feki A. Phenotypic features with p53 alterations related to human papillomavirus and prognostic evaluation in cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2006; 16:708-17.
- ²⁷ Matlashewski GJ, Tuck S, Pim D, et al. Primary structure polymorphism at amino acid residue 72 of human p53. *Mol Cell Biol* 1987; 7(2):961-3.
- ²⁸ Storey A, Thomas M, Kalita A, et al. Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus associated cancer. *Nature* 1998; 393:229-34.
- ²⁹ Van Duin M, Snijders PJ, Vossen MT, et al. J.M. Analysis of human papillomavirus type 16 E6 variants in relation to p53 codon 72 polymorphism genotypes in cervical carcinogenesis. *J Gen Virol* 2000; 81(pt 2):317-25.
- ³⁰ Zehbe I, Voglino G, Wilander E, et al. P53 codon 72 polymorphism and various human papillomavirus 16 E6 genotypes are risk factors for cervical cancer development. *Cancer Research* 2001; 61:608-11.
- ³¹ Sousa H, Santos AM, Pinto D, Medeiros R. Is the p53 codon 72 polymorphism a key biomarker for cervical cancer development? A meta-analysis review within European populations. *Int J Mol Med* 2007; 20:731-41.
- ³² Nishikawa A, Fujimoto T, Akutagawa N, et al. P53 polymorphism (codon-72) has no correlation with the development and the clinical features of cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2000; 10:402-7.

-
- ³³ Madeleine MM, Shera K, Schwartz SM, et al. The p53 Arg72Pro polymorphism, human papillomavirus, and invasive squamous cell cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9(2):225-7.
- ³⁴ 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. *Am J Pathol* 1998; 153:1741-8.
- ³⁵ Sakaguchi M, Fujii Y, Hirabayashi H, et al. Inversely correlated expression of p16 an Rb protein in non-small cell lung cancers: an immunohistochemical study. *Int J Cancer* 1996; 65:442-5.
- ³⁶ 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):423-5.
- ³⁷ Zhao P, Hu YC, Talbot I. Expressing patterns of p16 and CDK4 correlated to prognosis in colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003; 9(10):2202-6.
- ³⁸ Figarella-Branger D, Colin C, Coulibaly B, et al. Histological and molecular classification of gliomas. *Rev Neurol (Paris)* 2008; 164(6-7):505-15.
- ³⁹ 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. *Pathol Int* 2002; 52:375-83.
- ⁴⁰ Pietruszewska W, Durko M, Kobos J. Alterations of cell cycle regulation proteins: Rb, p21 and p16 in laryngeal cancer. *Otolaryngol Pol* 2007; 61(6):951-7.
- ⁴¹ Brock MV, Hooker CM, Ota-Machida E, et al. DNA methylation markers and early recurrence in stage I lung cancer. *N Engl J Med* 2008; 358(11):1118-28.
- ⁴² Doebritz MVK. Searching for new biomarkers for cervical cancer: molecular accidents and the interplay of papillomavirus oncogenes and epithelial differentiation Part I and II. *Papillomavirus Report* 2002; 13(2):35-74.

-
- ⁴³ Doebritz MVK. New markers for cervical dysplasia to visualize the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. *Eur J Cancer* 2002; 38: 2229-42.
- ⁴⁴ 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.
- ⁴⁵ Samama B, Schaeffer C, Boehm N. P16 expression in relation to human papillomavirus in liquid-based cervical smears. *Gynecol Oncol* 2008; 109(2):285-90.
- ⁴⁶ Branca M, Ciotti M, Giorgi C, ET AL. Predicting high-risk human papillomavirus infection, progression of cervical intraepithelial neoplasia, and prognosis of cervical cancer with a panel of 13 biomarkers tested in multivariate modeling. *Int J Gynecol Pathol* 2008; 27(2):265-73.
- ⁴⁷ Cho NH, Kim YT, Kim JW. Alteration of cell cycle in cervical tumor associated with human papillomavirus – cyclin-dependent kinase inhibitors. *Yonsei Med J* 2002; 43(6):722-8.
- ⁴⁸ Mulvany NJ, Allen DG, Wilson SM. Diagnostic utility of p16(INK4A): a reappraisal of its use in cervical biopsies. *Pathology* 2008; 40(4):335-44.
- ⁴⁹ Ho CM, Chien TY, Huang SH, Wu CJ, Shih BY, Chang SL. Multivariate analysis of the prognostic factors and outcomes in early cervical cancer patients undergoing radical hysterectomy. *Gynecol Oncol* 2004; 93:458-64.
- ⁵⁰ Ikuta A, Saito J, Mizokami T, et al. Correlation p53 expression and human papilloma virus deoxyribonucleic acid with clinical outcome in early uterine cervical carcinoma. *Cancer Det Prev* 2005; 29:528-36.
- ⁵¹ Benedet JL, Bender H, Jones H 3rd, Ngan HY, Percorelli S. FIGO staging classifications and clinical practice guidelines in the management of gynecologic cancers. FIGO Committee on Gynecologic Oncology. *Int J Gynaecol Obstet.* 2000; 6(1):20-30.
- ⁵² 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(1):167-71.

-
- ⁵³ Ara S, Lee PSY, Hansen MF, Saya H. Codon 72 polymorphism of the *TP53* gene. *Nucleic Acid Res.* 1990; 18(16):4961.
- ⁵⁴ Koss LG. Concept of genesis and development of carcinoma of the cervix. *Obstet Gynecol Surv* 1969; 24:853.
- ⁵⁵ Gustaffson L, Adami HO. Cytological screening for cancer of the uterine cervix in Sweden evaluated by identification and simulation. *Br J Cancer* 1990; 61:901-8.
- ⁵⁶ Waggoner SE. Cervical cancer. *The Lancet* 2003; 361:221-25.
- ⁵⁷ DeVita VT, Hellman S, Rosenberg AS. *Cancer: principles and practice of oncology.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005. 2898p.
- ⁵⁸ DiSaia PJ, Creasman WT. *Clinical Gynecologic Oncology.* 7th ed. St. Louis, Mo: JB Mosby and Company; 2007.
- ⁵⁹ Munoz N, Mendez F, Posso H, et al. Incidence, duration, and determinants of cervical human papillomavirus infection in a cohort of Colombian women with normal cytological results. *J Infect Dis* 2004; 190:2077-98.
- ⁶⁰ Franco EL, Duarte-Franco E, Ferenczy A. Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. *CMAJ* 2001; 164:1017-25.
- ⁶¹ Schiffman MH, Castle P. Epidemiologic studies of a necessary causal risk factor: human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *J Nat cancer Int* 2003; 95(6):E2 1-8.
- ⁶² Wang SS, Trunk M, Schiffman M, et al. Validation of p16^{INK4A} as a marker for oncogenic human papillomavirus infection in cervical biopsies from a population-based cohort in Costa Rica. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13:1355-60.
- ⁶³ Anschau F. O polimorfismo no códon 72 do gene TP53 e o risco para câncer de colo uterino associado ao papilomavírus humano. Porto Alegre (RS):PUCRS (Dissertação de Mestrado); 2002.

-
- ⁶⁴ Yim EK, Park JS. Role of proteomics in translational research in cervical cancer. *Expert Rev Proteomics* 2006; 3:21-36.
- ⁶⁵ Von Knebel-Döberitz M. New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. *Eur J Cancer* 2002; 38:2229-42.
- ⁶⁶ Eleutério JJr, Giraldo PC, Gonçalves AK, Cavalcante DIM, et al. Prognostic markers of high-grade squamous intraepithelial lesions: the role of p16^{INK4a} and high-risk human papillomavirus. *Acta Obstet Gynecol* 2007; 86:94-8.
- ⁶⁷ Ishikawa M, Fuji T, Saito M, et al. Overexpression of p16^{INK4a} as an indicator for human papillomavirus oncogenic activity in cervical squamous neoplasia. *Int J Gynecol Cancer* 2006; 16:347-53.
- ⁶⁸ Guedes AC, Brenna SMF, Coelho SAS, Martinez EZ, Syrjänens KJ, Zeferino LC. P16^{INK4a} expression does not predict the outcome of cervical intraepithelial neoplasia grade 2. *Int J Gynecol Cancer* 2007; 17:1099-103.
- ⁶⁹ Carozzi F, Cecchini S, Confortini M, et al. Role of p16^{INK4a} expression in identifying CIN2 or more severe lesions among HPV-positive patients referred for colposcopy after abnormal cytology. *Cancer* 2006; 108:119-23.
- ⁷⁰ Yildiz IZ, Usubütün A, Firat P, Ayhan A, Küçükali T. Efficacy of immunohistochemical p16 expression and HPV typing in cervical squamous intraepithelial lesion grading and review of the p16 literature. *Pathol Res Pract* 2007; 203:445-9.
- ⁷¹ Ekalaksananan T, Pientong C, Sriamporn S, et al. Usefulness of combining testing for p16 protein and human papillomavirus (HPV) in cervical carcinoma screening. *Gynecol Oncol* 2006;103:62-6.
- ⁷² Bragança JF, Sarian LO, Pitta DR, et al. Expression of p16INK4a and cervical infection with high-risk human papillomavirus are not related to p53 activity in cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Gynecol Cancer* 2007 (In press).

-
- ⁷³ Woodman CB, Collins SI, Young LS. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer* 2007; 7:11-22.
- ⁷⁴ Branca M, Ciotti M, Santini D, et al. P16INK4a expression is related to grade of CIN and high-risk human papillomavirus but does not predict virus clearance after conization or disease outcome. *Int J Gynecol Pathol* 2004; 23:354-65.
- ⁷⁵ Murphy N, Ring M, Killalea AG, et al. p16INK4A as a marker for cervical dyskaryosis: CIN and cGIN in cervical biopsies and Thinprep TM smears. *J Clin Pathol* 2003; 56:56-63.
- ⁷⁶ Masumotto N, Fujii T, Ishikawa M, Saito M, Nozawa S. p16^{INK4a} overexpression and human papillomavirus infection in small cell carcinoma of the uterine cervix. *Hum Pathol* 2003; 34:778-83.
- ⁷⁷ Dong Y, Walsh MD, McGuckin MA, et al. Increased expression of cyclin-dependent kinase inhibitor 2 (CDKN2A) gene product P16INK4A in ovarian cancer is associated with progression and unfavourable prognosis. *Int J Cancer* 1997; 74(1):57-63.
- ⁷⁸ Halvorsen OJ, Hostmark J, Haukass S, Hoisaeter PA, Akslen LA. Prognostic significance of p16 and CDK4 proteins in localized prostate carcinoma. *Vancer* 2000; 88(2):416-24.
- ⁷⁹ Alonso SR, Ortiz P, Pollan M, et al. Progression in cutaneous malignant melanoma is associated with distinct expression profiles: a tissue microarray-based study. *Am J Pathol* 2004; 164(1):193-203.
- ⁸⁰ Gerdes B, Ramaswamy A, Ziegler A, et al. P16INK4a is a prognostic marker in resected ductal pancreatic cancer: an analysis of p16INK4a, p53, MDM2, and Rb. *Ann Surg* 2002; 235(1):51-9.
- ⁸¹ Bahnassy AA, Zekri AR, Alam El-Din HM, et al. The role of cyclins and cyclins inhibitors in the multistep process of HPV-associated cervical carcinoma. *J Egypt Natl Canc Inst* 2006; 18(4):292-302.
- ⁸² Hariri J, Oster A. The negative predictive value of p16 to assess the outcome of cervical intraepithelial neoplasia 1 in the uterine cervix. *Int J Gynecol Pathol* 2007; 26:223-8.

⁸³ Nam EJ, Kim JW, Kim SW, ET al. The expression of the Rb pathway in cervical intraepithelial neoplasia; predictive and prognostic significance. *Gynecol Oncol* 2007; 104:207-11.

⁸⁴ Costa S, Simone PD, Venturoli S, et al. Factors predicting human papillomavirus (HPV) clearance in cervical intraepithelial neoplasia (CIN) lesions treated by conization. *Gynecol Oncol* 2003; 90:358-65.

⁸⁵ Alcadious NN, Sutton C, Mandal D, et al. Persistent human papillomavirus infection and smoking increased risk of failure of treatment of cervical intraepithelial neoplasia (CIN). *Int J Cancer* 2002; 98:435-46.

9 ANEXOS

9.1 ANEXO 1

Versão do trabalho em inglês e documentação de envio para publicação em revista científica QUALIS A internacional.

Transition of cervical carcinoma *in situ* to invasive cancer: role of p16^{INK4a} expression in progression and in recurrence

Fernando Anschau^{a,b,c,*}, Virgínia Minghelli Schmitt^{d,e}, Ana Paula Franco Lambert^e, Manoel Afonso Guimarães Gonçalves^{c,f}, Denise Cantarelli Machado^g.

^a Serviço Integrado de Ginecologia de Cachoeirinha e Alvorada – SIGAC; Instituto de Cardiologia – Fundação Universitária de Cardiologia (IC-FUC) de Porto Alegre.

^b Faculdade de Enfermagem e Nutrição Nossa Senhora de Fátima – Caxias do Sul.

^c Serviço de Ginecologia do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – PUCRS.

^d Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia; PUCRS.

^e Laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Pesquisas Biomédicas; PUCRS.

^f Faculdade de Medicina da PUCRS.

^g Laboratório de Pneumologia do Instituto de Pesquisas Biomédicas; PUCRS.

*** Address for correspondence:**

Av. Ipiranga, 6690, cj.:217.

Jardim Botânico, Porto Alegre, RS – Brasil

CEP: 90 610 000

Fone (FAX): 51 3339 2222

e-mail: anschau@terra.com.br

Abstract

To investigate the expression of p16^{INK4a} in cervical carcinoma and its relation to the transition of carcinoma *in situ* to invasive carcinoma, and its role in recurrence of cervical lesions as well, a series of 90 patients with cervical carcinoma (49 with *in situ* lesion and 41 with invasive lesion) were selected from July 2001 and September 2002. Groups with *in situ* and invasive lesions were paired for a series of risk variables for cervical cancer and followed up for 60 months. The follow-up visits occurred every 6 months in the first three years and annually up to the fifth year. It was observed that 87.9% of the patients with invasive lesion showed overexpression of p16^{INK4a}, in comparison with 37.6% of those with *in situ* lesion (X^2 : 13.68; 2 df; $p= 0.0002$; OR: 12.08), demonstrating overexpression of p16^{INK4a} as a risk of invasion of the basal layer by dysplastic cells. We also observed an association between overexpression of p16^{INK4a} and staging of cancer (X^2 : 18.38; 6 df; $p= 0.0003$). A prospective analysis, when controlled for interaction with cervical lesion groups (by Cox regression), demonstrated a risk of recurrence of 4.83 times attributed to overexpression of p16^{INK4a}, albeit not statistically significant ($p= 0.14$).

Key words: expression of p16^{INK4a}, cervical carcinoma, recurrence, risk factor, immunohistochemistry.

Introduction

Natural history of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) has three possible outcomes: regression, persistence or progression. About 60% of intraepithelial neoplasias of grade 1 (CIN I) regress, 30% persist, 10% progress to CIN 3 and 1% progress to cancer. The possible outcomes corresponding to CIN 2 are 40%, 40%, 20% and 5%, respectively. The rate of regression for CIN 3 or carcinoma *in situ* is 33% and of progression to invasion is over 12% (Östor, 1993).

Despite knowing that the progression to cervical cancer starting with an *in situ* lesion should be time-dependent, the search for markers of this progression is important for the understanding of the dynamics of all pre-malignant alterations. Considering the low age range in which cervical alterations are most prevalent, pre-malignant knowledge of the risk of progression for each patient could provide a platform for managing these cervical alterations in the most conservative manner.

Various markers capable of predicting the outcome of precursor lesions of cervical cancer have been studied during the last years (Syrjänen, 2005; Moreno et al., 1995). One of the most promising candidates is tumor suppressor protein p16^{INK4a} which shows overexpression in pre-malignant and malignant cervical lesions (Lambert et al., 2006). This probably occurs due to a persistent infection by human papillomavirus of high risk (hr-HPV), such as HPV16 and 18, in the uterine cervix. Hr-HPV are essential factors in the carcinogenesis of the uterine cervix. In fact, HPV DNA has been greatly identified in a series of cervical carcinomas and pre-malignant lesions (Nakagawa et al., 2002). Hr-HPV infect cervical epithelial cells, and their oncoproteins E6 and E7 bind to and inactivate host proteins that regulate the cell cycle, p53 and pRb, respectively.

Tumor suppressor protein p53 has three main functions: control of cell cycle, activation of DNA repair and regulation of apoptosis. p53 acts as the “guardian of the genome,” and in the event of extensive DNA damage, induces repair or apoptosis, preventing the proliferation of cells with genetic mutations. The inactivation of p53 by the action of protein E6 of hr-HPV results in an effect similar to that of mutations of the *TP53* gene, with respect to the function of p53 (Lu and Feki, 2006).

The *TP53* gene which codes p53 protein, shows a polymorphism in codon 72 which determines the expression of an arginine (Arg) or proline (Pro). Despite the two allele variants being equivalent from a functional perspective, not interfering with the activity of the protein, it has been suggested that patients homozygous for Arg (Arg/Arg p53) have a greater risk of developing cervical cancer associated with HPV (Matlashewki et al., 1987; Storey et al., 1998; Van Duin et al., 2000; Zehbe et al., 2001). However, studies have not found evidence of a correlation between polymorphism in codon 72 of the *TP53* gene and risk for HPV-positive cervical cancer (Sousa et al., 2007; Nishikawa et al., 2000; Madeleine et al., 2000).

The inactivation of pRb has an impact on the regulation of genes involved in the control of the progression of the cell cycle, allowing the cell to progress to S phase, bypassing the G1/S checkpoint, even under conditions where this passage should be blocked (Sano et al., 1998). p16^{INK4a} inhibits the cyclin-dependent kinases that cause the phosphorylation and consequent inactivation of pRb associated with G1/S progression. An inverse relation has been reported between the presence of functional pRb and overexpression of p16^{INK4a} (Sakaguchi et al., 1996).

In uterine carcinoma, prognostic factors such as clinical staging, lymph node metastases and parametrial involvement are already well known (Ho et al., 2004; Ikuta et al., 2005). However, the critical point at which transition of carcinoma *in situ* to invasive carcinoma occurs

is still not clearly established. In this study, we investigated the relation between the expression of p16^{INK4a} and cervical carcinoma *in situ* and invasive carcinoma, and followed-up on the development of these nosological entities, relating it to expression of p16^{INK4a}.

Material and methods:

A series of 90 patients treated in the Pelvic Oncology Outpatient Clinic of the Gynecology Service of Hospital São Lucas of PUCRS, in whom a colposcopic examination and biopsy of the uterine cervix detected a carcinoma, were selected for this prospective study. The following procedures were conducted in all patients, after they signed an informed consent form: an anamnesis, gynecologic examination, colposcopy, collection of ecto- and endocervical material for cytology, study of HPV DNA and of polymorphism in codon 72 of *TP53* by polymerase chain reaction, besides biopsy of the uterine cervix for histological diagnosis and determination of expression of protein p16^{INK4a}.

Recruitment occurred in the period of July 2001 to September 2002. The follow-up visits were made every 6 months in the first three years and annually up to the fifth year. The patients were followed up for 60 months (mean of 54.9 months). The visits consisted of a gynecologic examination, cervical cytopathology, colposcopy and cervical biopsy with evidence of a recurrent lesion or progression of disease.

All patients received standard treatment recommended for each stage of the International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) (Benedet et al., 2000): 67 (74.5%) only surgery, 4 (4.5%) surgery and radiotherapy, 12 (13.3%) radiotherapy and chemotherapy, and 7 (7.7%) surgery with radiotherapy and chemotherapy. None of the patients were submitted to only surgical treatment showed compromised surgical margins. Clinical staging of cervical carcinoma

was determined by the FIGO classification. Therefore, 49 (54%) patients were found in stage 0 (carcinoma *in situ*), 19 (21%) in stage I (1 IA and 18 IB), 11 (12%) in stage II (4 IIA and 7 IIB) and 11 (12%) in stage III (2 IIIA and 9 IIIB).

Based on histological diagnosis, patients were classified into two groups: those with *in situ* cervical lesion and those with invasive cervical lesion. Patients were excluded in cases of having prior treatment for intraepithelial neoplasia or cervical cancer and those who undergone previous radiotherapeutic treatment in the pelvic region. Mean age of patients was 41 years (ranging from 21 to 75 years); for those with carcinoma *in situ* mean age was 39 years while for those with cervical invasion by malignant cells was 43.3 years. Eleven patients of the group with invasive lesion died in the follow-up period as a result of their disease. There was no death among patients of the group with *in situ* lesion.

HPV DNA

Endo- and ectocervical cells for determination of human papillomavirus DNA by polymerase chain reaction (PCR) were collected with a cytobrush. This material was suspended in 10 ml of TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.5; 1mM EDTA), and stored at -20°C until DNA extraction. Specimens for human papillomavirus DNA assay were thawed and centrifuged at 5200 rpm, under refrigeration, and the pellet was resuspended in 500µl of TE. An aliquot of 100µl was treated with 100µl of proteinase K/TE-50 (200 µg/ml of Gibco proteinase K “DNase/RNase free,” 2% Tween 20, 1 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8.5) and incubated overnight at 37°C. After inactivation at 94 °C for 10 min, samples were deproteinized and stored at -20°C until PCR analysis.

Total extracted DNA from the specimens was submitted to amplification by PCR, using consensus primers: My09 (5' .. CGT CC^A/_c AA^A/_g GGA ^A/_TAC TGA TC .. 3') and My11 (5' ..

GC^A/_C CAG GG^A/_T CAT AA^C/_T AAT GG .. 3') complementary to the region L1 of the viral genome. Amplification conditions were: 95°C for 5 min; 40 cycles of 95°C for 1 min, 55°C for 1 min, 72°C for 1 min; 72°C for 10 min. All positive specimens were typed for HPV 16, 18, 31 and 33, using type-specific primers complementary to E6 region of the viral genome. Amplification conditions and primers used were based on methods described by Cuzick et al (Cuzick et al., 1994). PCR products were analysed by 2% agarose gel electrophoresis in TAE buffer, containing 1 µg/mL of ethidium bromide, and observed under UV light.

The patients positive for any of the HPV types described above (HPV 16, 18, 31 or 33) were classified as positive for high risk HPV (Hr-HPV). Patients positive for more than one type of HPV were classified as “having multiple infections by HPV.”

p53 polymorphism

Determination of Arg/Pro polymorphism was carried out by PCR with the primers 72S (5'.... TTG CCG TCC CAA GCA ATG GAT GA ... 3') and 72A (5'... TCT GGG AAG GGA CAG AAG ATG AC ... 3'). Patients homozygous for the allele variant arginine at position 72 of the *TP53* gene were characterized as having genotype Arg/Arg p53, while those homozygous for the allele variant proline at position 72 of the *TP53* gene were termed Pro/Pro p53 and the heterozygotes, Arg/Pro p53 (Ara et al., 1990).

Studies on p16^{INK4a}

Paraffin embedded samples were submitted to immunohistochemical analysis utilizing a specific primary antibody for p16^{INK4a}. As some paraffin embedded blocks from study patients were not located or inadequate for immunohistochemical analysis (probably due to storage age or not appropriate embedding technique), p16^{INK4a} immunohistochemical analysis was performed in

57 specimens. Paraffin blocks were cut and sections fixed to slides prepared with poly-L-lysine. The sections were treated sequentially with xylol, absolute ethanol, 90% ethanol, 80% ethanol, 70% ethanol and distilled water for deparaffinization. Endogenous peroxidase was blocked by treating the sample with 3% hydrogen peroxide for 10 min. Slides were incubated for an hour with anti-p16 monoclonal antibody (Novocastra Laboratories, Ltd.) followed by treatment with biotin-labeled secondary antibody (Novostain universal detection kit, Novocastra Laboratories, Ltd.) for 10 min and streptavidin-peroxidase for another 10 min. Afterward, the substrate diaminobenzidine (DAB) was added, and slides were counterstained with hematoxylin (slide immersed for 15 s).

Slides were analyzed with a light microscope and classified as negative if no staining was observed; (+), if less than 5% of cells were stained; (++) , if 5 to 50% of cells were stained, and (+++), if more than 50% of cells were stained. For statistical analyses, samples with (+++) for p16^{INK4a} expression were referred as “overexpression present” and all other classifications as “overexpression absent”.

This investigation was first approved by the Committee of Ethics in Research of the Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Statistical analysis

Odds ratio (OR) with a 95% confidence interval (95% CI) was calculated to examine the strength and precision of the association between overexpression of p16^{INK4a} and risk of invasion of the basal layer of the cervical epithelium by dysplastic cells. The chi-squared test (X^2) was used to examine the differences in the proportions of risk factors for cervical cancer. Univariate analysis of disease-free survival and recurrence in follow-up was based on the Kaplan-Meier

method, using the log-rank test for comparing the groups. Multivariate analysis (to control confounding factors of the sample) was performed by calculation of Cox's regression (Cox's proportional hazards model).

Results:

A series of clinical and molecular risk factors for cervical cancer, such as age, skin color, number of sexual partners, use of oral contraception, age at menarche, age at first sexual intercourse, pregnancies, deliveries, age at first childbirth, smoking, school education level, marital status, regular sex partner, presence of high risk HPV DNA (HPV 16, 18, 31 and 33), multiple infections by HPV and polymorphism in codon 72 of *TP53* gene, were investigated in the groups with *in situ* lesion and invasive lesion. As observed in Table 1, none of these risk factors showed a significant difference between the groups, demonstrating a homogeneous distribution (paring) of such factors in the patients with *in situ* lesion and invasive lesion.

Among the patients with *in situ* cervical lesion, we observed the following characteristic of the expression of p16: 2 patients were negative, 6 were (+) for expression, 7 were (++) and 9 were (+++). In the group with invasive lesion, 4 patients showed (++) and 29 patients (+++) expression of p16 (X^2 : 18.38; 3 degrees of freedom (df); $p= 0.0003$) (Table 2).

When analyzing both groups of patients regarding p16^{INK4a} expression as a dichotomized variable, the majority of the group with invasive lesion (29/33 patients) showed overexpression, in contrast to the group with *in situ* lesion where most of the patients (15/24) did not present overexpression of p16^{INK4a}. This association was statistically significant (X^2 : 13.68; 2 df; $p= 0.0002$) with an odds ratio (OR) of 12.08 ($2.74 < OR < 58.43$) (Table 3).

In Table 4, we can identify an association between p16^{INK4a} overexpression and staging of cervical cancer ($X^2:18,69$; 6 df; $p=0.0047$), i.e., the higher the staging, the greater the frequency of overexpression of p16^{INK4a}. Table 5 shows that there was also an association between invasion of the basal layer of the uterine cervix by tumor cells and the recurrence index. Univariate analysis (Kaplan-Meier) of recurrence demonstrated a significant difference in disease-free survival (DFS) between the groups (*in situ* lesion and invasive lesion) as well as between DFS and overexpression of p16^{INK4a}. A patient with invasive lesion showed 2.8 times the risk of recurrence than one with *in situ* lesion. Patients with overexpression of p16^{INK4a} had a risk of recurrence 10.01 times than those without this factor (HR: 10.01; $p=0.004$). When controlled for interaction with the groups with cervical lesion (Cox's regression), this risk falls to 4.83, but does not demonstrate statistical significance ($p=0.14$) (Table 5).

Table 6 presents the Kaplan-Meier univariate analysis for DFS according to clinical staging. We observed a significant difference in DFS between stages III (IIIa or IIIb) and 0. However, despite showing a tendency of increasing risk of recurrence between initial stages and stage 0, this difference was not significant ($p=0.2$ for stages Ia or Ib and $p=0.9$ for stages IIa or IIb). In the analysis of Cox's regression, the relation between exposure factor and confounding factor was also controlled by inclusion of the interaction of the terms "expression de p16^{INK4a}" and "clinical stage according to FIGO" in the model. This analysis allowed us to detect a strong association between staging and DFS ($p=0.001$), independent of p16^{INK4a} expression. A risk of 3.1 times for a recurrence among patients with overexpression of p16^{INK4a} was revealed, independent of clinical stage, albeit not statistically significant ($p=0.20$).

Tables
Table 1 – Risk variable x Group

Risk variable	Group (Cervical carcinoma)		p value
	Lesion, <i>in situ</i> (n:49)	Lesion, invasive (n:41)	
	Value	Value	
Age mean (years)	39.0	43.3	0.054
Skin color (white)	73.5%	80.5%	0.433
Mean number of sexual partners	3	2.56	0.617
Use of oral contraception	73.5%	61.0%	0.200
Mean age at menarche (years)	13.1	12.7	0.204
Mean age of 1 st sexual intercourse (years)	16.6	16.9	0.605
Mean number of pregnancies	3.5	4.3	0.132
Mean number of deliveries	2.8	3.7	0.054
Mean number normal deliveries	2.6	3.2	0.959
Mean age at first delivery (years)	20.3	19.8	0.668
Smoker	55.1%	46.3%	0.400
Presence of high risk HPV DNA	77.6%	85.4%	0.345
Multiple infection by HPV	34.0%	42.0%	0.534
School education level – Incomplete primary education,	59.2%	65.9%	0.111
Marital status – Married	67.3%	78.0%	0.253
With regular sex partner	77.6%	82.9%	0.711
Arg/Arg p53	50.0%	58.0%	0.321

Table 2 – Group x Expression of p16^{INK4a}

Group	Expression of p16 ^{INK4a}				Total (%)
	Negative (%)	+ (%)	++ (%)	+++ (%)	
Invasive lesion	0 (0)	0 (0)	4 (12.1)	29 (87.9)	33 (100)
<i>in situ</i> lesion	2 (8.3)	6 (25)	7 (29.1)	9 (37.6)	24 (100)
Total	2 (3.5)	6 (10.5)	11 (19.3)	38 (66.7)	57 (100)

P= 0.0003

X^2 :18.38

Table 3 – Group x Overexpression of p16^{INK4a}

Group	Overexpression of p16 ^{INK4a} (+++)		Total
	Present	Absent	
Carcinoma, invasive	29	4	33
Carcinoma <i>in situ</i>	9	15	24
Total	38	19	57

p = 0.0002

X^2 (Yates): 13.68

OR: 12.08 (2.74<OR<58.43)

Table 4 – Overexpression of p16^{INK4a} X FIGO staging

Overexpression of p16 ^{INK4a}	FIGO staging							Total
	0	IA	IB	IIA	IIB	IIIA	IIIB	
Present	9	6	6	1	6	2	8	38
Absent	15	0	2	1	0	0	1	19
Total	24	6	8	2	6	2	9	57

P = 0.0047

X^2 : 18.69

Table 5 – Disease-free survival

	n	Recurrence	Disease-free survival (%)								HR	p	HR*	p*
			6 months	12 months	18 months	24 months	30 months	36 months	48 months	60 months				
Groups														
Lesion, <i>in situ</i>	49	8 (16.3%)	97.9	93.8	87.7	83.7	83.7	83.7	83.7	83.7	Reference	0.008		
Lesion, invasive	41	17 (41.4%)	87.8	85.3	78.0	68.2	65.8	63.4	58.5	58.5	2.8 (1.33 to 6.75)			
Overexpression de p16^{INK4a}														
Absent	19	1 (5.2%)	94.6	94.6	94.6	94.6	94.6	94.6	94.6	94.6	Reference	0.004	4.83 (0.57 to 40.52)	0.14
Present	38	18 (47.3%)	92.1	89.4	81.5	65.7	65.7	65.7	62.7	62.7	10.01 (1.55 to 11.1)			

HR = hazard ratio

HR* = hazard ratio adjusted (controlled for interaction with the groups)

P = p value

P* = adjusted p value (controlled for interaction with the groups)

Table 6 – Disease-free survival– influence of staging and p16^{INK4a} expression

	n	Recurrence	Disease-free survival (%)								HR	P	HR*	p*	
			6 months	12 months	18 months	24 months	30 months	36 months	48 months	60 months					
FIGO stage															
0	49	8 (16.3%)	97.9	93.8	87.7	83.7	83.7	83.7	83.7	83.7	Reference				
Ia or Ib	19	6 (31.5%)	94.7	94.7	89.4	89.4	84.2	78.9	68.5	68.5	1.9 (0.66 to 7.03)	0.2			
IIa or IIb	11	2 (18.1%)	100	100	100	81.8	81.8	81.8	81.8	81.8	1.0 (0.21 to 5.42)	0.9			
IIIa or IIIb	11	9 (81.8%)	63.6	54.5	36.3	18.2	18.2	18.2	18.2	18.2	8.1 (13.79 to 284.74)	<0.0001	2.2 (1.37 to 3.62)	0.001	
Overexpression of p16^{INK4a}															
Absent	19	1 (5.2%)	94.6	94.6	94.6	94.6	94.6	94.6	94.6	94.6	Reference				
Present	38	18 (47.3%)	92.1	89.4	81.5	65.7	65.7	65.7	62.7	62.7	10.01 (1.55 to 11.1)	0.004	3.9 (0.47 to 32.09)	0.20	

HR = hazard ratio

HR* = adjusted hazard ratio (controlled for interaction FIGO staging/ p16^{INK4a})

P = p value

P* = adjusted p value (controlled for interaction FIGO staging / p16^{INK4a})

Discussion

The increasing identification of young patients with cancer of the uterine cervix leads us to speculate that the development of this disease is determined by various factors besides time course. In this study, we found similar mean ages among patients with *in situ* lesion (39 years) and those with invasive lesion (43.3 years) ($p=0.054$). This age pairing minimized the age influence as a confounding factor in the transition of carcinoma *in situ* to invasive carcinoma. We also found both groups to be similar in relation to a series of social and demographic variables and risk factors for cervical cancer (Table 1). Therefore, we had two groups differing only in the risk of invasion of basal layer by cervical dysplastic cells. In the search for the responsible factor for this invasion, we investigated the expression of p16^{INK4a}.

p16^{INK4a} expression has already been proposed as a diagnostic and prognostic marker of pre-malignant and malignant cervical lesions, with discordant results in some studies (Eleuterio et al., 2007; Ishikawa et al., 2006; Guedes et al., 2007; Carozzi et al., 2006; Yildiz et al., 2007; Ekalaksananan et al., 2006; Bragança et al., 2007). It has also been associated, albeit with disparate results, with the diagnosis of infection by Hr-HPV and with their oncogenic activity (Ishikawa et al., 2006; Branca et al., 2004; Samama et al., 2008). However, the present study is the first to investigate the expression of p16^{INK4a} as a predictor of invasion of the basal layer by cervical dysplastic cells.

p16^{INK4a} expression was identified in 91.7% of the *in situ* lesions and in 100% of the invasive lesions (Table 2). Recent studies also demonstrated high rates of expression of p16^{INK4a},

ranging from 80% to 92%, among patients with high-grade pre-malignant cervical lesions (Eleuterio et al., 2007; Branca et al., 2004). An Italian study demonstrated that overexpression of p16^{INK4a} is a risk factor for CIN3 and/or cancer of the uterine cervix, with an OR of 4.07 (Branca et al., 2004). However, this latter study did not show risk of invasive lesion attributed to a patient with carcinoma *in situ* and overexpression of p16^{INK4a}, besides detecting a significant difference in age among patients with pre-malignant versus malignant cervical lesions.

In pairing the groups with cervical lesion *in situ* and invasive, we isolated important confounding factors such as time (age), infection by HPV, smoking, polymorphism of codon 72 of the *TP53* gene, multiple sex partners and demographic variations, and determined a significant association between overexpression of p16^{INK4a} and invasive carcinoma. A patient with an *in situ* cervical lesion and overexpression of p16^{INK4a} would have a 12.08 times risk of showing invasion of the basal layer by dysplastic cells when compared to that without overexpression of p16^{INK4a} (X^2 :13.68; p =0.0002; OR:12.08).

Previous studies have demonstrated an increase in the expression of p16^{INK4a} associated with higher grade of pre-malignant and malignant cervical lesions, suggesting an increase in the disruption of the cell cycle caused by HPV (Lambert et al., 2006; Ishikawa et al., 2006; Yildiz et al., 2007; Branca et al., 2004). Our data are in line with those findings, that is, the higher the staging of cervical cancer, the greater the frequency of overexpression of p16^{INK4a} (Table 4). The overexpression of p16^{INK4a} has been associated with HPV and inversely correlated with the function of pRb. In fact, protein E7 of HPV is responsible for the increased levels of p16^{INK4a}, which reflect an uncontrolled cell cycle (Masumotto et al., 2003).

Some authors have suggested that the lack of treatment of precursor lesions of cervical cancer and the rate of recurrence are intimately related to the persistence of infection by Hr-HPV

(Costa et al., 2003; Alcadious et al., 2002). Thus, overexpression of p16^{INK4a}, acting as a marker of the oncogenic activity of HPV, could be a predictor of disease-free survival or recurrence of carcinoma *in situ* and extrapolated to invasive lesions. In this study, the analysis of disease-free survival is based on 79 patients who completed follow-up, taking into consideration that there were 11 deaths in the group with invasive lesion. Of the group with *in situ* lesion, 16.3% of patients showed recurrence, while in the group with invasive lesion this percentage was 41.4%. The invasion of the basal membrane by dysplastic cells (group with invasive lesion) showed a risk of recurrence 2.8 times that of the group with *in situ* lesion. These findings confirm data from the literature regarding prognostic factors in cervical cancer (Ho et al., 2004).

The prognostic value of p16^{INK4a} expression in pre-malignant lesions and in carcinoma of the uterine cervix is still not well established. In our study univariate analysis (Kaplan-Meier) of the occurrence of overexpression of p16^{INK4a} demonstrated a risk of 10.01 times for a recurrence in a period of 60 months in our sample (HR:10.01; p=0.004). This risk diminished to 4.83 and 3.9 when adjusted in multivariate analysis (Cox's regression) for the groups and for clinical staging, respectively. However, these associations had no statistical significance (p=0.14 and p=0.20, respectively). In this model of multivariate analysis, as suggested by other authors (Branca et al., 2004), only clinical staging was shown to be a predicting factor independent of recurrence (p=0.004).

Based on data reported here, we can conclude that there is a statistically significant association between overexpression of p16^{INK4a} and invasion of the basal layer by dysplastic cells. This factor is probably a determinant in the transition of the *in situ* cervical lesion to an invasive one. The overexpression of p16^{INK4a} did not show a significant relation with prognosis of cervical lesions, but rather a direct and proportional association with clinical staging. Therefore, this study

corroborates earlier findings of p16^{INK4a} overexpression being important and a critical point in the transition of carcinoma *in situ* to invasive carcinoma of the uterine cervix.

References

- Alcadiou, N.N., Sutton, C., Mandal, D., et al., 2002. Persistent human papillomavirus infection and smoking increased risk of failure of treatment of cervical intraepithelial neoplasia (CIN). *Int. J. Cancer* 98, 435-446.
- Ara, S., Lee, P.S.Y., Hansen, M.F., Saya, H., 1990. Codon 72 polymorphism of the TP53 gene. *Nucleic Acid Res.* 18(16), 4961.
- Benedet, J.L., Bender, H., Jones, H. 3rd., Ngan, H.Y., Percorelli, S., 2000. FIGO staging classifications and clinical practice guidelines in the management of gynecologic cancers. FIGO Committee on Gynecologic Oncology. *Int. J. Gynaecol. Obstet.* 6(1), 20-30.
- Bragança, J.F., Sarian, L.O., Pitta, D.R., et al., 2007. Expression of p16(INK4a) and cervical infection with high-risk human papillomavirus are not related to p53 activity in cervical intraepithelial neoplasia. *Int. J. Gynecol. Cancer* (in press).
- Branca, M., Ciotti, M., Santini, D., et al., 2004. P16INK4a expression is related to grade of CIN and high-risk human papillomavirus but does not predict virus clearance after conization or disease outcome. *Int. J. Gynecol. Pathol.* 23, 354-365.
- Carozzi, F., Cecchini, S., Confortini, M., et al., 2006. Role of p16INK4a expression in identifying CIN2 or more severe lesions among HPV-positive patients referred for colposcopy after abnormal cytology. *Cancer* 108, 119-123.
- Costa, S., Simone, P.D., Venturoli, S., et al., 2003. Factors predicting human papillomavirus (HPV) clearance in cervical intraepithelial neoplasia (CIN) lesions treated by conization. *Gynecol. Oncol.* 90, 358-365.

-
- Cuzick, J., Terry, G., Ho, L., Hollingworth, T., Anderson, M., 1994. Type-specific human papillomavirus DNA in abnormal smears as a predictor of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Br. J. Cancer.* 69(1), 167-171.
- Ekalaksananan, T., Pientong, C., Sriamporn, S., et al., 2006. Usefulness of combining testing for p16 protein and human papillomavirus (HPV) in cervical carcinoma screening. *Gynecol. Oncol.* 103, 62-66.
- Eleutério, J.Jr., Giraldo, P.C., Gonçalves, A.K., Cavalcante, D.I.M., et al., 2007. Prognostic markers of high-grade squamous intraepithelial lesions: the role of p16INK4a and high-risk human papillomavirus. *Acta Obstet. Gynecol.* 86, 94-98.
- Guedes, A.C., Brenna, S.M.F., Coelho, S.A.S., Martinez, E.Z., Syrjänens, K.J., Zeferino, L.C., 2007. P16INK4a expression does not predict the outcome of cervical intraepithelial neoplasia grade 2. *Int. J. Gynecol. Cancer* 17,1099-1103.
- Ho, C.M., Chien, T.Y., Huang, S.H., Wu, C.J., Shih, B.Y., Chang, S.L., 2004. Multivariate analysis of the prognostic factors and outcomes in early cervical cancer patients undergoing radical hysterectomy. *Gynecol. Oncol.* 93, 458-464.
- Ikuta, A., Saito, J., Mizokami, T., et al., 2005. Correlation p53 expression and human papilloma virus deoxyribonucleic acid with clinical outcome in early uterine cervical carcinoma. *Cancer Det. Prev.* 29, 528-536.
- Ishikawa, M., Fuji, T., Saito, M., et al., 2006. Overexpression of p16INK4a as an indicator for human papillomavirus oncogenic activity in cervical squamous neoplasia. *Int. J. Gynecol. Cancer* 16, 347-353.
- Lambert, A.P.F., Anschau, F., Schmitt, V.M., 2006. P16INK4A expression in cervical premalignant and malignant lesions. *Exp. Mol. Pathol.* 80, 192-196.

-
- Lu, X., Feki, A., 2006. Phenotypic features with p53 alterations related to human papillomavirus and prognostic evaluation in cervical cancer. *Int. J. Gynecol. Cancer* 16, 708-717.
- Madeleine, M.M., Shera, K., Schwartz, S.M., et al., 2000. The p53 Arg72Pro polymorphism, human papillomavirus, and invasive squamous cell cervical cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 9(2), 225-227.
- Masumotto, N., Fujii, T., Ishikawa, M., Saito, M., Nozawa, S., 2003. p16 INK4a overexpression and human papillomavirus infection in small cell carcinoma of the uterine cervix. *Hum. Pathol.* 34, 778-783.
- Matlashewski, G.J., Tuck, S., Pim, D., et al., 1987. Primary structure polymorphism at amino acid residue 72 of human p53. *Mol. Cell. Biol.* 7(2), 961-963.
- Moreno, V., Muñoz, N., Bosch, F.X., 1995. Risk factors for progression of cervical intraepithelial neoplasm grade III to invasive cervical cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 4, 459-467.
- Nakagawa, H., Sugano, K., Fujii, T., et al., 2002. Frequent detection of human papilloma viruses in cervical dysplasia by PCR single-strand DNA-conformational polymorphism analysis. *Anticancer Res.* 22, 1655-1660.
- Nishikawa, A., Fujimoto, T., Akutagawa, N., et al., 2000. P53 polymorphism (codon-72) has no correlation with the development and the clinical features of cervical cancer. *Int. J. Gynecol. Cancer* 10, 402-407.
- Östor, A.G., 1993. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: the critical review. *Int. J. Gynecol. Pathol.* 12, 186-192.
- Sakaguchi, M., Fujii, Y., Hirabayashi, H., et al., 1996. Inversely correlated expression of p16 and Rb protein in non-small cell lung cancers: an immunohistochemical study. *Int. J. Cancer* 65, 442-445.

-
- Samama, B., Schaeffer, C., Boehm, N., 2008. P16 expression in relation to human papillomavirus in liquid-based cervical smears. *Gynecol. Oncol.* 109, 285-290.
- Sano, T., Oyama, T., Kashiwabara, K., Fukuda, T., Nakajima, T., 1998. Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. *Am. J. Pathol.* 153, 1741-1748.
- Sousa, H., Santos, A.M., Pinto, D., Medeiros, R., 2007. Is the p53 codon 72 polymorphism a key biomarker for cervical cancer development? A meta-analysis review within European populations. *Int. J. Mol. Med.* 20, 731-741.
- Storey, A., Thomas, M., Kalita, A., et al., 1998. Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus associated cancer. *Nature* 393, 229-234.
- Syrjänen, K.J., 2005. Immunohistochemistry in assessment of molecular pathogenesis of cervical carcinogenesis. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* 26, 5-19.
- Van Duin, M., Snijders, P.J., Vossen, M.T., et al., 2000. Analysis of human papillomavirus type 16 E6 variants in relation to p53 codon 72 polymorphism genotypes in cervical carcinogenesis. *J. Gen. Virol.* 81(pt 2), 317-325.
- Yildiz, I.Z., Usubütün, A., Firat, P., Ayhan, A., Küçükali, T., 2007. Efficacy of immunohistochemical p16 expression and HPV typing in cervical squamous intraepithelial lesion grading and review of the p16 literature. *Pathol. Res. Pract.* 203, 445-449.
- Zehbe, I., Voglino, G., Wilander, E., et al., 2001. P53 codon 72 polymorphism and various human papillomavirus 16 E6 genotypes are risk factors for cervical cancer development. *Cancer Res.* 61, 608-611.

De: Experimental and Molecular Pathology
Para: anschau@terra.com.br
Data: 12/07/08 15:49
Assunto: Submission Confirmation

Texto:

Dear MD Anschau,

We have received your article "Transition of cervical carcinoma in situ to invasive cancer: role of p16INK4a expression in progression and in recurrence" for consideration for publication in Experimental and Molecular Pathology.

Your manuscript will be given a reference number once an editor has been assigned.

To track the status of your paper, please do the following:

1. Go to this URL: <http://ees.elsevier.com/emp/>
2. Enter these login details:
Your username is: anschau
Your password is:
3. Click [Author Login]
This takes you to the Author Main Menu.
4. Click [Submissions Being Processed]

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System
Experimental and Molecular Pathology

Our new self-help site at <http://epsupport.elsevier.com/> describes a range of EES topics, answers frequently asked questions, and provides interactive EES tutorials for authors, editors and reviewers.

Please note that the editorial process varies considerably from journal to journal. To view a sample editorial process, please click here:

http://ees.elsevier.com/eeshelp/sample_editorial_process.pdf

For any technical queries about using EES, please contact Elsevier Author Support at authorsupport@elsevier.com

Global telephone support is available 24/7:

For The Americas: +1 888 834 7287 (toll-free for US & Canadian customers)

For Asia & Pacific: +81 3 5561 5032

For Europe & rest of the world: +353 61 709190

Anexos: