C2

JOSÉ ELEUTÉRIO JUNIOR

MARCADORES BIOMOLECULARES DE LESÕES EPITELIAIS ESCAMOSAS GENITAIS PRÉ-INVASIVAS

Tese de Doutorado

ORIENTADOR: Prof. Dr. PAULO CÉSAR GIRALDO

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
CÉSAR LATTES
DESENVOLVIMENTO DE COLEÇÃO

Unicamp
2007

JOSÉ ELEUTÉRIO JUNIOR

MARCADORES BIOMOLECULARES DE LESÕES EPITELIAIS ESCAMOSAS GENITAIS PRÉ-INVASIVAS

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Doutor em Tocoginecologia, área de Tocoginecologia

ORIENTADOR: Prof. Dr. PAULO CÉSAR GIRALDO

Unicamp
2007

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
CÉSAR LATTES
DESENVOLVIMENTO DE COLEÇÃO

UNIDADE BC
Nº CHAMADA:
T/UNICAMP EL27m
V. EX.
TOMBO BCCL 74245
PROC 16.145-07
C D X
PREÇO 11,00
DATA 19-9-07
BIB-ID 415222

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP
Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

EL 27m

Eleutério Junior, José
Marcadores biomoleculares de lesões epiteliais escamosas genitais pré-invasivas/ José Eleutériio Junior. Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientador: Paulo César Giraldo
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Colo uterino – Câncer 2. Vírus do Papiloma 3. Herpesvirus I.Giraldo, Paulo César. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

Aluno: JOSÉ ELEUTÉRIO JUNIOR

Orientador: Prof. Dr. PAULO CÉSAR GIRALDO

Membros:

1.
2.
3.
4.
5.

Curso de Pós-Graduação em Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Data: 03/08/2007

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
CÉSAR LATTES
DESENVOLVIMENTO DE COLEÇÃO

Dedico este trabalho...

...aos meus pais, Eleutério e Francisca Maria

...à minha companheira de luta, Diane

...aos meus amados filhos Renata, Rafaela e Emanuel

...ao meu orientador e amigo Paulo Giraldo

DESENVOLVIMENTO COLEÇÃO

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Paulo Giraldo pelo exemplo, compreensão e apoio.

Ao Dr. Francisco Valdeci Ferreira pelo apoio na realização dos testes imuno-histoquímicos no Hospital do Câncer do Ceará.

À Diretora da Maternidade Escola Assis Chateuabriand, Dra. Zenilda Bruno, por seu apoio e confiança.

À Professora Dra. Ana Katherine S. Gonçalves, do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da UFRGN, pela amizade e carinho.

À Professora Deirdre Giraldo por sua ajuda e hospitalidade.

À Profa. Dra. Cláudia Jacyntho, por seu incentivo.

Ao primo e amigo Dr. Francisco Eleutério, por seu apoio e exemplo.

À Sueli Chaves, chefe da ASTEC, e sua equipe, por seu apoio abalizado.

À Margarete, por seu apoio e orientações na secretaria de pós-graduação da Unicamp.

À Sirlei, por sua importante orientação na avaliação estatística.

Às mulheres do Brasil que ainda padecem de um mal como o câncer de colo, contra o qual temos que lutar incessantemente.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta tese.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
CESAR LATTES
DESENVOLVIMENTO DE COLEÇÃO

Sumário

Símbolos, Siglas e Abreviaturas vii

Resumo ix

Summary xi

1. Introdução 13

2. Objetivos 23

2.1. Objetivo Geral 23

2.2. Objetivos Específicos 23

3. Publicações 25

3.1. Artigo 1 26

3.2. Artigo 2 39

3.3. Artigo 3 52

3.4. Artigo 4 70

4. Discussão 84

5. Conclusões 90

6. Referências Bibliográficas 91

7. Bibliografia de Normatizações 101

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
CESAR LATTES
DESENVOLVIMENTO DE COLEÇÃO

Símbolos, Siglas e Abreviaturas

Símbolos, Siglas e Abreviaturas

AIDS – *Adquired immunodeficience syndromme*

CA – Califórnia

Cdc6 – *Cell division cycle 6 protein*

CDK – *Cyclin-dependent kinases*

CI – *Confidence interval*

c-myc – *myelocytomatosis viral oncogene*

DNA – *Desoxyribonucleic Acid*

DST – Doença sexualmente transmissível

E – Região Early do genoma do HPV

E2F – *transcription factor (TF) in higher eukaryotes*

E7 – Transforming protein, binds to pRB/p107

E6 – *Transformation protein by binding p53*

G1 – Fase da mitose que precede a síntese de DNA

hc2 – *Hybrid capture second generation*

Hi-CIN – *High grade cervical intra-epithelial neoplasia*

HPV – *Human papillomavirus*

HSIL – *High grade squamous intra-epithelial neoplasia*

IARC – *International Agency for Research on Cancer*

INCA – Instituto Nacional de Câncer

k – Kappa

Ki-67 – Proteína de proliferação celular

L – Região Late do genoma do HPV

Lo-CIN – *Low grade cervical intra-epithelial neoplasia*

LSIL – *Low grade squamous intra-epithelial neoplasia*

MIB-1 – Proteína de proliferação celular (mesmo que Ki-67)

NIC – Neoplasia intra-epitelial cervical

NPV – *negative predictive value*

OR – *Odds Ratio*

P – Probabilidade

$P16^{INK4a}$ – Biomarcador de alteração da função de Rb

p53 – *tumor protein 53*

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

PIN – Penile intra-epithelial neoplasia

PPV – *positive predictive value*

pRB – *Rb tumour suppressor protein*

RB – *Rb tumour suppressor gen*

RLU – *Relative ligth unit*

RR – *Relative risk*

SEER – *Surveillance, Epidemiology and Results*

SIL – *Squamous intra-epithelial lesion*

STD – *Sexually transmited disease*

STM – *Specimen transport medium*

UCM – *Universal collection medium*

Unicamp – Universidade Estadual de Campinas

WHO – *World Health Organization*

Resumo

Resumo

Objetivos: Estudar a importância de determinados marcadores de diagnóstico e prognóstico de lesões escamosas genitais, com ênfase nos estudos de $p16^{INK4a}$ e HPV de alto risco. **Material e Métodos**: Marcadores tumorais foram revisados em 21 estudos publicados entre 1994 e 2005, no sentido de identificar aqueles que teriam melhor valor diagnóstico e/ou prognóstico das lesões intra-epiteliais escamosas. Revisão mais apurada avaliou os marcadores $p16^{INK4a}$ e HPV de alto risco em lesões do colo uterino (36 publicações entre 1994 e 2006). Estudou-se a associação do $p16^{INK4a}$ e HPV de alto risco em 96 amostras de colo uterino (13 casos de lesão intra-epitelial escamosa de alto grau (HSIL), 26 casos de lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau (LSIL) e 57 biópsias normais. O $p16^{INK4a}$ foi identificado por imuno-histoquímica, usando-se o $p16^{INK4a}$ kit (E6H4 clone, DakoCytomation, Carpinteria, CA) e o DNA-HPV foi classificado por captura híbrida (Digene®). Associações foram avaliadas pelo índice KAPPA. No artigo foram envolvidos 54 homens, parceiros sexuais assintomáticos de mulheres com lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau associada com HPV de alto risco, com a finalidade de verificar se a presença do HPV de alto risco poderia ajudar a identificar os casos com maior risco de ter lesões intra-epiteliais penianas, devendo submeter-

se à biópsia. O DNA-HPV foi testado por captura híbrida (Digene®) em raspados do pênis. Peniscopia identificou lesões suspeitas que resultaram em biópsias. **Resultados**: As revisões demonstraram uma clara potencialidade clínica no uso da associação do $p16^{INK4a}$ e do HPV de alto risco no diagnóstico das SIL do colo uterino, e um possível uso como fator prognóstico. O $p16^{INK4a}$ foi detectado em 92,3% das HSIL, em 15,4% das LSIL e em nenhum caso de histologia normal. Encontrou-se respectivamente sensibilidade, especificadade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo de 92,3%, 100%, 100% e 98,3%, de $p16^{INK4a}$ para HSIL e 100%, 70,42%, 43,3% e 100% do HPV de alto risco para HSIL. No segundo estudo o HPV de alto risco estava presente em 25,9% dos parceiros. A peniscopia levou a 13 biópsias (24,07%) com os seguintes diagnósticos: condiloma (2 casos), PIN I (2 casos), PIN II (1 caso) e histologia normal (8 casos). O teste de HPV de alto risco revelou 80% de sensibilidade, 100% de especificidade, 100% de valor preditivo positivo e 88,9% de valor preditivo negativo para identificação de lesões penianas, mostrando que homens com HPV de alto risco positivo têm maior chancer de ter lesões escamosas penianas em biópsias guiadas pela peniscopia que aqueles com lesões aceto-brancas com teste de HPV negativo. ($p = 0.007$); OR = 51(CI 1.7-1527.1). **Conclusões**: Marcadores como o HPV de alto risco têm um potencial muito grande para aumentar o poder diagnóstico das HSIL e, principalmente, supor o prognóstico da evolução destas lesões, principalmente quando associado ao $p16^{INK4a}$.

UNICAMP
DESENVOLVIMENTO COLEÇÃO

Summary

Summary

Objectives: To study the importance of the diagnostic and prognostic markers of genital squamous lesions, meanly $p16^{INK4a}$ and high risk HPV. **Material And Methods**: Squamous intra-epithelial lesion tumoral markers were revised in 21 publications between 1994 and 2005 to identify those with diagnostic and prognostic value. More accurate revision assessed the markers $p16^{INK4a}$ and high risk HPV (36 publications between 1994 and 2006). The $p16^{INK4a}$ and high-risk Human papillomavirus were investigated in 96 samples of the cervix (13 cases of high grade squamous intraepithelial lesions, 26 cases of low grade intraepithelial lesions and 57 normal tissues). The $p16^{INK4a}$ was identified by immunohistochemistry using the $p16^{INK4a}$ kit (E6H4 clone, DakoCytomation, Carpinteria, CA). and Human papillomavirus DNA was classified by hybrid capture (Digene®). Associations were evaluated by the KAPPA index. In the other report fifty four asymptomatic male sexual partners of women with low grade squamous intraepithelial lesions (LSIL) associated to high risk HPV were examined, between April 2003 and June 2005, to verify if the high risk HPV could help to identify those with more risk to have a squamous penile lesion. The DNA-HPV was tested by second generation Hybrid Capture (Digene ®) in penile scraped samples. Peniscopy identified suspicious

lesions leading to biopsy. **Results**: The revisions showed the clinical potentiality of the concomitant use of high risk HPV and $p16^{INK4a}$ in diagnosis of cervical SIL and a possible utility in prognosis of genital squamous intra-epithelial. In 96 cervical biopsies, $p16^{INK4a}$ was detected in 92.3% of the high-grade squamous intraepithelial lesions, in 15.4% of the low-grade and in none of the normal tissues. The sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value for high-grade lesion were 92.3%, 100%, 100%, and 98.3%, respectively when considering $p16^{INK4a}$ expression, and 100%, 70.2%, 43.3% and 100%, respectively when considering high-risk HPV. In the male partner study high risk HPV was present in 25.9% (14/54) of the cases. Peniscopy led to 13 biopsies (24.07%). Condyloma (2 cases), PIN I (2 cases), PIN II (1 case) and normal tissue (8 cases) were found. The high risk HPV test presented 80% sensitivity, 100% specificity, 100% positive predictive value and 88.9% negative predictive value for the identification of penile lesions. So, there was a greater chance in finding HPV lesions in the biopsy in the positive cases for high risk HPV with abnormal peniscopy than in the negative cases for high risk HPV with anormal peniscopy ($p = 0.007$); OR = 51(CI 1.7-1527.1). **Conclusions**: Markers as high risk HPV have a potential to increase the diagnostic of HPV induced lesions and maybe indicate the evolution, meanly associated with $p16^{INK4a}$.

Introdução

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
CESAR LATTES
DESENVOLVIMENTO DE COLEÇÃO

1. Introdução

O epitélio estratificado escamoso reveste determinadas áreas genitais (vulva, vagina, colo uterino e pênis) e tem como característica uma diversidade de patologias a ele associadas. No entanto, apresenta na associação com infecção por Papilomavírus humano (HPV) sua mais intrigante e pesquisada relação com diversas doenças catalogadas, desde lesões verrucosas benignas até carcinoma invasivo em vulva, vagina, colo uterino e pênis.

Nos Estados Unidos da América estima-se que, a cada ano, mais de seis milhões de pessoas são infectadas com HPV genital. Pelo menos metade dos homens e mulheres sexualmente ativos adquire HPV em algum momento de suas vidas (Saslow et al., 2007).

Este mesmo HPV tão freqüente tem sido considerado essencial no processo de oncogênese de lesões dos tratos genitais inferiores feminino e masculino, muito embora contando com co-fatores (Viscidi, 2002; Huang et al., 2003).

Segundo dados do Ministério da Saúde, estimou-se para o ano de 2003 a ocorrência de 402.190 novos casos de câncer, sendo 216.035 casos em mulheres,

que resultaram em 58.610 óbitos. O câncer de colo do útero contribui com mais de 16.000 novos casos anualmente, com aproximadamente 4.000 óbitos e uma taxa de incidência de 18,32 por 100.000 (INCA, 2003). Cerca de 50% dos cânceres de colo uterino são diagnosticados no Brasil nos estádios III e IV. Nos Estados Unidos da América, o câncer cervical é a décima primeira causa de neoplasia maligna na mulher, tendo uma taxa de 9,2 por 100.000 segundo estudos do SEER (Surveillance, Epidemiology and Results) (Schiffman e Castle, 2003).

Já nos homens a associação do HPV com o câncer peniano, embora não muito precisa, tem sido levantada, em especial nos casos que acometem homens mais jovens, com identificação de semelhantes lesões pré-invasoras (Eluf Neto, 1998; Cubilla et al., 2000; Dillner et al., 2000). Muito embora o câncer de pênis seja uma neoplasia rara, com uma incidência bem inferior a 5/100.000 em todo o mundo, chegando a ser de 0,29/100.000 entre americanos brancos (Parkin et al., 1992; Rubin et al., 2001), no Brasil há registros de coeficientes de 8,3 /100.000 e 5,7 / 100.000 em Recife e Fortaleza, que são os mais elevados do mundo (Eluf Neto, 1998). Além de uma relação positiva entre câncer de colo uterino e câncer de pênis, estudos de biologia molecular têm demonstrado, mais recentemente, uma associação freqüente das lesões penianas com HPV de baixo e de alto riscos, sendo os últimos mais freqüentes em lesões mais importantes, pré-invasivas e invasivas (Eluf Neto, 1998).

Em 1970, o papilomavírus foi primeiro visualizado por microscopia eletrônica em material de verruga genital por Oriel e Almeida (Viscidi, 2002). No entanto, apenas com estudos de Meisels e Fortin, em 1976, e de Zur Hausen,

em 1976 e 1977, é que o HPV passou a ser efetivamente relacionado com o câncer de colo do útero, segundo Yamamoto e Alves (1998).

Com o advento da biologia molecular nos anos 80, a associação do vírus com as neoplasias não só do colo uterino, mas de outros sítios anogenitais, passou a ser estudada com maior profundidade. De tal forma que a organização genômica do papillomavírus foi determinada e a elucidação da função de vários genes foi importante na identificação da influência do vírus sobre a célula. Utilizando-se estes conhecimentos do genoma foi possível a identificação de vários tipos virais (Pfister, 1996; Wieland e Pfister, 1997; Villa, 1998; Viscidi, 2002).

Atualmente, considera-se que as infecções por HPV genitais são altamente prevalentes entre indivíduos sexualmente ativos (20% a 60%) (Pfister, 1996; Wieland e Pfister, 1997; Monk e Wiley, 2003). A maioria permanece clinicamente oculta, em forma definida como latente, onde o vírus se abriga nas células da camada basal do epitélio. Uma minoria manifesta-se de forma subclínica (10% – 20%), associada a achados de métodos ópticos (colposcopia e microscopia) e menos comumente na forma clínica, como verrugas visíveis a olho nu (0,24% - 15%) (Wieland e Pfister, 1997). A possibilidade de diagnóstico da presença de HPV, que permite conceituar a infecção como latente, reside nos métodos de biologia molecular, principalmente a reação de cadeia de polimerase (PCR) introduzida na pesquisa clínica em 1989 por Manos et al. (Viscidi, 2002).

Os papillomavírus formam partículas virais icosaédricas, não envelopadas, com diâmetro aproximado de 55nm, que contêm um DNA em dupla fita, circular que mede cerca de 8.000 pares de bases (De Villiers, 1994; Viscidi, 2002).

UNICAMP
Biblioteca Central
Cesar Lattes
Desenvolvimento de Coleção

Atualmente são classificados mais de 100 tipos virais, dos quais 45 infectam o trato genital e mais de 20 têm sido isolados de pacientes com câncer genital (Huang et al., 2003). Estes tipos são classificados com base na seqüência de nucleotídios do DNA. Considera-se um novo tipo quando a seqüência de nucleotídios dos genes L1, E6 e E7 diferir mais que 10% dos tipos conhecidos. Se a diferença for menor que 2%, considera-se uma variante do mesmo tipo. Se a diferença corresponder de 2% a 10%, trata-se de um subtipo (Villa, 1998). Estes tipos virais apresentam diferentes tropismos, podendo ser, conforme Wieland e Pfister (1997), classificados em tipos mucosos, cutâneos e cutâneos/epidermodisplasia verruciforme, embora existam exceções. Algumas vezes um tipo de HPV pode causar uma variedade de lesões clínicas.

A lista atual de tipos de HPV associados à malignidade inclui quatro tipos de alto risco (16,18, 31 e 45) e nove de risco intermediário (33, 35, 39, 51, 52, 56, 58, 59 e 68). Setenta e cinco por cento dos cânceres de colo e entre 30% e 70% dos carcinomas penianos estão associados aos tipos de alto risco (Eluf Neto, 1998; Viscidi, 2002)

Em alguns estudos mais de 95% dos cânceres do colo são positivos para HPV-DNA (Wieland e Pfister, 1997). No entanto, outras pesquisas têm chegado a cifras de 98% a 99,7% (Viscidi, 2002) e virtualmente a 100% (Bosch et al., 1995; Wieland e Pfister 1997; Schiffman e Castle, 2003). O tipo 16 é o mais freqüentemente identificado, independentemente do grau de lesão escamosa cervical (Schiffman e Castle, 2003). Com relação às lesões penianas, mais estudos são necessários para

estabelecer melhor esta associação; no entanto, as cifras têm variado de 30% a 73% e o tipo 16 também é o mais freqüente (Eluf Neto, 1998; Rubin et al., 2001).

O Estudo Biológico Internacional sobre Câncer Cervical mostrou que o HPV 16 foi o tipo predominante em cânceres de todas as regiões geográficas estudadas (43% a 65%) (Bosch et al., 1995). De 2% a 30% dos casos têm mais de um tipo de HPV (Wieland e Pfister, 1997; Viscidi, 2002). Dados atualmente disponíveis, que são limitados, parecem indicar que tipos de HPV influenciam minimamente uns aos outros (Schiffman e Castle, 2003). A carga viral nas lesões intra-epiteliais escamosas cervicais tem sido estudada, mas o seu valor prognóstico não está ainda estabelecido (Eleutério et al., 2002; Schiffman Castle, 2003).

Há cerca de 150 anos foi descrito o câncer cervical, há 100 anos foram reconhecidas lesões precursoras e há meio século adota-se o exame de Papanicolaou para rastreio de lesões cervicais. Durante todo este tempo, foram propostos vários termos histológicos e citológicos para as lesões precursoras do câncer de colo (Crum et al., 1997).

Segundo Wright et al. (1994), Richart, em 1973, introduziu o conceito de que todas as lesões precursoras do carcinoma escamoso do colo representavam um único processo, que ele chamou de neoplasia intra-epitelial cervical (NIC), dividida em três grupos: NIC I, que correspondia à displasia leve, NIC II, displasia moderada e NIC III, que associava a displasia acentuada com o carcinoma *in situ*.

Com o passar dos anos e a introdução do estudo de biologia molecular das lesões cervicais novos conceitos surgiram, dos quais o mais importante foi

a associação das lesões com o HPV (De Villiers, 1994; Levine et al., 1994; Bosch et al., 1995; Kisseljov et al., 2004).

Assim, seguindo a tendência adotada na citopatologia com a instituição do Sistema Bethesda 1988 e 1991, e mais recentemente a versão 2001 (Eleutério, 2003) para relato de laudos citopatológicos, já é sugerido que se adote no diagnóstico morfológico histopatológico também uma classificação em apenas dois níveis - lesão de baixo e lesão de alto grau -, conforme sugere o próprio Richart, segundo Wright et al. (1994), com o uso dos termos neoplasia intra-epitelial de baixo grau (Lo-CIN) e neoplasia intra-epitelial de alto grau (Hi-CIN).

À semelhança do colo uterino, também para o epitélio escamoso do pênis acredita-se haver uma ação HPV associada, com a possibilidade de progressão e possível prevenção da invasão desde que haja um diagnóstico da lesão pré-invasiva em uma via carcinogenética possível. Assim, as neoplasias intra-epiteliais penianas (PIN) seriam divididas por suas carcaterísticas histológicas em três grupos: PIN I, PIN II e PIN III (Cubilla et al., 2000). A presença de HPV em casos de PIN tem sido observada ser de 63%, e em casos de PIN II e PIN III de 90% e 92%, respectivamente (Eluf Neto, 1998).

A infecção do HPV não é suficiente para isoladamente causar a malignidade das lesões. A progressão, na realidade, ocorre em pequeno percentual de casos, dependendo de diferenças individuais da resposta imunológica, tabagismo, história sexual e multiparidade nas mulheres (Schiffman e Castle, 2003). Geralmente o câncer desenvolve-se como conseqüência de alterações genéticas com ativação de

oncogenes ou inativação de genes supressores de tumor. Os mais assiduamente estudados nas relações do HPV com seu potencial oncogênico têm sido o p53 e o RB. O papel dos produtos destes genes é regular o ciclo celular por controle da transcrição de genes celulares envolvidos na progressão do ciclo e proliferação celular (Wieland e Pfister, 1997).

O gene p53 está localizado no cromossomo 17. A proteína nuclear p53, denominada "guardião do genoma", tem como principal efeito supressor tumoral a ativação transcripcional dos genes que mantêm a estabilidade genômica. Células com p53 mutado ou inativado perdem a habilidade de induzir um bloqueio em G1 ou a apoptose em resposta a um dano de DNA. Isto resulta em uma instabilidade genética e mutações críticas para a oncogênese (Wieland e Pfister, 1997; Isaka et al., 2004).

O gene RB está localizado no cromossomo 13 e o seu produto, proteína nuclear pRB, interage com o fator de transcrição celular E2F na fase G1 do ciclo celular. Esta interação inibe a transcrição E2F induzida, dos genes celulares envolvidos na proliferação e replicação de DNA, tais como timidina-quinase, c-myc, polimerase alfa entre outros. Mutações de RB ou inativação de pRB causam proliferação celular descontrolada (Wieland e Pfister, 1997). Em células quiescentes, o pRB é hipofosforilado e se associa com E2F. Quando estas células são expostas a sinais mitogênicos, a transcrição dos genes codificadores de ciclinas tipo D G1 específicas (D1, D2 e D3) é iniciada. Subseqüentemente, as D-ciclinas ativam as quinases dependentes de ciclina 4 e 6 (CDK4 e CDK6), que fosforilam pRB na fase G1, causando liberação de E2F, que, livres e ativados, promovem a

transcrição de um grupo de genes que codificam proteínas essenciais para progressão do ciclo celular. CDK4 e CDK6 são um ponto crucial no ciclo celular e as proteínas de supressão tumoral do gene p16 tipo $p16^{INK4a}$, $p15^{INK4b}$, $p18^{INK4c}$ e $p19^{INK4d}$ se associam com CDK4 e CDK6 e inibem fortemente a atividade quinase. A interação de HPV16E7 com a pRB resulta na liberação de E2F ativado e na estimulação da entrada na fase S, mesmo na ausência de complexos CDK4 a CDK6 e na presença de altos níveis de $p16^{INK4a}$. Estudos em HPV de baixo risco 6 e 11 demonstraram que o E7 tem eficiência reduzida na ligação ao pRB e falta de atividade transformante *in vitro* (Giarre et al., 2001).

A perda de função das vias pRb e p53 ocorre na maioria, ou até em todos os casos de cânceres humanos. Fortes evidências genéticas, epidemiológicas e bioquímicas estabeleceram que suas proteínas seriam componentes de diferentes barreiras contra o câncer (Tsuda et al., 2003). Não só HPV de alto risco, mas também os de baixo risco expressam E6 e E7. No entanto, só os primeiros codificam as oncoproteínas E6 (que inativa o p53) e E7 (que inativa o pRb) (Tsuda et al., 2003).

O colo uterino constitui um dos melhores sítios de estudo de oncogênese associado ao HPV. A presença de lesões com potencial evolutivo até a invasão, em um lapso de tempo relativamente longo, permite a utilização de ferramentas para detecção precoce daquelas com potencial evolutivo, bem como permite extrapolar alguns de seus achados para outro sítios genitais que podem sofrer a influencia viral (Crum et al., 1997).

A proteína expressa pelo gene p16 do cromossomo humano age como supressora tumoral, inibindo as quinases dependentes de ciclina (CDK4 e CDK6), que regulam o ponto G1 de checagem da divisão celular (Lukas et al., 1996; Ragione et al., 1996). Alterações celulares com expressões anômalas do p16 e/ou pRB têm sido descritas em muitas neoplasias, incluindo melanomas (Chin et al., 1997; Pollock et al., 2001), leucemias (Rasool et al., 1995; Sweetser et al., 2001; Omura-Minamisawa et al., 2000; Dalle et al., 2002; Graf Einsiedel, 2002), linfomas (Villuendas et al., 1998), neurofibromas (Birindelli et al., 2001), retinoblastomas (Lukas et al., 1995; Alexander e Hinds, 2001), osteossarcomas e várias malignidades de cabeça e pescoço (Doki et al., 1997), mama (An et al., 1999; Hui et al., 2000), ovário (Tsuda et al., 2003), pulmão (Gorgoulis et al., 1998; Mack et al., 1999; Tam et al., 2003) e próstata (Jarrard et al., 1999; Li et al., 2003). Nestes estudos a proteína do p16 é detectável quando o gene Rb sofre mutação, é deletado ou inativado e, contrariamente, a p16 está marcadamente reduzida ou ausente em linhas celulares e espécimes clínicas que contêm o gene Rb intacto. Ou seja, o marcador p16 não é expresso em epitélio normal, células proliferativas e lesões inflamatórias (Sano et al., 1998; Bienvenu et al., 2001). Nas lesões intra-epiteliais e no câncer de colo a alteração no p16 pode ter um papel primordial no desenvolvimento do tumor. Desde que a expressão do $p16^{INK4a}$ (inibidor de quinase dependente de ciclina) é controlada por pRB sem alterações, o qual está ligado à oncoproteina do E7 do HPV, a maior expressão de $p16^{INK4a}$ pode representar um excelente biomarcador para células funcionalmente alteradas, com ativa expressão de oncogenes de HPV (Sano et al., 1998; Van de Putte et al., 2004).

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
DESENVOLVIMENTO DE COLEÇÃO

Estudos recentes sugerem o uso de imuno-histoquímica para avaliação da expressão de $p16^{INK4a}$, com um valor preditivo positivo de 88,7% do p16 para presença de HPV identificado por PCR (Keating et al., 2001). Outros trabalhos experimentais demonstraram a ausência da positividade difusa (expressão total) do p16 em linhagens celulares de cânceres cervicais, como também marcado aumento da expressão do p16 em células ectocervicais humanas imortalizadas pelos HPVs 16 e 18. Sugerem, assim, que a inativação da cascata regulatória p16/ciclina D1/cdk4/pRb pelo HPV ocorre durante o passo de imortalização precoce na carcinogênese cervical, mas não durante a fase tardia de transformação (Sano et al., 1998).

Klaes et al. (2002), comparando diagnósticos histológicos de biópsias cervicais entre experientes patologistas, observaram uma discordância diagnóstica para lesões tipo NIC I (48%) e NIC II (65%). O uso de reação imuno-histoquímica para o $p16^{INK4a}$ reduziu esta discordância (NIC I = 9%; NIC II = 0%). Em contrapartida a estes achados, Tsuda et al. (2003) observaram que 41,3% dos cânceres invasivos do colo do útero expressavam p16 contra 14,3% das lesões intra-epiteliais escamosas.

Assim, muitas dúvidas existem com relação ao diagnóstico de lesões escamosas e seu potencial comportamento, permitindo que marcadores diagnósticos e prognósticos possam ser úteis para que se identifiquem e tratem casos com maior risco de evolução para o carcinoma, quer com uso de biologia molecular com identificação de DNA-HPV de alto risco, quer com uso de marcador imuno-histoquímico como o $p16^{INK4a}$.

Objetivos

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
CESAR LATTES
DESENVOLVIMENTO DE COLEÇÃO

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Identificar marcadores que isoladamente ou em associação possam ajudar na diferenciação diagnóstica das lesões intra-epiteliais escamosas de alto grau e que possam sugerir o seu prognóstico.

2.2. Objetivos Específicos

- **Artigo 1.** Fazer uma revisão de importantes marcadores imuno-histoquímicos (MIB-1, p53, $p16^{INK4a}$, Cdc6) de lesões intra-epiteliais escamosas, identificando aqueles com possibilidade de uso prático.

- **Artigo 2:** Fazer uma revisão de como os marcadores tumorais, em especial o $p16^{INK4a}$, podem ajudar a dar diagnóstico e prognóstico de lesões associadas ao HPV.

3. Publicações

Artigo 1 - **LESÕES PRÉ-INVASIVAS DA CÉRVICE – MARCADORES DIAGNÓSTICOS E PROGNÓSTICOS**

Paulo César Giraldo, José Eleutério Junior, Diane Isabelle Magno Cavalcante, Francisco Valdeci de Almeida Ferreira

Aceito para publicação na revista **FEMINA**

Artigo 2 - **MARCADORES IMUNO-HISTOQUÍMICOS DE LESÕES PRECURSORAS DO CÂNCER DO COLO UTERINO ASSOCIADAS AO HPV: O PAPEL DA PROTEÍNA DE SUPRESSÃO TUMORAL P16^{INK4a}**

José Eleutério Junior, Paulo C Giraldo, Ana K Gonçalves

Publicado no **J Bras Doenças Sex Transm 18(1): 62-65, 2006**

Artigo 3 - **PROGNOSTIC MARKERS OF HIGH-GRADE SQUAMOUS INTRAEPITHELIAL LESIONS: THE ROLE OF p16^{INK4a} AND HIGH-RISK HUMAN PAPILLOMAVIRUS**

José Eleutério Jr, Paulo C Giraldo, Ana Ketherine Gonçalves, Diane I M Cavalcante, Francisco V A Ferreira, Suzana M Mesquita, Sirlei S Morais

Publicado na **Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica. 2007; 86:94-8**

Artigo 4 - **THE ROLE OF HIGH RISK HPV-DNA TEST IN THE MALE SEXUAL PARTNERS OF WOMEN WITH HPV-INDUCED LESIONS**

Paulo C Giraldo, José Eleutério Jr, Diane Isabelle M Cavalcante, Ana Katherine S Gonçalves, Juliana A A Romão, Renata M N Eleutério

Aceito para publicação no **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive**

UNICAMP
Biblioteca Central
Desenvolvimento de Coleções

3.1. Artigo 1

LESÕES PRÉ-INVASIVAS DA CÉRVICE – MARCADORES DIAGNÓSTICOS E PROGNÓSTICOS

Pre-invasive lesions of the cervix - diagnostic and prognostic markers

Autores:

Paulo César Giraldo [1]

José Eleutério Junior [1]

Diane Isabelle Magno Cavalcante [2]

Francisco Valdeci de Almeida Ferreira [2]

Instituições: [1]Departamento de Tocoginecologia - Universidade Estadual de Campinas (UNICamp

[2]Hospital do Câncer – Instituto do Câncer do Ceará

Endereço para correspondência:

Instituição: Departamento de Tocoginecologia /FCM Universidade Estadual de Campinas e Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM). Rua Alexander Fleming, 848 CEP: 13093-140, Campinas – SP Telefone - Fax: (19) 3521-9306

Resumo

Apesar do sucesso de programas de controle do câncer de colo na Europa e nos Estados Unidos, anualmente ocorrem mais de 500.000 casos no mundo, dos quais 80% em países pobres. No Brasil, cerca de 20.000 novos casos ocorrem a cada ano. O *Papilomavirus humano* está associado à virtualmente todos os casos, mas a identificação de HPV de alto risco não é a única condição associada com a lesão ou com a possibilidade de progressão. Por outro lado, os mecanismos envolvidos na biologia do vírus, principalmente os genes E6 e E7, agem como passos essenciais na indução e progressão das lesões epiteliais. Recentemente muitos marcadores têm sido estudados para identificar as lesões de pior prognóstico e, especificamente para melhorar a reprodutibilidade do diagnóstico morfológico. Os autores fazem uma revisão de importantes marcadores imuno-histoquímicos (MIB-1, p53, $p16^{INK4a}$, Cdc6) de lesões intra-epiteliais escamosas e sobre aqueles com possibilidade de uso em futuro bem próximo.

Palavras-chave: colo, imuno-histoquímica, HPV

Abstract

Although the success of the program of cervical cancer control in countries of Europe and USA, annually occur more than 500.000 cases of cervical cancer in the world which 80% in poor countries. In Brazil about 20.000 new cases occur annually. *Human papillomavirus* is associated with virtually all cases of cervical cancer, but the high risk HPV-DNA identification is not the only condition associated with a lesion or with the possibility of progression. In other hand the mechanisms involved in HPV biology, meanly the E6 and E7 genes, act as essential steps in induction and progression of the epithelial lesions. Recently many markers have been studied to identify the lesions of worse prognostic and specifically to become better the reproducibility of the subjective morphologic diagnose. The authors reviewed important immunohistochemical markers (MIB-1, p53, $p16^{INK4a}$, Cdc6) of squamous intra-epithelial lesions and about those with possibility of use in a near future.

Key words: cervix, immunohistochemistry, HPV

Introdução

Atualmente considera-se que as infecções genitais por HPV sejam altamente prevalentes entre mulheres sexualmente ativas, atingindo cifras de 20 a 60% (Wieland & Pfister, 1997; Monk & Wiley, 2003). Embora exista a possibilidade de que esta infecção desencadeie uma evolução para o câncer cervical, o fato ocorre em uma minoria dos casos. No entanto, aproximadamente 500.000 novos casos de câncer de colo uterino são diagnosticados no mundo a cada ano, a maioria (80%) em países subdesenvolvidos (IARC – WHO, 2002). No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer registra anualmente cerca de 20 mil novos casos, com mais de 4000 mortes/ano (INCA, 2005).

É fato incontestável que o HPV está associado à praticamente todos os casos de câncer de colo, sendo que o HPV 16 é o tipo predominante em todas as regiões geográficas estudadas (43% a 65%) (Bosch et al., 1995). Considera-se que em 2% a 30% dos casos há mais de um tipo de HPV nas lesões (Wieland & Pfister, 1997; Viscidi, 2002). Entretanto, dados atualmente disponíveis, que são limitados, parecem indicar que tipos de HPV influenciam minimamente uns aos outros (Schiffman & Castle, 2003). Com relação a uma possível influência da carga viral do HPV nas lesões intra-epiteliais escamosas cervicais os estudos têm demonstrado dados contraditórios, considerando-se muito mais importante o fator persistência viral (Eleutério et al., 2002; Schiffman & Castle, 2003).

A identificação de um HPV de alto risco nos cânceres de colo não implica em dizer que esta seja a única condição que leva a um processo evolutivo das lesões pré-neoplásicas. Na realidade é um marcador sensível para pacientes de risco para o câncer cervical mas tem um valor preditivo relativamente pobre para identificar mulheres com lesões pré-invasivas (Wang et al., 2004). Seguramente, existe a necessidade da presença de co-fatores essenciais para que a malignização se instale. A persistência de HPV de alto risco, o hábito do tabagismo, o

início precoce de vida sexual, a história de múltiplos parceiros, os estados imunodepressivos (AIDS e transplantados) são co-fatores importantes que parecem ter papel decisivo no processo (Viscidi, 2002; Schiffman & Castle, 2003).

Entretanto, não há como negar a importância de mecanismos associados à infecção viral sobre as células hospedeiras. Assim, torna-se interessante relembrarmos como ocorre o processo infeccioso e os possíveis mecanismos utilizados pelo HPV na indução da transformação celular e potencial evolução da lesão genital.

Através de micro-traumas do epitélio o HPV se instala nas células da camada basal do epitélio escamoso passando a ter replicações virais que acompanham a evolução celular até a superfície. O vírus pode permanecer na forma chamada episssomal em que o genoma viral fica associado ao genoma da célula em um certo ponto e na forma integrada quando o genoma do HPV se incorpora ao da célula hospedeira. De maneira geral, as formas não integradas (episssomais) estão associadas a uma infecção produtiva, em que o vírus se replica acompanhando um amadurecimento celular. No entanto, embora se considere que a possibilidade de transformação celular com uma possível evolução para o câncer ocorra na forma integrada, em algumas oportunidades, principalmente associada ao HPV 16, pode haver esta transformação na forma episssomal, porém não produtiva do vírus (Crum, Cibas & Lee, 1997).

A biologia do HPV permite que se avalie por estudos moleculares e imuno-histoquímicos os tipos de HPV e sua influência sobre as células do hospedeiro através de marcadores de proliferação e de supressão tumoral. Numa visão bastante prática para entender os mecanismos envolvidos na ação viral sobre a célula hospedeira, devemos lembrar que caracteristicamente o vírus mede cerca de 8000 pares de bases (De Villiers, 1994; Viscidi, 2002) no qual estão presentes as regiões gênicas E (early) e L (late). A região E está relacionada à replicação do DNA viral, controle de transcrição, maturação, alteração da matriz celular e

estímulo de proliferação, além da transformação celular. Neste último fenômeno estão envolvidos os sítios E6 e E7 que são os principais transformadores do HPV e estão diretamente envolvidos na indução de proliferação benigna e transformação maligna nas células do hospedeiro (Hausen, 2000; Giarre et al., 2001).

Geralmente o câncer se desenvolve como conseqüência de alterações genéticas com ativação de oncogenes ou inativação de genes supressores de tumor. Os genes mais assiduamente estudados nas relações do HPV com seu potencial oncogênico têm sido o p53 e o Rb. O papel dos produtos destes genes é regular o ciclo celular por controle da transcrição de genes envolvidos na progressão do ciclo e proliferação celular. (Wieland & Pfister, 1997).

A proteína nuclear p53 tem como principal efeito supressor tumoral a ativação da transcrição dos genes que mantém a estabilidade genômica, induzindo a um bloqueio da divisão celular em G1 ou à apoptose (morte celular programada), em resposta a um dano de DNA (Wieland & Pfister, 1997; Isaka et al., 2003). Por imuno-histoquímica podem-se estudar nos tecidos a presença deste marcador, mas, conforme estudos de Koyamatsu et al (2003) ele parece não oferecer substancial auxílio no diagnóstico de HPV, nem no prognóstico de lesões de colo e vagina, embora em vulva pareça estar associado com o processo de carcinogênese.

O produto do gene Rb, proteína nuclear pRb, interage com o fator de transcrição celular E2F na fase G1 do ciclo celular. Esta interação inibe a transcrição E2F induzida dos genes celulares envolvidos na proliferação e replicação de DNA, tais como timidina-quinase, c-myc, polimerase alfa entre outros. Mutações de Rb ou inativação de pRB causam proliferação celular descontrolada (Wieland & Pfister, 1997). Através de poucos estudos imunohistoquimicos específicos para Rb observou-se uma aparente importância prognóstica de sua positividade em lesões intra-epiteliais escamosas de baixo grau com a necessidade de mais aprofundadas avaliações (Kruse et al., 2004).

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
CESAR LATTES
DESENVOLVIMENTO DE COLEÇÃO

Além da identificação de proteínas marcadoras envolvidas diretamente no processo de transformação celular existem outras que se manifestam em determinada fase de um ciclo celular que sofreu alguma influência da atuação viral. Por exemplo, marcadores como Ki-67 (MIB-1) que marcam células em proliferação (Pirog et al., 2002; Koyamatsu et al., 2003) e o $p16^{INK4a}$. Este último tem sido considerado um marcador bastante promissor, tanto no diagnóstico de lesões intra-epiteliais escamosas de alto grau quanto no prognóstico de lesões de baixo grau (Keating et al., 2001; Klaes et al., 2002; Kruse et al., 2004).

O marcador de proliferação celular MIB-1, também identificado como Ki-67, conforme a metodologia que se empregue na imuno-histoquímica, expressa-se comumente em células da camada basal, mesmo em epitélio normal, mas quando é demonstrada a sua positividade em camadas suprabasais é considerado um fator prognóstico interessante para as lesões intra-epiteliais escamosas de baixo grau (Pirog et al., 2002). Kruse el al (2004) consideram que seu valor prognóstico aumenta bastante quando este marcador é associado à expressão de Rb na camada inferior do epitélio estudado.

A proteína do p16 age como supressora tumoral inibindo as quinases dependentes de ciclina (CDK4 e CDK6), que regulam o ponto G1 de checagem do ciclo celular (Lukas et al., 1996; Ragione et al., 1996). A inativação do p16 seria o mecanismo mais efetivo de bloqueio da via ciclina D-Rb durante a evolução de uma lesão precursora ao câncer (Nuovo et al., 1999).Ela é detectável quando o gene Rb sofre mutação, é deletado ou inativado de forma que esta proteína está marcadamente reduzida ou ausente em linhas celulares e espécimes clínicas que contém o gene Rb intacto. Ou seja, o marcador p16 não é expresso em epitélio normal, células proliferativas e lesões inflamatórias (Sano et al., 1998; Bienvenu et al., 2001).

Estudos sugerem valor preditivo positivo superior a 80% da $p16^{INK4a}$ para positividade de testes de DNA-HPV, bem como uma estreita relação com lesões intra-epiteliais escamosas de

alto grau (Keating et al., 2001; Klaes et al., 2002). Parece que dentre os casos de lesões de baixo grau, há dois grupos. O primeiro composto por lesões que simplesmente refletem infecções agudas por HPV, ou seja, aquelas, com infecção em curso e replicação viral, mas com expressão de HPV de alto risco restrita nas células epiteliais diferenciadas ($p16^{INK4a}$ negativo nas camadas basal e parabasal). E, um segundo com expressão de oncogene do HPV de alto risco desregulada ($p16^{INK4a}$ positivo nas camadas basal e parabasal). A progressão para lesões de alto grau preferencialmente ocorreria naqueles casos que possuem expressão no compartimento basal do epitélio (Klaes et al., 2002). Assim, hoje tem sido considerado que, teoricamente, a $p16^{INK4a}$ seria um biomarcador promissor, por que sua expressão reflete tanto que um HPV oncogênico está presente como que há uma anormalidade de ciclo celular (Wang et al., 2004).

Bonds et al. (2002), estudaram o Cdc6, que é uma proteína essencial no início da replicação do DNA e que, juntamente com outras proteínas, limita as células a um único episódio de síntese do material genético por ciclo. A influência das oncoproteínas associadas ao HPV sobre a Cdc6 não está ainda bem caracterizada, o seu papel diagnóstico não está estabelecido e o prognóstico não foi estudado.

Considerações finais

A inter-relação HPV – célula hospedeira pode causar distúrbios no ciclo de divisão celular permitindo a expressão de proteínas marcadoras que podem ser identificadas por imuno-histoquímica, tornando possível um diagnóstico mais preciso e, essencialmente, a identificação das lesões intra-epiteliais que teriam um maior potencial evolutivo. Dentre os marcadores protéicos que têm sido estudados os mais promissores são o MIB-1 e, principalmente, o $p16^{INK4a}$, que se expressam de maneira bastante freqüente e intensa predominantemente nas lesões de alto grau e em algumas de baixo grau, que poderiam ser consideradas como de risco evolutivo.

Com a rápida evolução dos conhecimentos e a necessidade de novas armas diagnósticas e de estudo de prognóstico das lesões intra-epiteliais escamosas cervicais o ginecologista, de repente, necessita se habituar a interpretar quais são e qual o papel destas proteínas marcadoras, pois ao que tudo parece em um futuro bem próximo poderá ser uma interessante ferramenta no diagnóstico e prognóstico das lesões pré-invasoras do colo uterino, traçando, inclusive, estratégias terapêuticas.

Leituras Suplementares

1) Bienvenu F, Gascan H, Coqueret O. Cyclin D1 represses STAT3 activation through a Cdk4-independent mechanism. J Biol Chemist 2001;276:16840-7.
2) Bonds L, Baker P, Gup C, Shroyer KR. Immunohistochemical localization of Cdc6 in squamous and glandular neoplasia of the uterine cervix. Arch Pathol Lab Med 2002;126: 1163-1168.
3) Bosch FX, Nabos MM, Munoz N et al. Prevalence of Human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) study group. J Natl Cancer Inst 1995;87:796.
4) Crum CP, Cibas ES, Lee KR. Pathology of early cervical neoplasia. Contemporary issues in surgical pathology: v. 22. New York: Churchill Linvingstone; 1997.
5) deVilliers EM: Human pathogenic papillomavirus types: an update. Curr Trop Microbiol Immnunol 1994:186:1.
6) Eleutério Jr J, Cavalcante DIM, Teixeira FM, Eleutério RMN. Carga viral de HPV de alto risco por captura híbrida e lesões intra-epiteliais escamosas cervicais. Rev Bras An Clin 2002;34:193-4.
7) Estimativa 2005 – INCA. Available Internet <http://www.inca.gov.br/estimativa/2005> (2005;September, 26)

8) Giarre M, Caldiera S, Malanchi I et al. Induction of pRb degradation by the Human papillomavirus type 16 E7 protein is essential to efficiently overcome p16INK4a - imposed G1 cell cycle arrest. J Virol 2001;75:4705-12.

9) Hausen HZ. Papillomaviruses Causing Cancer: Evasion From Host-Cell Control in Early Events in Carcinogenesis. J Natl Cancer Inst 2000;92:690–8.

10) IARC – WHO. Globocan 2002. Cancer, mortality and prevalence worldwide. Available Internet <www-dep.iarc.fr> (2005; September, 02).

11) Isaka K, Nishi H, Osakabe Y et al. Establishment of a HPV and p53-mutations-negative human cell line (CA) drived from a squamous carcinoma of the uterine cervix. Gynecol Oncol 2004;92:15-21.

12) Keating JT, Cviko A, Riethdorf S et al. Ki-67, cyclin E and p16INHK4a are complimetary surrogate biomarkers for Human papillomavirus - related cervical neoplasia. Am J Sur Pathol 2001;25:884-91.

13) Klaes R, Benner A, Friedrich T et al. p16INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. Am J Sur Pathol 2002;26:1389-99.

14) Koyamatsu Y, Yokoyama M, Nakao Y et al. A comparative analysis of Human papillomavirus types 16 and 18 and expression of p53 gene and Ki-67 in cervical, vaginal and vulvar carcinoma. Gynecol Oncol 2003;90:547-51.

15) Kruse AJ, Skaland I, Janssen EA et al. Quantitative molecular parameters to identify low-risk and high-risk early CIN lesions: role of markers of proliferative activity and differentiation and Rb availability. Int J Gynecol Pathol 2004;23:100-9.

16) Lukas J, Petersen BO, Holm K et al. Deregulated expression of E2F family members induces S-phase entry and overcomes p16INK4a –mediated growth suppression. Mol

Cell Biol 1996;16: 1047-57.

17) Monk BJ, Wiley DJ. Human papillomavirus infections: truth or consequences. Cancer 2003;100:225-7.

18) Nuovo GJ, Plaia TW, Belinsky SA et al. In situ detection of the hypermethylation-induced inactivation of the p16 gene as an early event in oncogenesis. PNAS 1999; 96:12754-9.

19) Pirog E, Baergen RN, Soslow RA et al. Diagnostic accuracy of cervical low-grade squamous intraepithelial lesions is improved with MIB 1 immunostaining. Am J Surg Pathol 2002; 26:70-5.

20) Ragione FD, Russo GL, Oliva A et al. Biochemical characterization of p16INK4a- and p18-containing complexes in human cell lines. J Biol Chemist 1996;271:15942-49.

21) Sano T, Oyama T, Kashiwabara K et al. Expression status of p16 protein is associated with Human papillomavirus oncogenic potencial in cervical and genital lesions. Am J Pathol 1998;153:1741-7.

22) Schifman M, Castle PE. Human papillomavirus - epidemiology and public health. Arch Pathol Lab Med 2003;1271:930-4.

23) Viscidi RP. Epidemiology of genital tract Human papillomavirus infections. In: Apgar BS, Brotzman GL, Spitzer M. Colposcopy: principles and practice. 1st Ed. Philadelphia: W.B. Sunders Company; 2002. p. 1-22.

24) Wang SS, Trunk M, Schiffman M et al. Validation of p16INK4a as a Marker of Oncogenic Human Papillomavirus Infection in Cervical Biopsies from a Population-Based Cohort in Costa Rica. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2004;13:1355–60

25) Wieland U & Pfister H. Papillomaviruses in human pathology: epidemiology, pathogenesis and oncogenic role. In: Gross GE & Barrasso R. Human papillomavirus infection - a clinical atlas. 1st ed., Wiesbaden: Ulstein Mosby; 1997. p. 1-20.

Tabela 1. Influência de oncoproteínas E6 e E7 do HPV na célula hospedeira

Oncoproteína	Atividade
E6	Imortalização celular Degradação de p53 Ativação de telomerase
E7	Imortalização celular Ativação de ciclinas E e A Inativação de pRb Inibição dos inibidores de quinases dependentes de ciclina

Tabela 2. Marcadores imuno-histoquímicos de lesões precursoras do câncer de colo uterino

Marcador	Fenômeno associado	Auxílio diagnóstico
p53	Inibição da apoptose	+
Rb	Proliferação celular	++
MIB-1	Proliferação celular	+++
$p16^{INK4a}$	Biomarcador de alteração da função de Rb	++++
Cdc6	Alteração de replicação de DNA	+ ?

+ : pequeno; ++ : razoável; +++ : bom; ++++ : importante; +?: indefenido

3.2. Artigo 2

MARCADORES IMUNOISTOQUÍMICOS DE LESÕES PRECURSORAS DO CÂNCER DO COLO UTERINO ASSOCIADAS AO HPV: O PAPEL DA PROTEÍNA DE SUPRESSÃO TUMORAL $P16^{INK4a}$

José Eleutério Junior[1], Paulo C Giraldo[2], Ana K Gonçalves[3]

[1]Aluno de pós-graduação nível de Doutorado do Departamento de Tocoginecologia/FCM da Universidade Estadual de Campinas

[2]Professor Associado, Livre-Docente do Departamento de Tocoginecologia/FCM da Universidade Estadual de Campinas

[3]Professora Adjunta Doutora da Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Correspondência:

Paulo C. Giraldo, Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Ciências Médicas, Cidade Universitária "Zeferino Vaz", Universidade Estadual de Campinas, Rua Alexander Fleming, 101, Campinas, São Paulo, CEP 13083-881, Brasil. Telefone - Fax: (19) 3788-9306. E-mail: giraldo@unicamp.br

Resumo

A relação entre o HPV e as lesões intra-epiteliais escamosas cervicais está bem estabelecida. O mecanismo de ação que o vírus parece utilizar para causar a transformação está associado a dois genes do HPV, E6 e E7. O gene E7 tem um papel importante induzindo alterações na célula hospedeira associadas à proteína do retinoblastoma (pRb) e o fator de transcrição E2F. Quando o fenômeno induzido pelo E7 do HPV ocorre, há expressão da proteína $p16^{INK4a}$ que pode ser detectada por imunoistoquímica. Recentes trabalhos mostram a importância do uso de $p16^{INK4a}$ como marcador de transformação celular induzida pelo HPV e a sua utilidade clínica na prática, principalmente ajudando no diagnóstico de lesões intra-epiteliais escamosas de alto grau em biópsias. Esta revisão pretende fornecer ao leitor uma idéia atualizada de como alguns marcadores celulares podem contribuir para o diagnóstico e o prognóstico das neoplasias intra-epiteliais cervicais.

Palavras-Chave: $p16^{INK4a}$, HPV, lesão intra-epitelial escamosa, câncer de colo uterino, DST

Abstract

The HPV and cervical squamous intra-epithelial neoplasia relation is established. The mechanisms used by the virus which causes the transformation of the squamous intra-epithelial are associated to the E6 and E7 HPV genes The E7 gene has an important role inducing the host cell changes which are related to the retinoblastoma protein and E2F transcription factor. When the phenomenon induced by the E7 occurs, there is the expression of the p16INK4a protein which can be detected by immunohistochemistry. Recent studies have shown the importance of the use of the p16INK4a as a marker for cellular transformation induced by HPV and its clinical use in practice, mainly helping in the diagnosis of high grade squamous intra-epithelial lesions in biopsies. This revision intends to provide to the reader an update to the understanding of how cellular markers can contribute to improve the differential diagnosis of the squamous intra-epithelial neoplasia and its prognosis.

Keywords: $p16^{INK4a}$, HPV, scamous intra-epitelial lesions, cervical cancer, sexually transmitted disease

UFSCar/SIP
Biblioteca Central
Cesar Lattes
Desenvolvimento de Coleção

INTRODUÇÃO

O vírus do papiloma humano (HPV) é identificado em praticamente todos os casos de câncer escamoso do colo uterino, sendo o HPV 16, o tipo predominante nas regiões geográficas estudadas (43% a 65%)[1]. A identificação de um HPV de alto risco nos cânceres de colo não implica em dizer que seja o fator determinante no processo evolutivo das lesões pré-neoplásicas. Seguramente, existe a necessidade da presença de co-fatores essenciais para que a malignização se instale. O status imunológico do hospedeiro e a persistência de HPV de alto risco, além do hábito do tabagismo, o início precoce de vida sexual e a história de múltiplos parceiros são co-fatores importantes que parecem ter papel decisivo no processo.[2,3,4].

A interação vírus-hospedeiro e as possíveis transformações a partir daí é algo que vem sendo exaustivamente estudado. Considera-se que a infecção viral se instala nas células da camada basal do epitélio escamoso, através de microtraumas do epitélio, passando a ter replicações virais que acompanham a evolução celular até a superfície epitelial. Na camada basal a replicação viral é não-produtiva, ou seja, é mínima, não se produzindo alterações identificáveis histologicamente (coilocitose e atipias celulares). Já nas células escamosas diferenciadas das camadas suprabasais ocorre uma replicação do tipo produtiva com evidentes manifestações morfológicas. O HPV pode permanecer nas células hospedeiras nas seguintes condições: forma episssomal (o genoma viral fica associado ao genoma da célula em um certo ponto) e forma integrada (o genoma do HPV incorpora-se ao da célula hospedeira).

De maneira geral as formas não integradas (episssomais) estão associadas a uma infecção produtiva, em que o vírus se replica acompanhando o amadurecimento celular. No entanto, embora se considere que a possibilidade de transformação celular evolutiva para o câncer ocorra na forma integrada, em algumas oportunidades, principalmente associadas ao HPV 16, pode haver esta transformação na forma episssomal, porém não-produtiva do vírus [5,6,7,8].

Estudando as lesões intra-epiteliais escamosas não há ainda como identificar precisamente os fatores prognósticos que poderiam identificar aquelas com maiores possibilidades de evolução. Além disso, a subjetividade empregada nos exames anatomopatológicos tem levado a questionamento sobre o seu uso como um padrão-ouro para o diagnóstico destas lesões[9].

Recentemente, tendo-se em conta esta falta de parâmetros confiáveis, marcadores de proliferação celular (MIB-1) e supressão tumoral ($p16^{INK4a}$) vêm sendo testados em busca de indicadores mais confiáveis na identificação de quais lesões pré-neoplásicas teriam maior potencial desfavorável[10-12].

O HPV contém um DNA em dupla fita, circular que mede cerca de 8.000 pares de bases[4,13] no qual estão presentes as regiões gênicas E (early) e L (late). A região E está relacionada à replicação do DNA viral, controle de transcrição, maturação, alteração da matriz celular e estímulo de proliferação, além da transformação celular. Neste último fenômeno estão envolvidos E6 e E7[7,14], que são os principais transformadores do HPV e estão diretamente envolvidos na indução de proliferação benigna e transformação maligna nas células do hospedeiro[15]. Geralmente o câncer se desenvolve como conseqüência de alterações genéticas com ativação de oncogenes ou inativação de genes supressores de tumor. Os mais assiduamente estudados nas relações do HPV com seu potencial oncogênico têm sido o p53 e o Rb. O papel dos produtos destes genes é regular ao ciclo celular por controle da transcrição de genes celulares envolvidos na progressão do ciclo e na proliferação celular[6].

p53

A proteína nuclear p53, denominada "guardião do genoma", tem como principal efeito supressor tumoral a ativação transcricional dos genes que mantêm a estabilidade genômica. Células com p53 mutado ou inativado perdem a habilidade de induzir ao

bloqueio na fase G1 do ciclo celular ou à apoptose, em resposta a um dano de DNA. Isto resulta em uma instabilidade genética e mutações críticas para a oncogênese[6,16].

pRb

O produto do gene Rb, proteína nuclear pRb, interage com o fator de transcrição celular E2F na fase G1 do ciclo celular. Esta interação inibe a transcrição E2F induzida dos genes celulares envolvidos na proliferação e replicação de DNA, tais como timidina-quinase, c-myc, polimerase alfa entre outros. Mutações de Rb ou inativação de pRB causam proliferação celular descontrolada[6].

A perda de função das vias pRb e p53 ocorre na maioria dos casos de cânceres humanos, ou até em todos. Fortes evidências genéticas, epidemiológicas e bioquímicas estabeleceram que suas proteínas seriam componentes de diferentes barreiras contra o câncer. Não só HPV de alto risco, mas também os de baixo risco expressam E6 e E7; no entanto, só os primeiros codificam as oncoproteínas E6 (que inativam o p53) e E7 (que inativam o pRb)[17].

$p16^{INK4a}$

A relação entre pRb e E2F pode levar à ativação de quinases dependentes de ciclinas 4 e 6 (CDK4 e CDK6) que, por sua vez, levam à expressão de proteínas quinase associadas, encontrando-se a $p16^{INK4a}$ entre elas[14,18].

A proteína do p16 age como supressora tumoral inibindo as quinases dependentes de ciclina (CDK4 e CDK6), que regulam o ponto G1 de checagem do ciclo celular[19,20]. Alterações em p16 e/ou pRb têm sido descritas em muitos cânceres incluindo melanomas[21], leucemias[22], linfomas[23], neurofibromas[24], retinoblastomas[25], osteossarcomas e vários outros tumores malignos de cabeça e pescoço[26], mama[27,28], pulmão[29] e próstata[30].

O p16 é detectado quando o gene Rb sofre mutação, sendo deletado ou inativado, e, contrariamente, esta proteína fica marcadamente reduzida ou ausente em linhas celulares e espécimes clínicas que contêm o gene Rb intacto. Ou seja, o marcador p16 não é expressado em epitélio normal, células proliferativas e lesões inflamatórias[27,31]. Os dois mecanismos mais comuns de inativação de p16 são a deleção homozigótica ou a hipermetilação do gene[31].

DISCUSSÃO

Nas lesões intra-epiteliais e no câncer de colo a alteração no p16 pode ter um papel primordial no desenvolvimento do tumor. Assim, a expressão do p16 torna-se um possível marcador para a diferenciação de lesões neoplásicas daquelas reativas ou hiperplásicas na cérvix[31,32]. Desde que a expressão do $p16^{INK4a}$ é controlada por pRb funcional, que está ligado à oncoproteína do E7 do HPV, a sobre-expressão de $p16^{INK4a}$ pode representar um excelente biomarcador para células com expressão ativa de oncogenes de HPV[31,33].

Estudos sugerem um valor preditivo positivo de 88,7% do $p16^{INK4a}$ para a positividade do HPV[34]. Outros trabalhos experimentais demonstraram a não sobre-expressão do p16 em linhagens celulares de cânceres cervicais, como também marcado aumento da expressão do p16 em células ectocervicais humanas imortalizadas pelo HPV 16 e 18. Sugerindo assim, que a inativação da cascata regulatória p16/ciclina D1/CDK4/pRb pelo HPV ocorre durante o passo de imortalização precoce na carcinogenese cervical, mas não durante a fase tardia de transformação, o que morfologicamente se traduziria como máxima expressão no carcinoma in situ, com uma redução no carcinoma invasor[31].

Klaes et al.[9] comparando diagnósticos histológicos de biópsias cervicais entre experientes patologistas observaram uma discordância diagnóstica para lesões tipo NIC 1 e NIC 2 e o uso de reação imunoistoquímica para o $p16^{INK4a}$ reduziu esta discordância.

O uso do marcador mostrou um valor preditivo positivo de 100% para as lesões intra-epiteliais escamosas de alto grau e de 88% para as lesões de baixo grau. Dentre os casos de lesões de baixo grau, havia dois grupos. O primeiro, composto por lesões que simplesmente refletiam infecções agudas por HPV, ou seja, aquelas, com infecção em curso e replicação viral, mas com expressão de HPV de alto risco restrita nas células epiteliais diferenciadas ($p16^{INK4a}$ negativo nas camadas basal e parabasal). E um segundo, com expressão de oncogene do HPV de alto risco desregulada ($p16^{INK4a}$) positivo nas camadas basal e parabasal).

Assim, parece que a progressão para lesões de mais alto grau preferencialmente ocorreria naqueles casos que possuem expressão de oncogene de HPV de alto risco ativado no compartimento basal do epitélio[9]. Achados de Kalof et al. [35], Volgareva et al.[36] e Branca et al.[18] também observaram uma positividade evolutiva para o marcador, embora com uma certa heterogeneidade nos resultados da marcação nos casos de neoplasia intra-epitelial cervical e carcinoma escamoso. Tsuda et al.[17] observaram que 41,3% dos cânceres invasivos do colo do útero expressavam $p16^{INK4a}$ contra 14,3% das lesões intra-epiteliais escamosas, permitindo-lhes concluir que há um aumento de anormalidades da via do Rb (assim, como do p53) com a progressão de lesão intraepitelial para carcinoma.

CONCLUSÃO

Considera-se que do universo de mulheres infectadas pelo HPV, uma grande maioria obterá eliminação do vírus e apenas uma pequena parte deverá ser portadora de lesões com potencial evolução para invasão. O estudo de fenômenos da interação entre o HPV e a célula hospedeira tem levado à identificação de marcadores com possível associação com um maior risco evolutivo, tais como o MIB-1 e o p53[11,12,17]. No entanto, os achados não permitem considerá-los de grande utilidade na prática diária.

O $p16^{INK4a}$, devido à sua expressão mais claramente associada ao mecanismo transformante viral, parece que tende a ser um marcador a entrar na prática clínica no auxílio diagnóstico de lesões intra-epiteliais escamosas de alto grau, por vezes morfologicamente difíceis de serem diferenciadas de quadros reparativos intensos e de lesões de menor grau com importantes alterações reativas, bem como em uma provável identificação de lesões com maior potencial evolutivo para a invasão[2,9,11,12,32]. A sua correlação aqui descrita com a oncogênese do carcinoma cervical deve permitir melhores estudos sobre o seu papel e importância no processo evolutivo do câncer de colo e correlações com o efeito citopático do HPV.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J et al. Prevalence of Human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) study group. J Natl Cancer Inst 1995; 87:796-802.
2. Pfister H. Papel do Papilomavírus humano no câncer anogenital. In: Lörincz AT & Reid R. Clínicas Obstétricas e Ginecológicas da América do Norte –Papilomavírus humano I. Rio de Janeiro: Interlivros; 1996. p. 565-80.
3. Schifman M, Castle Pe. Human papillomavirus – epidemiology and public health. Arch Pathol Lab Med 2003; 1271: 930-4.
4. Viscidi RP. Epidemiology of genital tract Human papillomavirus infections.In: Apgar BS, Brotzman GL, Spitzer M. Colposcopy: principles and practice. 1 Ed. W.B. Sunders Company. Philadelphia 2002. p. 1-22.
5. Crum CP, Cibas ES, Lee KR. Pathology of early cervical neoplasia. Contemporary issues in surgical pathology, 1a Ed v. 22. New York: Churchill Linvingstone;1997, 288 p.

UNICAMP
Biblioteca Central
Seção
DESENVOLVIMENTO DE COLEÇÕES

6. Wieland U, Pfister H. Papillomaviruses in human pathology: epidemiology, pathogenesis and oncogenic role. In: Gross GE & Barrasso R. Human papillomavirus infection – a clinical atlas. 1st Ed. Ulstein Mosby. Wiesbaden 1997. p. 1-20.

7. Villa LL. Aspectos moleculares da oncogênese por Papilomavírus. In: Bibbo M & Moraes AM. Lesões relacionadas à infecção por HPV no trato anogenital.1a Ed. Rio de Janeiro: Revinter; 1998. p. 51-58.

8. Hudelist G, Manavi M, Pischinger KI, Watkins-Riedel T, Singer CF, Kubista E, Czerwenka KF. Physical state and expression of HPV DNA in benign anddysplastic cervical tissue: different level of viral integration are correlated with lesion grade. Gynecol Oncol 2004; 92:873-80.

9. Klaes R, Benner A, Friedrich T, Ridder R, Herrington S, Jenkins D et al. p16INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. Am J Sur Pathol 2002; 26:1389-99.

10. Pirog EC, Baergen RN, Soslow RA, Tam D, Demattia AE, Chen YT, Isacson C. Diagnostic accuracy of cervical low-grade squamous intraepithelial lesions is improved with MIB 1 immunostaining. Am J Surg Pathol 2002;26:70-5.

11. Wang JL, Zheng BY, Li XD, Angstrom T, Lindstrom MS, Wallin KL. Predictive significance of the alterations of p16INK4a, p14ARF, p53 and proliferation cell nuclear antigen expression in the progression of cervical cancer. Clin Cancer Resear 2004; 10:2407-14.

12. Wang SS, Trunk M, Schiffman M, Herrero R, Sherman ME, Burk RD, Hildesheim A et al. Validation of p16INK4a as a marker of oncogenic human Papilomavirus infection in cervical biopsies from a population-based cohort in Costa Rica. Cancer Epid Bio Preven 2004; 13:1355-60.

13. De Villiers EM. Human pathogenic papillomavirus types: an update. Curr Trop Microbiol Immnunol 1994;186:1-12.

14. Gupta S, Takhar PP, Degenkolbe R, Koh CH, Zimmermann H, Yang CM et al. The Human papillomavirus type 11 and 16 E6 proteins modulate the cell cycle regulator and transcription cofactor TRIP-Br1. Virology 2003;317:155-164.

15. Giarre M, Caldeira S, Malanchi I, Ciccolini F, Leao MJ, Tommasino M. Induction of pRb degradation by the Human papillomavirus type 16 E7 protein is essential to efficiently overcome p16INK4a – imposed G1 cell cycle arrest. J Virol, 2001; 75:4705-12.

16. Isaka K, Nishi H, Osakabe Y, Miyata M, Hokamura M, Nakada T et al. Establishment of a HPV and p53-mutations-negative human cell line (CA) derived from a squamous carcinoma of the uterine cervix. Gynecol Oncol 2004;92:15-21.

17. Tsuda H, Hashiguchi Y, Nishimura S, Kawamura N, Inoue T, Yamamoto K. Relationship between HPV typing and abnormality of 1 cell cycle regulators in cervical neoplasm. Gynecol Oncol 2003; 91:476-85.

18. Branca M, Ciotti M, Santini D, Di Bonito L, Giorgi C, Benedetto A et al. p16ink4a expression is related to grade of CIN an high-risk Human papillomavirus but does not predict virus clearance after conization or disease outcome. Int J Gynecol Pathol 2004; 23:354-65,.

19. Lukas J, Petersen Bo, Holm K, Bartek J, Helin K. Deregulated expression of E2F family members induces S-phase entry and overcomes p16INK4a –mediated growth suppression. Mol Cell Biol 1996;16: 1047-57.

20. Ragione FD, Russo GL, Oliva A, Mercurio C, Mastropietro S, Pietra VD, Zappia V. Biochemical characterization of p16INK4a- and p18-containing complexes in human cell lines. J Biol Chemist 1996; 271:15942-49.

21. Pollock PM, Welch J, Hayward NK. Evidence for three tumor suppressor loci on chromosome 9p involved in melanoma development. Canc Res 2001;61: 1154-61.

22. Dalle JH, Fournier M, Nelken B. p16INK4a immunocytochemical analysis is an independent prognostic factor in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood 2002;99:2620-3.

23. Villuendas R, Sanchez-Beato M, Martinez JC, Saez AI, Martinez-Delgado B, Garcia JF et al. Loss of p16/INK4A protein expression in non-Hodgkin's lymphomas is a frequent finding associated with tumor progression. Am J Pathol 1998;153:887–97

24. Birindelli S, Perrone F, Oggionni M, Lavarino C, Pasini B, Vergani B et al. Rb and TP53 Pathway alterations in sporadic and NF1-related malignant peripheral nerve sheath tumors. Lab Invest 2001; 81:833-44.

25. Alexander K, Hinds PW. Requirement for p27KIP1 in retinoblastoma proteinmediated senescence. Mol Cel Biol 2001; 21:3616-31.

26. Doki Y, Imoto M, Han EK, Sgambato A, Weinstein IB. Increased expression of the p27KIP1 protein in human esophageal cancer cell lines that overexpress cyclin D1. Carcinogen 1997; 18:1139-48.

27. An HX, Beckmann MW, Reifenberger G, Bender HG, Niederacher D. Gene amplification and overexpression of CDK4 in sporadic breast carcinomas is associated with high tumor cell proliferation. Am J Pathol 1999; 154:113-8.

28. Hui R, Macmillan RD, Kenny FS, Musgrove EA, Blamey RW, Nicholson RI et al. INK4a gene expression and methylation in primary breast cancer: overexpression of p16INK4a messenger RNA is a marker of poor prognosis. Clin Cancer Resear 2000; 6:2777-87.

29. Tam AS, Devereux TR, Patel AC, Foley JF, Maronpot RR, Massey TE. Perturbations of the INK4a/Arf gene locus in aflatoxin B1-induced mouse lung tumors. Carcinogen 2003; 24:121-32.

30. Li LC, Zhao H, Shiina H, Kane CJ, Dahiya R. Pgdb: a curated and integrated database of genesrelated to the prostate. Nucleic Acids Res 2003; 31:291–293.

31. Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, Fukuda T, Nakajima T. Expression status of p16 protein is associated with Human papillomavirus oncogenic potencial in cervical and genital lesions. Am J Pathol 1998; 153:1741-7.

32. O'Neill, Mccluggage. p16 expression in the female tract and its value in diagnosis. Adv Anat Pathol 2006; 13:8-15.

33. Van De Putte G, Kristensen GB, Lie AK, Baekelandt M, Holm R. Cyclins and proliferation markers in early squamous cervical carcinoma. Gynecol Oncol 2004; 92:40-6.

34. Keating JT, Cviko A, Riethdorf S, Riethdorf L, Quade BJ, Sun D et al. Ki- 67, cyclin E and p16INK4a are complimetary surrogate biomarkers for Human papillomavirus - related cervical neoplasia. Am J Sur Pathol 2001; 25:884- 91.

35. Kalof AN, Evans MF, Simmons-Arnold L, Beatty BG, Cooper K. p16INK4a immunoexpression an HPV in situ hybridization signal patterns potencial markers of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. Am J Surg Pathol 2005;29:674-9.

36. Volgareva G, Zavalishina L, Andreeva Y, Frank G, Krutikova E, Golovina D et al. Protein p16 as a marker of dispastic and neoplastic alterations in cervical epithelial cells. BMC Cancer 2004; 4:58-68.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
CÉSAR LATTES
DESENVOLVIMENTO DE COLEÇÃO

3.3. Artigo 3

PROGNOSTIC MARKERS OF HIGH GRADE SQUAMOUS INTRAEPITHELIAL LESIONS: THE ROLE OF p16INK4a AND HIGH RISK HPV

Running Title: Cervical intraepithelial lesion markers

Key words: **squamous intra-epithelial lesion, Human papillomavirus, tumor markers, p16INK4a**

José Eleutério-Jr [1] , Paulo César Giraldo [1] , Ana Katherine Gonçalves [1], Diane Isabelle Magno Cavalcante [2] , Francisco Valdeci de Almeida Ferreira [2] , Suzana Moreira Mesquita[2], Sirlei Siani Morais [1]

[1] -Department of Gynecology and Obstetrics - The State University of Campinas – São Paulo - Brazil.

[2] - Cancer Hospital – The Cancer Institute of Ceará - Fortaleza - Brazil

Address: Paulo C. Giraldo, Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Cidade Universitária "Zeferino Vaz", Universidade Estadual de Campinas, Rua Alexander Fleming, 101, Campinas, São Paulo, CEP 13083-881, Brasil. Telefone - Fax: (19) 3788-9306. E-mail: giraldo@unicamp.br

Abstract

Background: $p16^{INK4a}$ seems to be an indicator of the grade of Human Papillomavirus-induced lesions and a possible predictor of the lesion evolution. There are few studies about the role of HPV test and $p16^{INK4a}$ in diagnosis of high-grade cervical lesions in South-American women . The aim of the present study was to evaluate the presence of $p16^{INK4a}$ and high-risk HPV-DNA expression in cases diagnosed as squamous intra-epithelial lesion and evaluate their role in the approach of high-grade squamous intra-epithelial lesion. **Methods**: $p16^{INK4a}$ and high-risk Human papillomavirus were investigated in 96 samples of the cervix (13 cases of high grade squamous intraepithelial lesions, 26 cases of low grade intraepithelial lesions and 57 normal tissues). The $p16^{INK4a}$ was identified by immunohistochemistry using the $p16^{INK4a}$ kit (E6H4 clone, DakoCytomation, Carpinteria, CA) and Human papillomavirus DNA was classified by hybrid capture (Digene®). Associations were evaluated by the KAPPA index. **Results:** The $p16^{INK4a}$ was detected in 92.3% of the high-grade squamous intraepithelial lesions, in 15.4% of the low-grade and in none of the normal tissues. The sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value for high-grade lesion were 92.3%, 100%, 100%, and 98.3%, respectively when considering $p16^{INK4a}$ expression, and 100%, 70.2%, 43.3% and 100%, respectively when considering high-risk HPV. **Conclusions:** $p16^{INK4a}$ test was better associated with high-grade intraepithelial lesion (k=0.95) than was the presence of high-risk HPV (k=0.47). Both tests could be complementary to high-grade squamous intra-epithelial lesion screening and help to define the diagnosis of the inconclusive low-grade/high-grade squamous intraepithelial lesion cases.

Introduction

The presence of Human Papillomavirus (HPV)-DNA in cervical pre-invasive and invasive squamous epithelial lesions is an established fact and has been used as a screening test or additional test to aid in the interpretation of inconclusive Pap smear results (1, 2). The persistence of high risk HPV is also considered an important prognostic factor in the follow-up of high grade lesions (3, 4, 5).

The mechanisms by which HPV can at times induce low and high grade squamous intra-epithelial lesions have been extensively studied. Specifically, the HPV E7 gene has the capacity to induce cell transformation which, in association with the E6 gene, interferes with keratinocyte apoptosis (6). Part of the regulating mechanisms involves the family of proteins identified as $p16^{INK4a}$, $p15^{INK5b}$, $p18^{INK4c}$ and $p19^{INK4d}$. Interaction of the HPV16 E7 gene product with pRb, results in the liberation of E2F, inactivation of pRb and stimulation of the S phase of the cell cycle. This is strongly associated with $p16^{INK4a}$ expression (7, 8, 9, 10).

The $p16^{INK4a}$ accumulates in the cell when the Rb gene is altered. Conversely, this protein is markedly reduced or missing from clinical specimens that contain the intact Rb gene. In other words, p16 tends not to be expressed in either normal proliferative epithelium cells or inflammatory lesions (11, 8, 12).

A search in Medline between 1991 and 2005, we found 83 studies about p16 and cervix, but only 22 relating to biopsies and HPV. Some authors have tested $p16^{INK4a}$ as a potential marker of viral persistence (high risk HPV), an indicator of the grade of histopathological lesions and a possible predictor of squamous intra-epithelial lesion progression (3, 8, 13, 14, 15, 16, 17, 18). But none of the studies compared the both tests in diagnosis of high grade cervical lesions.

The aim of the present study was to evaluate the presence of $p16^{INK4a}$ and high risk HPV-DNA expression in cases diagnosed as squamous intra-epithelial lesion and evaluate their role in the approach of high grade squamous intra-epithelial lesion (HSIL).

Material and Methods

A non-interventional cross sectional study was carried out, analyzing biopsies of the uterine cervix diagnosed as HSIL (13 cases), LSIL (26 cases) and histological normal cervical tissue (immature and mature squamous metaplasia) (57 cases). All cases were sampled previously by Second Generation Hybrid Capture for high risk HPV types. The histological diagnosis was confirmed in a double blind evaluation by two independent pathologists. The material was prepared and tested for the identification of $p16^{INK4a}$ by immunohistochemical technique.

The paraffin blocks of tissue were processed for 5µm cuts and stained in hematoxylin-eosin for morphological diagnosis. The cases were classified as normal tissue, low grade squamous intra-epithelial lesion (LSIL) and high grade squamous intra-epithelial lesion (HSIL) after concordance of a double blind evaluation by two independent pathologists. Cases with either dissimilar diagnoses or with unsatisfactory material for evaluation were excluded of the study. A histological diagnosis review after apply the $p16^{INK4a}$ test could not identify any different result.

Histological slides were made from the blocks of paraffin, 4µm thick, for immunohistochemical reaction to identify $p16^{INK4a}$ expression using the $p16^{INK4a}$ kit (E6H4 clone, DakoCytomation, Carpinteria, CA). As a final step, the slides were stained with a light hematoxylin counterstaining.

UNICAMP
DESENVOLVIMENTO DE COLEÇÃO

The biopsies were scored according to the following stratification, suggested by Guimarães et al (2005): negative (< 1% of nucleus and cytoplasm positivity); sporadic (1% to 10% of nuclei and cytoplasm with weak and scattered positivity); moderate (10% to 30% labeled nuclei and cytoplasm with strong positivity, spreading in one tissue area); and diffuse (> 30% of labeled cells with strong positivity spreading in several tissue areas). Samples were considered positive when an intense and diffuse or moderate staining was observed in the nuclei and cytoplasm of the cells, meanly from the base and parabasal layers of the squamous epithelial tissue. Cases expressing the protein in a sporadic or weak way, or expressing no reaction, were considered negative. All tests were performed in parallel, and positive and negative controls for the $p16^{INK4a}$ were included in each set. Negative controls were processed by omitting the primary antibody, and biopsies from breast cancer were used as positive controls (3).

The high risk HPV-DNA tests were carried out by the second generation Hybrid Capture technique (Digene®) on preserved and fixed samples (Universal Medium Collection - UCM Digene®).

The interval between the collection of the cervical material for the hybrid capture test and biopsy was always less than one month, to avoid any change in the original diagnosis as it could improve after the biopsy (19). The material was processed as per manufacturer's specifications so as to identify the high risk HPV-DNA that make up HPV types 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68. The analysis was carried out using qualitative and quantitative values, expressed in relative light units (RLU) that suggests the viral load. Each test was processed with triplicate positive and negative controls.

The performance of the HPV and immunohistochemical tests for $p16^{INK4a}$, in the detection of squamous intra-epithelial lesions, was evaluated by means of conventional

contingency tables to calculate sensitivity, specificity, positive and negative predictive values. Kappa (k) index was used to determine the agreement of the variables.

This research project was approved by the Ethics and Research Committee at the State University of Campinas (UNICAMP).

Results

Considering the three groups of women as patients with normal cervix tissue, LSIL and HSIL, the mean age in years was 30.5 (±9.9), 29 (±7.1) and 38.4 (±11.7). The mean of gestation was respectively 1.5 (±1.6), 0.9 (±1.1) and 3 (±3.9). The majority of women with normal cervix tissue or with LSIL had high level of education, while women with HSIL the level was not so good. Abnormal Pap smear test (LSIL or HSIL) was positive in 69.2% in LSIL cases and in 92.3% of women with HSIL (Table 1).

The presence of $p16^{INK4a}$ was evaluated in 96 cases. Samples with an intense and diffuse or moderate staining observed in the nuclei and cytoplasm of the cells from layers of the squamous epithelial tissue were considered positive. Cases expressing the protein in a sporadic or weak way, or expressing no reaction, were considered negative. So, the reaction was positive in: 92.3% (12/13) of the high grade squamous intra-epithelial lesions; 15.4% (4/26) of the low grade squamous intra-epithelial lesions and zero in the normal tissue (figs.1 and 2 – Table 2). Considering both (HSIL and LSIL) to verify the correlation with any grade of squamous intra-epithelial lesion, the sensitivity was 40%, specificity was 100%,. positive predictive values (PPV) and negative predictive values (NPV) were 100% and 70,4%, respectively, and the Kappa was 0.44 (Table 3). The $p16^{INK4a}$ expression just for HSIL showed, 92.3% sensitivity, 100% specificity, 100% PPV and 98.3% NPV. Kappa was 0.95% (Table 4).

All 96 cases were also tested for high risk HPV types. The results were 100% positive (13/13) for HSIL; 80.8% (21/26) for LSIL and 29.8% (17/57) for normal tissues (Table 2). High risk HPV was detected in 87.2% of the cases (34/39) of SIL (high and low grade) but also in 29.8% (17/ 57) of the controls (Table 2). Diagnosing SIL based on DNA-HPV, sensitivity was 87.2%, specificity 70.2%, PPV 66.7%, NPV 88.9% and Kappa= 0.55 (Table 3). The high risk HPV test for HSIL showed, 100% sensitivity, 70.2% specificity, 43.3% PPV and 100% NPV. Kappa was 0.47% (Table 4).

Discussion

The subjectivity of morphological examinations associated with the unpredictable behavior of squamous intra-epithelial lesion (SIL) induced by HPV, leads us to seek a more sensitive and more accurate marker that predicts natural history to high grade squamous intra-epithelial lesions. The use of prognostic markers as an adjunct to morphological examinations has value, mostly because treatment and follow-up can be more selective and accurate. In the present study, $p16^{INK4a}$ protein was only expressed in biopsies in which lesions induced by HPV were detected, especially high grade lesions. Some prior studies have detected this protein in a small percentage (12%) of morphologically normal tissues (8, 14). However, differences in methodology could account for possible false positive $p16^{INK4a}$ detection.

Considering that $p16^{INK4a}$ expression was detected in 92% of HSIL, its detection appears to be a viable option for the confirmation of a pre-invasive lesion, mainly when there are difficulties in differential diagnose on the histopathology. The high association with HSIL but not LSIL is a very important point to be emphasized as it could improve the diagnosis of HSIL. This is the first time that the association between high risk HPV, $p16^{INK4a}$ and HSIL has been evaluated in Brazilian or South American women.

A recent evaluation of $p16^{INK4a}$ as a marker for the diagnosis of squamous intra-epithelial lesions obtained 100% specificity and 100% PPV (3) similar to the our findings. On the other hand, considering the performance of the diagnosis of HSIL, the excellent agreement with the histopathological diagnosis obtained by the method (k = 0.95) should be highlighted.

Nevertheless, in low grade squamous intra-epithelial lesions, p16INK4a protein expression was infrequent (15.4%). Contrary to our findings, other studies reported a >80% positivity for $p16^{INK4a}$ in low grade squamous intra-epithelial lesions(6, 8, 11). Other recent studies, however, obtained results similar to those found in the present report. A study carried out on Russian women's tissues (18), reported a 2% positivity rate for LSIL.

Guimarães et al (2005) (13) made a follow up of 31 Brazilian women with an initial diagnosis of LSIL, $p16^{INK4a}$ together with bcl-2, but made no correlations between the immunohistochemical test and possession of high risk HPV in an agreement perspective with mistaken histological diagnosis.

In the present study, the test for high risk HPV-DNA was positive even in normal tissue (29.8%), suggesting latent infection and showing a very large number of positive high risk HPV-DNA without a concomitant HSIL. Due to the fact that the high risk HPV-DNA test, when used specifically in high grade squamous intra-epithelial lesions, presented high sensitivity (100%), suggests it can be considered as important screening and follow-up tools for these lesions, however not one for diagnosis. Unfortunately it was not possible to follow these patients to check clearence of HPV infection prognosis. It is a limiting factor in the study. An other point to be considered is that the high risk HPV DNA test was done in shedded cervical cells instead of biopsed tissue; however, the cells were sampled in the most of cases to test HPV in less than 30 days from the biopsies (19).

We have found the values of Kappa index, further more relevant related to HSIL (K=0.95) than to LSIL (k=0.44). As very well known the HSIL has more risk to progress to the uterine cervical cancer than LSIL (5). It seems to be very important to identify biomarkers more related to HSIL than to LSIL, since it will be more trustful and focused in a small number of patients.

Thus, it seems that the $p16^{INK4a}$ marker is an important tool for the diagnosis of high grade squamous intra-epithelial lesions and could at times be associated with low grade squamous intra-epithelial lesions with tendency to progress (17), a fact that deserves further research.

In practical terms the two tests could be complementary, with HPV-DNA in the screening and follow up, due to its high sensitivity and $p16^{INK4a}$ in the diagnosis of high grade squamous intra-epithelial lesions, especially those with an unclear histology. Despite the good correlations between $p16^{INK4a}$ and HSIL found in this study, it has to considerate that a cross-sectional study has its limitations in order to conclude that if $p16^{INK4a}$ is in fact a good marker of progression to cervical cancer, suggesting the necessity to continue following the patients to check the evolution of the cases. However, the $p16^{INK4a}$ test could be helpful to define or to avoid the HSIL diagnosis in case which the histopathology is not clear. For now, we can only speculate about this possibility. On the other hand, our results encourage to continue evaluating $p16^{INK4a}$ in prospective studies.

References

1. Bonds L, Baker P, Gup C, Shroyer KR . Immunohistochemical localization of Cdc6 in squamous and glandular neoplasia of uterine cervix. Arch Pathol Lab Med 2002 126: 1163-8.
2. Sherman ME. Chapter 11: future directions in cervical pathology. J Nat Can Inst Monog 2003;31: 72-9.
3. Branca N, Ciotti M, Santini D, Di Bonito L, Giorgi C, Benedetto A et al. p16(INK4a) 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.
4. Kruse AJ, Skaland I, Janssen EA, Buhr-Wildhagen S, Klos J, Arends MJ et al. Quantitative molecular parameters to identify low-risk and high-risk early CIN lesions: role of markers of proliferative activity and differentiation and Rb availability. Int J Gynecol Pathol 2004; 23: 100-9.
5. Schlecht NF, Kulaga S, Robitaille J, Ferreira S, Santos M, Miyamura RA et al. Persistent Human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. JAMA 2001; 286: 3106-14.
6. Kisseljov FL, Mazurenko NN, Volgareva GM, Kisseljova NP. Interaction between viral and cell genes in cervical tumors. Mol Biol 2004; 38: 224-32.
7. Giarre M, Caldeira S, Malanchi I, Ciccolini F, Leão MJ, Tommasino M. Induction of pRb degradation by th Human papillomavirus type 16 E7 protein is essential to efficiently overcome p16INK4a imposed G1 cell cycle arrest. J Virol 2001;75: 4705-12.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

8. Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, Fukuda T, Takashi N. Expression status of p16 protein is associated with Human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. Am J Pathol 1998; 153: 1741-8.

9. Sharpless N, Alson S, Chan S, Silver DP, Castrillon DH, DePinho RA. p16INK4a and p53 deficiency cooperate in tumorigenesis. Cancer Res 2002;62: 2761-5.

10. Virmani AK, Muller C, Rathi A, Zoechbauer-Mueller S, Mathis M, Gazdar AF. Molecular oncology, markers, clinical correlates - aberrant methylation during cervical carcinogenesis. Clin Can Research 2001; 7:584-9.

11. Lin Z, Gao M, Zhang X, Kim YS, Lee S, Kim HK et al. The hypermethylation and protein expression of p16INK4a and DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase in various uterine cervical lesions. J Cancer Res Clin Oncol 2005;131:364-70.

12. Wang JL, Zheng BY, Li XD, Angstrom T, Lindstrom MS, Wallin KL. Preditive significance of the alterations of p16INK4a, p14ARF, p53 and proliferating cell nuclear antigen expression in the progression of cervical cancer. Clin Cancer Res 2004; 10:2407-14.

13. Guimarães MC, Gonçalves MA, Soares CP, Bettini JS, Duarte RA, Soares EG. Immunohistochemical expression of p16INK4a and bcl-2 according to HPV type and to the progression of cervical squamous intraepithelial lesions. J Histochem Cytochem 2005; 53: 509-16.

14. Keating JT, Cviko A, Riethdorf S, Riethdorf L, Quade BJ, Sun D et al. Cyclin E and p16INK4a are complimentary surrogate biomarkers for human papilloma virus-related cervical neoplasia. Am J Surg Pathol 2001; 25:884-91.

15. Klaes R, Benner A, Friedrich T, Ridder R, Herrington S, Jenkins D et al. p16INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. Am J Surg Pathol 2002;26:1389-99.

16. Murphy N, Ring M, Killalea AG, Uhlman V, O`Donovan M, Mulcahy F et al. p16INK4a as a marker for cervical dyskariosis: CIN and cGIN in cervical biopsies and thinprep smears. J Clin Pathol 2003; 56:56-63.

17. Negri G, Vitadello F, Romano F, Kasal A, Girlando S, Mian C et al. p16INK4a expression and progression risk of low grade intraepithelial neoplasia of the cervix uteri. Virchows Arch 2004;445:616-20.

18. Volgareva G, Zavalishina L, Andeeva Y, Frank G, Krutikova E, Golovina D et al. Protein p16 as a marker of displastic alterations in cervical epithelial cells. BMC Cancer 2004; 4: 58-68.

19. Nasiell K, Nasiell M, Vaclavinkova V. Behavior of moderate cervical dysplasia during long-term follow-up. Obstet Gynecol. 1983 ;61:609-14.

Table 1. Clinical and laboratorial data of patients with HSIL, LSIL and normal tissue of uterine cervix

		Normal tissue n=56	**LSIL n=26**	**HSIL n=13**	*p*
Age	(mean±sd)	30.5 (9.9)	29 (7.1)	38.4 (11.7)	0.01
Number of Gestation	(mean±sd)	1.5 (1.6)	0.9 (1.1)	3 (3.9)	0.008
High Educational level	n (%)	32 (57)	18 (69)	3 (23.1)	0.03
Abnormal Papanicolaou	n (%)	0 (0)	18 (69.2)	12 (92.3)	0.0001

LSIL = low grade squamous intra-epithelial lesion

HSIL = high grade squamous intra-epithelial lesion

Table 2. The $p16^{INK4a}$ expression and high risk DNA-HPV detection in normal tissue, low grade and high grade squamous intra-epithelial lesions of the uterine cervix

Type of Exam		Normal N (%)	LSIL N (%)	HSIL N (%)	RR for HSIL (CI 95%)
$p16^{INK4a}$	(Positive)	0	4 (15.4)	12 (92.3)	58 (8.3-404,8)
$p16^{INK4a}$	(Negative)	57 (100)	22 (84.6)	1 (7.7)	
High risk HPV	(Positive)	17 (29.8)	21 (80.8)	13 (100)	Not estimated
High risk HPV	(Negative)	40 (70.2)	5 (19.2)	0	

LSIL = low grade squamous intra-epithelial lesion

HSIL = high grade squamous intra-epithelial lesion

RR = relative risk

Table 3. Sensitivity, Specificity, Positive predictive value (PPV), Negative predictive value (NPV) and Kappa Index of the $p16^{INK4a}$ and DNA-HPV identification tests for high and low grade squamous intra-epithelial lesions

	Sensitivity (%)	**Specificity (%)**	**PPV (%)**	**NPV (%)**	***K***
$p16^{INK4a}$	40	100	100	70.4	0.44 (CI 95% 0.28-0.6)
High risk HPV	87.2	70.2	66.7	88.9	0.55 (CI 95% 0.39-0.71)

CI = Confidence interval

k= Kappa index (< 0 = very bad; 0 a 0.2 = bad; 0.2 a 0.4 = reasonable; 0.4 a 0.6 = good; 0.6 a 0.8 = very good and 0.8 a 1 = excellent).

Table 4. Sensitivity, Specificity, Positive predictive value (PPV), Negative predictive value (NPV) and Kappa Index (*k*) of the $p16^{INK4a}$ expression and high risk DNA-HPV identification tests for high grade squamous intra-epithelial lesions (HSIL) only

	Sensitivity	**Specificity**	**PPV**	**NPV**	***K***
$p16^{INK4a}$	92.3	100	100	98.3	0.95 (CI 95% 0.86-1)
High risk HPV	100	70.2	43.3	100	0.47 (CI 95% 0.28-0.65)

CI = confidence interval

k= Kappa Index (< 0 = very bad; 0 a 0.2 = bad; 0.2 a 0.4 = reasonable; 0.4 a 0.6 = good; 0.6 a 0.8 = very good and 0.8 a 1 = excellent).

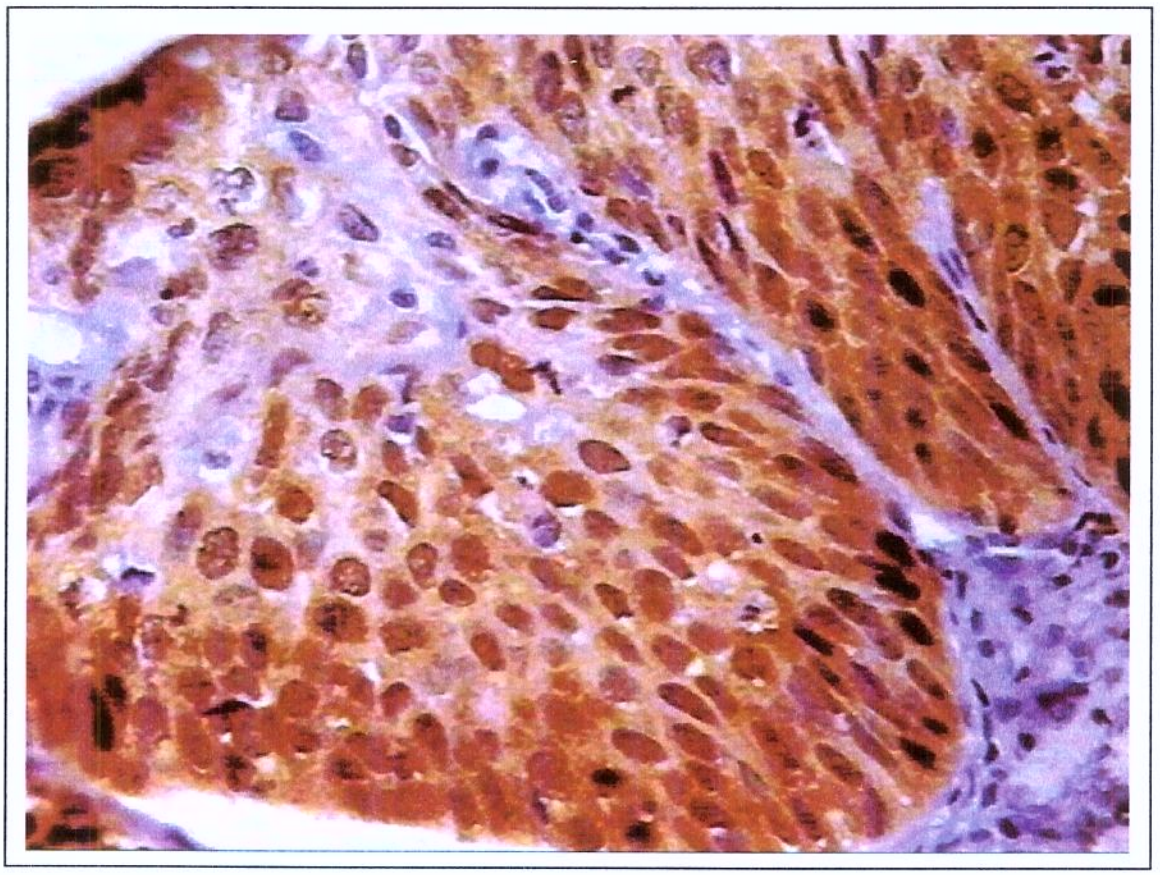

Figure 1. A high power detail of high-grade squamous intra-epithelial lesion (HSIL) with an intense staining for $p16^{INK4a}$ in the full thickness of the epithelium.

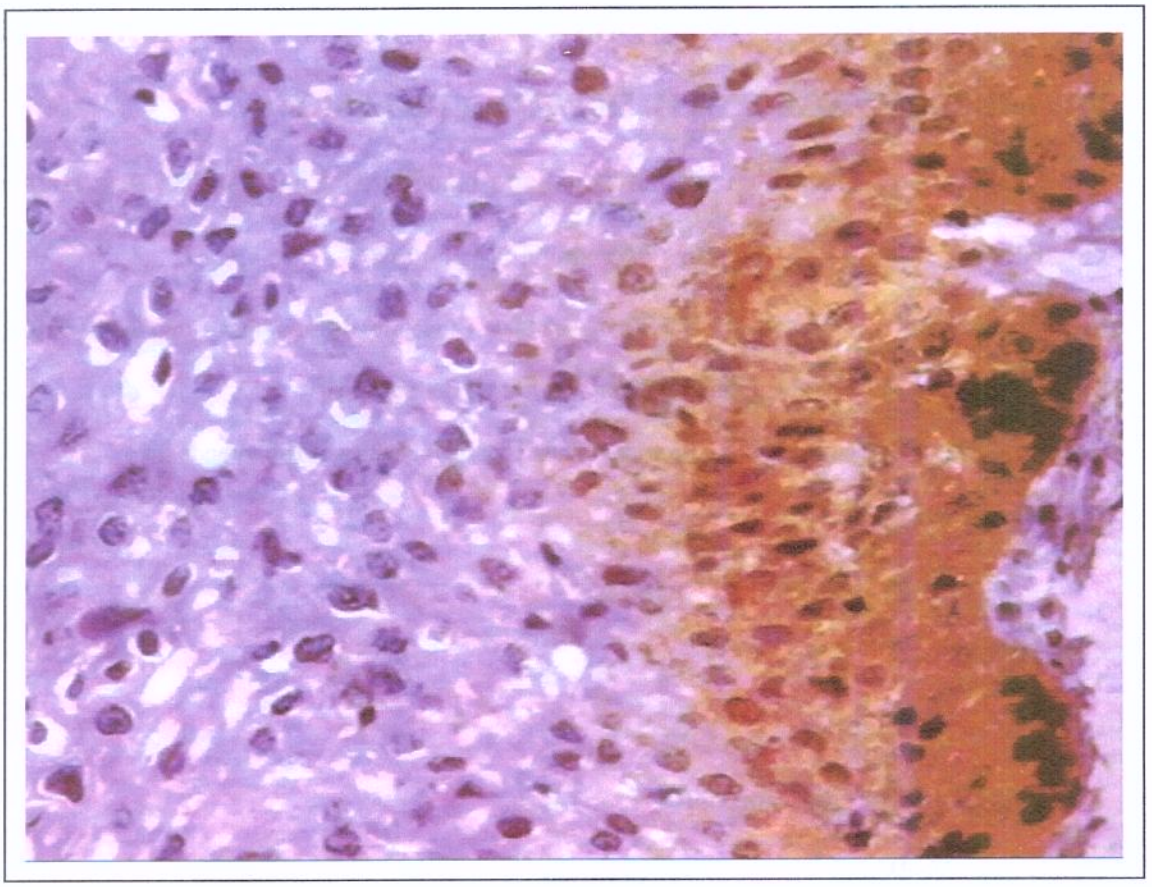

Figure 2. A high power detail of low-grade squamous intra-epithelial lesion (LSIL) with an intense staining for $p16^{INK4a}$ in the base and parabasal layers of the squamous epithelial tissue.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
CÉSAR LATTES

3.4. Artigo 4

THE ROLE OF HIGH RISK HPV-DNA TEST IN THE MALE SEXUAL PARTNERS OF WOMEN WITH HPV-INDUCED LESIONS

Paulo C Giraldo [1], Jose Eleutério Jr [1,2], Diane Isabelle M Cavalcante [2], Ana Katherine S Gonçalves [3], Juliana A A Romão [2], Renata M N Eleutério [2]

1 – Department of Gynecology and Obstetrics – The State University of Campinas – São Paulo, Brazil

2 - Prof. Eleutério da Costa S/C Ltda Laboratory-Fortaleza, Ceará, Brazil

3 - Department of Gynecology and Obstetrics – The Federal University of Rio Grande do Norte - Natal, Brazil

Correspondence:

Paulo César Giraldo

Rua Dom Francisco de Campos Barreto,145–

Campinas, SP, Brazil Zip Code: 13092-160

Email: giraldo@unicamp.br

Condensation:

The HPV test could be an important tool to avoid unnecessary biopsies for the male sexual partners of women with HPV-induced lesions with abnormal peniscopy.

Abstract

Objectives: To assess the prevalence of high risk HPV in male sexual partners of women with HPVinduced lesions, and correlate it with biopsies guided by peniscopy. **Study design:** Fifty four asymptomatic male sexual partners of women with low grade squamous intraepithelial lesions (LSIL) associated to high risk HPV were examined, between April 2003 and June 2005. The DNA-HPV was tested by second generation Hybrid Capture in penile scraped samples. Peniscopy identified suspicious lesions leading to biopsy. **Results:** High risk HPV was present in 25.9% (14/54) of the cases. Peniscopy led to 13 biopsies (24.07%). Condyloma (2 cases), PIN I (2 cases), PIN II (1 case) and normal tissue (8 cases) were found. The high risk HPV test presented 80% sensitivity, 100% specificity, 100% positive predictive value and 88.9% negative predictive value for the identification of penile lesions. There was a greater chance in finding HPV lesions in the biopsy in the positive cases for high risk HPV with abnormal peniscopy (p = 0.007); OR = 51(CI 1.7-1527.1). **Conclusion:** Identifying high risk HPV in asymptomatic male sexual partners of women with HPV infection could be helpful to select men with penile acetowhite lesions that should be biopsed or not, minimizing the number of unnecessary penile biopsies.

Keywords: Human papillomavirus, hybrid capture, STD in male, peniscopy

Introduction

The cause-effect relation between the *Human papillomavirus* (HPV) and the uterine cervix, vagina and vulva cancers has been constantly studied, pointing out mechanisms of interaction in a very clear way [1, 2]. The carrier of this infection can, depending on intrinsic and extrinsic factors, develop lesions (intra-epithelial neoplasia) which lead to uterine, vulvar, penile and anal cancer [1].

The role of the sexual partners of women infected by HPV in the progression of this disease is still unknown. However, this partner could be responsible for re-infecting the woman [3]. It is believed that men who were not circumcised could have a higher risk of transmitting the virus to their sexual partners [4, 5].

By recommendation of the conduct guidelines for sexually transmitted diseases (STD), every sexual partner of infected women must be examined in order to identify, treat and prevent the continuity of the disease [6]. Despite the recommendation, the investigation for the presence of HPV in men, who are sexual partners of infected women, has not been consensual [7, 8,9,10, 11]. The detection of the acetowhite lesions on the masculine genitalia has led to many unnecessary biopsies. Cytological exams in the same way also have poor diagnostic capacity [4, 8]. Unfortunately, the identification of the presence of HPV in men is far more difficult than in women, due to the smaller quantity of plane squamous nonkeratinized mucosa of the male genital organ in relation to the female [3]. The acetowhite lesions as defined by Wikstrom et al (12) are usually investigated by an exam with optic magnification called peniscopy. Recent studies have demonstrated that even when carried out by experienced professionals, the method has been presenting very low specificity for the detection of high grade lesions associated to HPV, leading to unnecessary biopsies [7, 13].

Recently, the identification of HPV with high or low risk of developing malignant lesions on human tissue, has been carried out by molecular biology exams, using techniques such as polymerase chain reaction (PCR) or hybrid capture (hc2), which present high sensitivity and specificity [9, 14]. Although, some authors consider the test for HPV-DNA in the masculine distal urethra of little use in the diagnosis of high grade intra-epithelial lesions [8]. On the other hand, others observed good results in the tracing of HPV-DNA in six different masculine genital sites, using second generation hybrid capture technique, even with low histopathological correlation [9]. In spite of the good results, these authors related no association between the findings and the high or low grade intra-epithelial lesions. Multiple site testing increased the number of HPV infected men [14]. Perhaps, the association of peniscopy and the high risk HPV identification by molecular biology technique could be helpful to select the men presenting a greater chance of having a penile high grade intra-epithelial lesion, minimizing the excessive number of unnecessary biopsies.

The objective of this study was to check if the presence of the high risk HPV in the sexual partners of HPV infected women could be helpful to avoid unnecessary penile biopsies in acetowhite lesions.

Material and methods

A non-interventional cross sectional study evaluated, between April 2003 and June 2005, the presence of the high risk HPV-DNA in 54 asymptomatic men who were the sexual partners of women presenting a histopathological diagnosis of any low grade cervical squamous intra-epithelial lesions. In order to avoid confounding factors and enroll a homogeneous study population, all cases of sexual partners of women with high grade lesions were excluded.

The subjects studied underwent a peniscopy using a fourteen time magnification DF Vasconcelos optic colposcope after 5% acetic acid application during two minutes. The lesions were judged by peniscopy as either typical conspicuous or non typical underlying HPV infection.

The material from the genitalia for high risk HPV detection was collected one week prior to the peniscopy exam, scraping the penis (base, body, balano-prepucial folds, prepucium and distal urethra) with a plastic brush, previously dampening the area with a saline solution. The samples were placed in a tube containing a medium (Universal Medium Collection - UCM Digene®) to be tested for high risk HPV-DNA by the second generation hybrid capture technique (Digene®). The material was processed according to manufacturer`s guidelines for the identification of high risk HPV-DNA which involves the sequence of key bases for HPV types 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68.

Parallel to the qualitative results, quantitative results were obtained and were expressed in the relative light unit (RLU), suggesting the viral load. Each test was processed with positive and negative controls in triplicate. The quantitative results were not considered as they were not one of the study objectives.

The peniscopy as described (10), followed the following steps: examination of genital area without acetic acid. The penis and scrotum were sprayed with 5% acetic acid and peniscopy was performed after 5 minutes had past. If an acetowhite lesion was observed, a biopsy was performed under local anesthesia (2% lidocaine).

The biopsies were placed in formaldehyde and processed for the elaboration of paraffin tissue blocks which were then submitted to 5 μm cuts and colored in hematoxiline-eosine for morphological diagnosis, being classified as normal/ inflammatory tissue, condyloma, intra-epithelial neoplasia (PIN) I, II or III and carcinoma according to Cubilla et al (2000) [15].

Results

The age of the studied partners varied between 18 and 60 years (average 29± 9.4 years). Hybrid capture technique identified high risk HPV in 14 of the 54 asymptomatic sexual partners of women presenting low grade uterine cervix squamous intra-epithelial lesions (25.9%). Peniscopy revealed 13 acetowhite lesions (24.07%), which led to genital biopsy.

Hybrid capture 2 was positive for high risk HPV in 4 of the 13 cases with acetowhite lesions (30.7%) and in 10 of the 41 cases (24.3%) without acetowhite lesions (p=0.64) (Table 1). However, when analyzing the histological results, it was observed that among the 13 biopsy cases, there were 5 (38.5%) in which the result pointed out some significant alteration associated to HPV (two condilomas, two PIN I and one PIN II), and only one negative case for HPV. Among those five cases, four were positive for high risk HPV (Table 2). The remaining eight cases (61.5%), presented normal histological results and negative hc2. Among the 40 cases with negative hc2, peniscopy led to biopsy in 9 cases (22.5%), however the histological result showed a significant result in only one case (11.1%). Contrary to that, the positive cases for high risk HPV, presented four cases of squamous intra-epithelial lesions (two condilomas, one PIN I and one PIN II). Nevertheless, among 9 biopsies there was only one PIN 1 in the negative cases. The positive hc2 test for high risk HPV presented 80% sensitivity, 100% specificity, 100% positive predictive value and 88.9% negative predictive value for the identification of penile intra-epithelial lesions. In general, cases which were positive for high risk HPV with a positive peniscopy had a greater chance of presenting a high or low grade intra-epithelial lesion (p = 0.007), (OR = 51; CI 1.7-1527.1). The men who did not undergo biopsy (41 cases without acetowhite lesions), presented positive hc2 for high risk HPV in 24.3% of the cases.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
DESENVOLVIMENTO DE COLEÇÃO

Discussion

The real incidence and prevalence for HPV infection in asymptomatic men are difficult to be estimated due mainly to the silent behavior of HPV not only in men but in women also. The role of the sexual partner of women presenting HPV associated lesions has been widely discussed, being that there is no established agreement about the importance that this partner has to the woman or even the risk this partner presents in progressing serious lesions himself [10]. Studies have observed that the diagnosis and treatment of the acetowhite lesions in men do not alter or improve the progress of the squamous intra-epithelial lesions in their female partners [7,10], but, the acetowhite lesions on masculine genitalia which were in fact squamous intra-epithelial alterations should not be left untreated, due to the risk of these lesions developing [15,16]. The asymptomatic male sexual partner has been the focus of studies in order to verify the risk of continuing to reinfect his sexual partner. However, penile neoplasias have been presenting expressive rates all over the world [15, 17]. Thus, the identification of all the precocious diagnostic methods, which do not expose these men to unnecessary invasive procedures but that also do not leave important lesions without diagnosis and treatment, are necessary. These studied cases included asymptomatic partners of women who were morphologically diagnosed as carriers of low grade squamous intra-epithelial lesions and presented a positive hybrid capture test for high risk HPV. In this study, high risk HPV can be found in 25.9% of the asymptomatic individuals, contrary to other authors [9] that observed 70% prevalence in the sexual partners of women with HPV. Perhaps the methodological differences could explain this discrepancy. Contrary to the study herewith some authors tested the low and high risk lesions and used the *s*pecimen transport medium (STM), but not the Universal transport medium (UCM), as we had used. On the other hand, partners of positive HPV women have been studied, without concomitant

histopathological result, including latent HPV infection. Only in 36.7% of cases was there concordance of viral groups. Another study of partners of women with squamous intra-epithelial lesions identified HPV in 59% of the cases [18]. Even though these findings might not corroborate our findings, some researchers found even smaller numbers than ours (1.3% in voluntary men and 18.5% in sexual partners complaining of urethritis)[19].

Some initial studies using partners of women with SIL, observed that 30% of these men presented PIN associated to HPV infection [20]. Circumcised partners presented a 5.5% HPV detection and non-circumcised a 19.6% HPV detection [4] . The odds ratio for persistent infection was 0.10 (95% CI, 0-0.87) in men who reported being circumcised compared with those who did not. [18].

These data show that despite the numbers, the findings of HPV-DNA in the genitalia of sexually active people are relatively high and do not indicate with safety the presence of penile intra-epithelial neoplasias. On the other hand, peniscopy seems to indicate many unnecessary invasive procedures. Peniscopy has been considered by some authors [7, 12, 19, 21, 22] as a very low specific test, indicating many biopsies in which the histological result is normal. In this study, approximately a quarter of the asymptomatic sexual partners (24.1%) of women with HPV were submitted to biopsy, demanding the use of injections with local anesthetics for the removal of the fragment of skin or mucosa and some cases even stitches. Among the 13 biopsies, only 5 cases (38.4%) were diagnosed as squamous intra-epithelial lesions.

However, when associating the HPV-DNA identification test to the cases of altered peniscopy, 4 out of 4 cases presented squamous intra-epithelial lesions. At the same time, in 9 cases the test for high risk HPV was negative, only one presented a squamous intraepithelial lesion. These findings suggest that the association of the hc2 test to the peniscopy could

select the men which needed biopsies, minimizing the unnecessary invasive procedures. These data presented findings similar to those of other authors [9, 18].

The presence of the high risk HPV-DNA in partners does not necessarily imply in having disease or even high grade intra-epithelial lesions, however, it is necessary to advice gynecologists and/or urologists on whether there is the need or not for the investigation of the sexual partner of women infected by HPV. The follow up of partners for the reduction of post-treatment recurrences of infection in their female partners with HPV seems unnecessary, it is very important to identify penile intra-epithelial neoplasia (PIN).

In order to conclude if asymptomatic sexual partners of women infected by HPV could be benefited from doing the test for high risk HPV-DNA associated to peniscopy, it would be necessary to increase the number of studied cases and involve different populations in a new prospective study. In the future, it would be interesting, that more information about each individual should be evaluated before biopsies are carried out and one of the considerations should be the presence of high risk HPV.

References:

[1] Viscidi RP. Epidemiology of genital tract Human papillomavirus infections. In: Apgar BS, Brotzman GL, Spitzer M. Colposcopy: principles and practice. 1 Ed. W.B. Sunders Company. Philadelphia 2002. p: 1-22.

[2] Chen YC; Hunter DJ. Molecular Epidemiology of Cancer. CA Cancer J Clin 2005;55:45–54

[3] Svare E I, Kjaer S K, Worm A M, Østerlind A, Meijer C J L M, van den Brule A J C. Risk factors for genital HPV DNA in men resemble those found in women: a study of male attendees at a Danish STD clinic. Sex Transm Infect 2002; 78:215–8.

[4] Castellsagué X, Bosch FX, Muñoz N et al - the International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Male Circumcision, Penile Human Papillomavirus Infection, and Cervical Cancer in Female Partners. N. Engl. J. Med 2002; 346: 1105-12.

[5] Bleeker MC; Berkhof J; Hogewoing CJ, Voorhorst FJ, van den Brule AJ; Starink TM; Snijders PJ; Meijer CJ. HPV type concordance in sexual couples determines the effect of condoms on regression of plat penile lesions. Br J Cancer 2005; 92:1388-92.

[6] von Krogh G, Lacey C J N, Gross G, Barrasso R, Schneider A. European course on HPV associated pathology: guidelines for primary care physicians for the diagnosis and management of anogenital warts. Sex Transm Inf 2000; 76: 162

[7] Teixeira JC, Derchain SFM, Teixeira LC, Santos CC, Panetta K, Zeferino LC. Avaliação do Parceiro Sexual e Risco de Recidivas em Mulheres Tratadas por Lesões Genitais Induzidas por Papilomavírus Humano (HPV). RBGO 2002;24: 315-20.

[8] Leyva-López AG, Aranda-Flores CE, Conde-González C, Lazcano-Ponce EC. La baja utilidad de la determinación del ADN del VPH en la región distal de la uretra masculina. Salud Publica Mex 2003;45 supl 5:S589-S593.

[9] Nicolau SM, Camargo CG, Stavale JN, Castelo A, Dores GB, Lorincz A, and Lima GR. Human papillomavirus DNA detection in male sexual partners of women with genital human papillomavirus infection.Urology 2005; 65: 251-5.

[10] Pinto PA & Mellinger BC. HPV in male patient. Urol Clin Nor Am 1999; 26:797-810.

[11] Rosenblatt C; Lucon AM; Pereyra EA; Pinotti JA; Arap S; Ruiz CA. HPV prevalence among partners of women with cervical intraepithelial neoplasia. Int J Gynaecol Obstet2004; 84:156-61.

[12] Wikstrom A, Hedblad MA, Johansson B, Kalantari M, Syrjanen S, Lindberg M, von Krogh G. Acetic acid test in evaluation of subclinical genital papillomavirus infection: acomparative study on penoscopy, histopathology, virology and scanning electron microscopy findings.Genitourin Med1992; 68:90–99.

[13] Kumar B; Gupta S. The acetowhite test in genital human Papillomavirus infection in men: what does it add? J Eur Acad Dermatol Venereol 2001; 15:27-9.

[14] Weaver BA; Feng Q; Holmes KK; Kiviat N; Lee SK; Meyer C; Stern M; Koutsky LA. Evaluation of genital sites and sampling techniques for detection of human Papillomavirus DNA in men. J Infect Dis 2004; 189:677-85.

[15] Cubilla AL, Meijer CJ, Young RH. Morphological features of epithelial abnormalities and precancerous lesions of the penis. Scand J Urol Nephrol Suppl, 2000;205: 215-9.

[16] Dillner J; von Krogh G; Horenblas S; Meijer CJ. Etiology of squamous cell carcinoma of the penis. Scand J Urol Nephrol Suppl, 2000; 205: 189-93.

[17] Newton R;, Bousarghin L; Ziegler J; Casabonne D; Beral V; Mbidde E; Carpenter L; Parkin DM; Wabinga H; Mbulaiteye S; Jaffe H; Touze A; Coursaget P;Uganda Kaposi's Sarcoma Study Group. Human papillomaviruses and cancer in Uganda. Eur J Cancer Prev 2004; 13: 113-8.

[18] Bleeker MC, Hogewoning CJ, Van Den Brule AJ, Voorhorst FJ, Van Andel RE, Risse EK, Starink TM, Meijer CJ. Penile lesions and human papillomavirus in male sexual partners of women with cervical intraepithelial neoplasia. J Am Acad Dermatol 2002; 47: 351-7.

[19] Takahashi S; Shimizu T; Takeyama K; Kunishima Y; Hotta H et al. Detection of human papillomavirus DNA on the external genitalia of healthy men and male patients with urethritis. Sex Transm Dis 2003; 30:629-33.

[20] Aynaud O; Ionesco M; Barrasso R . Male genital examination: the usefulness of penis endoscopy and the acetic acid test for the detection of papillomavirus lesions. Ann Urol (Paris) 1992; 26: 53-7.

[21] Lajous M; Mueller N; Cruz-Valdéz A; Aguilar LV; Franceschi S; Hernández Ávila M; Lazcano-Ponce E. Determinants of Prevalence, Acquisition, and Persistence of Human Papillomavirus in Healthy Mexican Military Men. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention 2005; 14: 1710-6.

[22] Levine RU, Crum CP, Herman E, Silvers D, Ferenczy A, Richart RM. Cervical papillomavirus infection and intraepithelial neoplasia: a study of male sexual partners. Obstet Gynecol 1984; 64:16-20.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
CESAR LATTES
DESENVOLVIMENTO DE COLEÇÃO

Table 1. Genital aceto-white lesions viewed by peniscopy in asymptomatic sexual partners of women with HPV, according to the presence of high risk HPV

High risk HPV	Aceto-white lesions in peniscopy				p	OR	(IC-95%)
	Positive		Negative				
	N	(%)	N	(%)			
Positive	4	(30.7)	10	(24.3)	0.64	1.42	(0.28-6.55)
Negative	9	(69.3)	31	(75.7)			
Total	13	(100)	41	(100)			

Fisher's exat test OR = odds ratio

Table 2. Histological results of 13 aceto-white lesions on masculine genitals which were biopsied under the guidance of peniscopy according to the presence of high risk HPV

High risk HPV	Histological results				p	OR	(IC-95%)
	Abnormal			Normal			
	Condiloma	PIN I	PIN II				
Positive	2 (15.4)	1 (7.7)	1 (7.7)	0	0,007	51	(1.7-1527.1)
Negative	0	1 (7.7)	0	8 (61.5)			

Fisher's exact test OR = Odds ratio PIN = Penile intra-epithelial neoplasia
Sensitivity = 80% Specificity = 100% Positive predictive value = 100%
Negative predictive value = 88.9%

4. Discussão

A participação do papilomavirus humano (HPV) de alto risco na oncogênese de lesões escamosas, através de sua ação sobre proteínas da célula hospedeira que, em condições normais, atuariam protegendo a integridade tecidual, por meio de mecanismos de controle da proliferação celular e indução da apoptose, tem sido bastante estudada e, embora o HPV de alto risco não seja o único fator, sem dúvida é o mais importante neste processo. Assim, a identificação de HPV de alto risco e de proteínas que resultam de sua influência sobre o ciclo celular passam a ter grande importância, podendo ter utilidade prática diagnóstica e prognóstica. Dentre as proteínas mais estudas aquelas que observamos como melhor relacionadas à identificação de lesões de alto grau e com um potencial valor não só diagnóstico, mas também prognóstico, foram o MIB-1 (Ki67) e a $p16^{INK4a}$.

Apesar de o histopatológico ser considerado padrão-ouro no diagnóstico de lesões escamosas, muitos autores têm demonstrado que a reprodutibilidade inter e mesmo intra-observador pode não ser tão boa, com baixos índices de concordância (Keating et al., 2001; Klaes et al., 2002). Tal fato passou a ser

encarado como um importante fator limitante da morfologia, não só na avaliação de prognóstico das lesões escamosas, mas também no diagnóstico. Assim, a necessidade de marcadores que não só indiquem o prognóstico, mas também auxiliem o diagnóstico de lesões intra-epiteliais escamosas, torna-se evidente.

Tendo-se essencialmente a lesão intra-epitelial escamosa de alto grau como o "end point" em um programa de prevenção, por sua maior potencialidade de evoluir para invasão (Hausen, 2000), a possibilidade de uso de DNA-HPV de alto risco e de marcadores tumorais como apoio à morfologia passou a ser considerada (Schlecht et al., 2001; Virmani et al., 2001; Bonds et al., 2002; Sharpless et al., 2002; Tsuda et al., 2003; Hudelist et al., 2004; Isaka et al., 2004; Kisseljov et al., 2004;van de Putte et al., 2004). Estudos abordando especificamente marcadores de lesões escamosas em colo uterino, como o MIB 1 (Keating et al., 2001; Pirog et al., 2002; Koyamatsu et al., 2003), p16INK4a (Sano et al., 1998; Nuovo et al., 1999; Hui et al., 2000; Giarre et al., 2001; Keating et al., 2001; Klaes et al., 2002; Murphy et al., 2003; Branca et al., 2004; Negri et al., 2004; Wang et al., 2004; Volgareva et al., 2004; Guimarães et al., 2005; Kalof et al., 2005; Lin et al., 2005) e DNA-HPV de alto risco (De Villiers,1994; Villa, 1998; Schlecht et al., 2001; Eleutério et al., 2002; Tsuda et al., 2003; Hudelist et al., 2004; Isaka et al., 2004; Guimarães et al., 2005; Kalof et al., 2005) têm sido realizados e parecem induzir a idéia de que teriam utilidade diagnóstica e prognóstica para lesões escamosas pré-invasivas. Em especial o $p16^{INK4a}$, que permitiria um menor erro diagnóstico dentro da subjetividade própria do estudo histopatológico, conforme pudemos observar no material de revisão dos dois primeiros artigos.

No presente estudo, motivo do terceiro artigo, procuramos afastar a subjetividade morfológica através de estudo de cortes histológicos de blocos parafina apenas de casos em que, após uma análise cuidadosa, houve concordância cega de dois experientes patologistas, de forma a não comprometer a reprodutibilidade. Foi possível, então, fazer as correlações de concordância com DNA-HPV de alto risco e $p16^{INK4a}$ (através do índice de Kappa), onde o primeiro mostrou-se como excelente método para rastreio, por sua alta sensibilidade e alto valor preditivo negativo, mas o segundo foi o que melhor se apresentou como apoio diagnóstico importante de lesões de alto grau, por sua excelente concordância (Kappa=0,95). Isto demonstra que o uso do marcador pode ser de importante auxílio para o anatomopatologista no diagnóstico mais preciso de lesão intra-epitelial escamosa de alto grau, que eventualmente se mostre como de difícil diferenciação com lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau e com fenômenos reativos e reparativos. Ao mesmo tempo em que poucas lesões de baixo grau expressaram o marcador, vê-se a possibilidade de serem estas as que já apresentariam influência viral sobre o ciclo celular de forma mais importante e com maior probabilidade de evolução, como já defendido em estudos de Klaes et al. (2000) e já demonstrado em um estudo de seguimento realizado por Guimarães et al. (2005).

Na realidade, aqui se observa um uso cujo potencial pode ser de suma importância na identificação de lesões escamosas de maior potencial evolutivo. No entanto, devido às limitações de um estudo de corte transversal ainda são necessários maiores e mais abrangentes amostragens com adequado seguimento dos casos para confirmação dessas hipóteses. Nesta linha continuamos a avaliação

do grupo de mulheres que tiveram suas biópsias analisadas, para observamos como se comportam os casos positivos e nagativos para o $p16^{INK4a}$.

Entre os parceiros de mulheres com lesões intra-epiteliais escamosas cervicais, foram realizados alguns estudos (Bleeker et al., 2002; Castellsagué et al., 2002; Svare et al., 2002; Teixeira et al., 2002; Takahashi et al., 2003; Rosenblatt et al., 2004; Bleeker et al., 2005; Nicolau et al., 2005), sempre abordando a questão da influência destes no sucesso terapêutico das lesões de colo uterino e das suas recidivas.

Nicolau et al (2005), estudando parceiros de mulheres que tinham teste de captura híbrida para HPV de baixo e alto risco positivo, observaram índices de 70% de parceiros com DNA-HPV de baixo e alto risco com sete sítios testados, embora não fossem todos os casos HPV concordantes com as parceiras. Ao passo que Takahashi et al. (2003) observaram positividade do teste em menos de 20% de homens estudados. Neste estudo observamos que, independente de haver ou não lesão na peniscopia, a freqüência de HPV-DNA de alto risco não é significativamente diferente. Sem dúvida, há uma grande variação da freqüência de parceiros com DNA-HPV entre os estudos, conforme a população estudada, de tal sorte que este tipo de avaliação carece de estudos mais bem controlados. Mas, de uma forma geral, os autores parecem não considerar ser importante para o resultado terapêutico e recidiva de lesão na mulher, o diagnóstico de HPV ou de lesão em seu parceiro (Pinto e Mellinger, 1999; Teixeira et al., 2002).

No entanto, talvez devido à raridade do carcinoma de pênis no mundo, até então não se havia estudado a possibilidade de uso de marcador diagnóstico para lesões intra-epiteliais penianas. Mas, o Nordeste do Brasil possui a maior incidência de câncer de pênis no mundo, com cifras que superam 5 por 100.000 novos casos por ano (Eluf Neto, 1998). Muito embora o processo oncogenético do carcinoma escamoso do pênis não esteja tão evoluído em termos de conhecimentos, como o do colo uterino, acredita-se na possibilidade de que lesões precursoras associadas, pelo menos em parte, ao HPV possam estar envolvidas neste processo (Cubilla et al., 2004). Ao mesmo tempo, a identificação de lesões pré-invasoras, bem como lesões benignas, associadas ao HPV, tem sido difícil nos homens. Na realidade, o único recurso que tem sido adotado com maior freqüência para avaliação peniana é a peniscopia. No entanto, este método tem-se demonstrado pouco específico, acarretando um número excessivo de biópsias desnecessárias (Levine et al., 1984; Kumar e Gupta, 2001; Teixeira et al., 2002, Takahashi et al., 2003; Lajous et al., 2005), o que traz alto custo financeiro para o sistema de saúde e para o paciente, além do custo emocional. Assim, este estudo procurou dar uma nova abordagem na avaliação dos parceiros de mulheres com lesões HPV associadas, que foi a identificação de um marcador possível para ajudar no diagnóstico de neoplasia intra-epitelial peniana (PIN) e com conseqüente redução de biópsias negativas.

Conforme pudemos demonstrar, o uso de DNA-HPV de alto risco parece ser uma poderosa arma para o rastreio de indivíduos parceiros de mulheres com lesões intra-epiteliais escamosas para diagnóstico de citopatia por HPV e neoplasias intra-

epiteliais penianas (OR = 50). A avaliação estatística permite ver que o uso associado de peniscopia e DNA-HPV de alto risco por captura híbrida reduziria, de maneira substancial, o número de biópsias desnecessárias, com as conseqüentes repercussões positivas para o paciente e para o próprio sistema de saúde.

Novas pesquisas ainda serão necessárias para sedimentar os conhecimentos adquiridos sobre o uso destes marcadores tumorais, em populações maiores e mais diversificadas, e em seguimento dos casos onde os marcadores foram positivos em relação aos casos negativos para conclusões mais importantes. Estamos apenas no inicio do que pode ser um grande avanço na abordagem das lesões escamosas e de seu potencial evolutivo.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
CÉSAR LATTES
DESENVOLVIMENTO DE COLEÇÃO

Conclusões

5. Conclusões

- Estudos demonstram que existe uma forte tendência à utilização de marcadores como HPV de alto risco e, em especial, $p16^{INK4a}$, para identificação de lesões intra-epitelias escamosas de alto grau, bem como de baixo grau com risco evolutivo.

- Pesquisas específicas para o marcador $p16^{INK4a}$ sugerem forte correlação com diagnóstico de lesão intra-epitelial escamosa de alto grau e de melhora na reprodutibilidade inter e intra-observador.

- A marcação de $p16^{INK4a}$ associa-se melhor com lesão intra-epitelial escamosa de alto grau do que com DNA-HPV de alto risco. Ambos os testes são complementares, o DNA-HPV de alto risco para rastreio e o p16 para definição diagnóstica.

- A identificação de HPV de alto risco em parceiros assintomáticos de mulheres com infecção por HPV poderia ser de ajuda para selecionar homens com lesões penianas acetobrancas que necessitariam de biópsia para diagnóstico de PIN.

Referências Bibliográficas

6. Referências Bibliográficas

Alexander K, Hinds PW. Requirement for p27KIP1 in retinoblastoma proteinmediated senescence. ***Mol Cel Biol*** 2001; 21:3616-31.

An HX, Beckmann MW, Reifenberger G, Bender HG, Niederacher D. Gene amplification and overexpression of CDK4 in sporadic breast carcinomas is associated with high tumor cell proliferation. ***Am J Pathol*** 1999; 154:113-8.

Bienvenu F, Gascan H, Coqueret O. Cyclin D1 represses STAT3 activation through a Cdk4-independent mechanism. ***J Biol Chemist*** 2001; 276:16840-7.

Birindelli S, Perrone F, Oggionni M, Lavarino C, Pasini B, Vergani B. et al. Rb and TP53 Pathway alterations in sporadic and NF1-related malignant peripheral nerve sheath tumors. ***Lab Invest*** 2001; 81:833-44.

Bleeker MC, Hogewoning CJ, Van Den Brule AJ, Voorhorst FJ, Van Andel RE, Risse EK, Starink TM, Meijer CJ. Penile lesions and human papillomavirus in male sexual partners of women with cervical intraepithelial neoplasia. ***J Am Acad Dermatol*** 2002; 47:351-7.

Bleeker MC; Berkhof J; Hogewoing CJ, Voorhorst FJ, van den Brule AJ; Starink TM; Snijders PJ; Meijer CJ. HPV type concordance in sexual couples determines the effect of condoms on regression of plat penile lesions. ***Br J Cancer*** 2005; 92:1388-92.

Bonds L, Baker P, Gup C, Shroyer KR. Immunohistochemical localization of Cdc6 in squamous and glandular neoplasia of the uterine cervix. ***Arch Pathol Lab Med*** 2002;126:1163-8.

Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J et al. Prevalence of Human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) study group. ***J Natl Cancer Inst*** 1995; 87:796-802.

Branca M, Ciotti M, Santini D, Di Bonito L, Giorgi C, Benedetto A et al. p16ink4a expression is related to grade of CIN an high-risk Human papillomavirus but does not predict virus clearance after conization or disease outcome. ***Int J Gynecol Pathol*** 2004; 23:354-65.

Castellsagué X, Bosch FX, Muñoz N, Meijer CJ, Shah KV, Sanjose S, Eluf-Neto J, et al. Male circumcision, penile human papillomavirus infection, and cervical cancer in female partners. ***N Engl J Med*** 2002; 346:1105-12.

Chin L, Pomerantz J, Polsky D, Jacobson M, Cohen C, Cordon-Cardo C, et al. Cooperative effects of INK4a and ras in melanoma susceptibility in vivo. ***Genes Dev*** 1997; 11:2822–34.

Crum CP, Cibas ES, Lee KR. Pathology of early cervical neoplasia. Contemporary issues in surgical pathology, New York: Churchill Linvingstone;1997. 288p.

Cubilla AL, Meijer CJ, Young RH. Morphological features of epithelial abnormalities and precancerous lesions of the penis. ***Scand J Urol Nephrol*** 2000; 205(Suppl.):215-9.

Cubilla AL, Velazquez EF, Young RH. Penile squamous cell carcinoma: a pathologic study of 288 cases. ***Int J Surg Pathol*** 2004;12:351-64.

Dalle JH, Fournier M, Nelken B. p16INK4a immunocytochemical analysis is an independent prognostic factor in childhood acute lymphoblastic leukemia. ***Blood*** 2002; 99:2620-3.

De Villiers EM: Human pathogenic papillomavirus types: an update. ***Curr Trop Microbiol Immnunol*** 1994; 186:1.

Dillner J, von Krogh G, Horenblas S, Meijer CJ. Etiology of squamous cell carcinoma of the penis. ***Scand J Urol Nephrol*** 2000; 205(Suppl.):189-93.

Doki Y, Imoto M, Han EK, Sgambato A, Weinstein IB. Increased expression of the p27KIP1 protein in human esophageal cancer cell lines that overexpress cyclin D1. Carcinogen 1997; 18:1139-48.

Eleutério Jr J, Cavalcante DIM, Teixeira FM, Eleutério RMN. Carga viral de HPV de alto risco por captura híbrida e lesões intra-epiteliais escamosas cervicais. ***Rev Bras An Clin*** 2002; 34:193-4.

Eleutério Jr J. Noções básicas de citologia ginecológica. São Paulo: Ed Santos. 2003.

Eluf Neto J. Epidemiologia das lesões relacionadas ao HPV no trato anogenital. In: Bibbo M, Moraes AM. Lesões relacionadas à infecção por HPV no trato anogenital. Rio de Janeiro: Revinter; 1998. p.51-8.

Giarre M, Caldeira S, Malanchi I, Ciccolini F, Leao MJ, Tommasino M. Induction of pRb degradation by the human papillomavirus type 16 E7 protein is essential to efficiently overcome p16INK4a – imposed G1 cell cycle arrest. ***J Virol*** 2001; 75:4705-12.

Gorgoulis VG, Zacharatos P, Kotsinas A, Liloglou T, Kyroudi A, Veslemes M, et al. Alterations of p16-pRb pathway and the chromosome locus 9p21-22 in non-small-cell lung carcinomas – relationship with p53 and MDM2 protein expression. ***Am J Pathol*** 1998; 153:1749-65.

Graf Einsiedel HG, Taube T, Hartmann R, Wellmann S, Seifert G, Henze G, et al. Deletion analysis of p16INKa and p15INKb in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. ***Blood*** 2002; 99:4629-31.

Guimarães MC, Gonçalves MA, Soares CP, Bettini JS, Duarte RA, Soares EG. Immunohistochemical expression of p16INK4a and bcl-2 according to HPV type and to the progression of cervical squamous intraepithelial lesions. ***J Histochem Cytochem*** 2005; 53:509-16.

Gupta S, Takhar PP, Degenkolbe R, Koh CH, Zimmermann H, Yang CM et al. The Human papillomavirus type 11 and 16 E6 proteins modulate the cell cycle regulator and transcription cofactor TRIP-Br1. Virology 2003; 317:155-64.

Hausen HZ. Papillomaviruses Causing Cancer: Evasion From Host-Cell Control in Early Events in Carcinogenesis. ***J Natl Cancer Inst*** 2000; 92:690-8.

Hudelist G, Manavi M, Pischinger KI, Watkins-Riedel T, Singer CF, Kubista E, Czerwenka KF. Physical state and expression of HPV DNA in benign anddysplastic cervical tissue: different level of viral integration are correlated with lesion grade. ***Gynecol Oncol*** 2004; 92:873-80.

Huang L, Chao S, Hwang J. Human papillomavirus 31 related types predict better survival in cervical cancer. ***Cancer*** 2003; 100:327-34.

Hui R, Macmillan RD, Kenny FS, Musgrove EA, Blamey RW, Nicholson RI, et al. INK4a gene expression and methylation in primary breast cancer: overexpression of p16INK4a messenger RNA is a marker of poor prognosis. ***Clin Cancer Res*** 2000; 6:2777-87.

IARC – WHO. Globocan 2002. Cancer, mortality and prevalence worldwide. Available Internet <www-dep.iarc.fr> (2005; September, 02).

INCA. Estimativa 2005 – INCA. Available Internet <http://www.inca.gov.br/estimativa/2005> (2005;September, 26)

Isaka K, Nishi H, Osakabe Y, Miyata M, Hokamura M, Nakada T, et al. Establishment of a HPV and p53-mutations-negative human cell line (CA) derived from a squamous carcinoma of the uterine cervix. ***Gynecol Oncol*** 2004; 92:15-21.

Jarrard DF, Sarkar S, Shi Y, Yeager TR, Magrane G, Kinoshita H, et al. p16/pRb Pathway alterations are required for bypassing senescence in humanprostate epithelial cells. ***Canc Res*** 1999; 59:2957-64.

Kalof AN, Evans MF, Simmons-Arnold L, Beatty BG, Cooper K. p16INK4a immunoexpression an HPV in situ hybridization signal patterns potencial markers of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. ***Am J Surg Pathol*** 2005; 29:674-9.

Keating JT, Cviko A, Riethdorf S, Riethdorf L, Quade BJ, Sun D et al. Ki- 67, cyclin E and p16INK4a are complimetary surrogate biomarkers for Human papillomavirus - related cervical neoplasia. ***Am J Sur Pathol*** 2001; 25:884- 91.

Kisseljov FL, Mazurenko NN, Volgareva GM, Kisseljova NP. Interaction between viral and cell genes in cervical tumors. ***Mol Biol*** 2004; 38:224-32.

Klaes R, Benner A, Friedrich T, Ridder R, Herrington S, Jenkins D, et al. p16INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. ***Am J Surg Pathol*** 2002; 26:1389-99.

Koyamatsu Y, Yokoyama M, Nakao Y et al. A comparative analysis of Human papillomavirus types 16 and 18 and expression of p53 gene and Ki-67 in cervical, vaginal and vulvar carcinoma. ***Gynecol Oncol*** 2003; 90:547-51.

Kruse AJ, Skaland I, Janssen EA, Buhr-Wildhagen S, Klos J, Arends MJ, et al. Quantitative molecular parameters to identify low-risk and high-risk early CIN lesions: role of markers of proliferative activity and differentiation and Rb availability. ***Int J Gynecol Pathol*** 2004; 23:100-9.

Kumar B; Gupta S. The acetowhite test in genital human Papillomavirus infection in men: what does it add? ***J Eur Acad Dermatol Venereol*** 2001; 15:27-9.

Lajous M; Mueller N; Cruz-Valdéz A; Aguilar LV; Franceschi S; HernándezÁvila M; Lazcano-Ponce E. Determinants of prevalence, acquisition, and persistence of human papillomavirus in healthy mexican military men. cancer epidemiology ***Biom Prevent*** 2005; 14:1710-6.

Levine RU, Crum CP, Herman E, Silvers D, Ferenczy A, Richart RM. Cervical papillomavirus infection and intraepithelial neoplasia: a study of male sexual partners. ***Obstet Gynecol*** 1984; 64:16-20.

Leyva-López AG, Aranda-Flores CE, Conde-González C, Lazcano-Ponce EC. La baja utilidad de la determinación del ADN del VPH en la región distal de la uretra masculina. ***Salud Publica Mex*** 2003; 45(Suppl 5):589-93.

Li LC, Zhao H, Shiina H, Kane CJ, Dahiya R. Pgdb: a curated and integrated database of genesrelated to the prostate. ***Nucleic Acids Res*** 2003; 31:291-3.

Lin Z, Gao M, Zhang X, Kim YS, Lee S, Kim HK et al. The hypermethylation and protein expression of p16INK4a and DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase in various uterine cervical lesions. ***J Cancer Res Clin Oncol*** 2005;131:364-70.

Lukas J, Petersen Bo, Holm K, Bartek J, Helin K. Deregulated expression of E2F family members induces S-phase entry and overcomes p16INK4a – mediated growth suppression. ***Mol Cell Biol*** 1996;16:1047-57.

Mack PC, Gandara DR, Bowen C, Edelman MJ, Paglieroni T, Schnier JB, et al. RB status as a determinant of response to UCN-01 in non-small-cell lung carcinoma. ***Clin Canc Res*** 1999; 5:2596-604.

Monk BJ, Wiley DJ. Human papillomavirus infections: truth or consequences. ***Cancer*** 2003; 100:225-7.

Murphy N, Ring M, Killalea AG, Uhlman V, O`Donovan M, Mulcahy F et al. p16INK4a as a marker for cervical dyskariosis: CIN and cGIN in cervical biopsies and thinprep smears. ***J Clin Pathol*** 2003; 56:56-63.

Nasiell K, Nasiell M, Vaclavinkova V. Behavior of moderate cervical dysplasia during long-term follow-up. ***Obstet Gynecol***. 1983; 61:609-14.

Negri G, Vitadello F, Romano F, Kasal A, Girlando S, Mian C et al. p16INK4a expression and progression risk of low grade intraepithelial neoplasia of the cervix uteri. ***Virchows Arch*** 2004; 445:616-20.

Newton R, Bousarghin L, Ziegler J, Casabonne D, Beral V, Mbidde E, et al. Human papillomaviruses and cancer in Uganda. ***Eur J Cancer Prev*** 2004; 13:113-8.

Nicolau SM, Camargo CG, Stavale JN, Castelo A, Dores GB, Lorincz A, et al. Human papillomavirus DNA detection in male sexual partners of women with genital human papillomavirus infection.***Urology*** 2005; 65:251-5.

Nuovo GJ, Plaia TW, Belinsky SA et al. In situ detection of the hypermethylation-induced inactivation of the p16 gene as an early event in oncogenesis. ***PNAS*** 1999; 96:12754-9.

Omura-Minamisawa M, Dicciani MB, Batova A, Chang RC, Bridgeman LI, Yu J, et al. Universal inactivation of both p16 e p15 but not downstream components is an essential event in the pathogenesis of T-cell acute lymphoblastic leukemia. ***Clin Can Res*** 2000; 6:1219-28.

O'Neill, Mccluggage. p16 expression in the female tract and its value in diagnosis. ***Adv Anat Pathol*** 2006; 13:8-15.

Parkin DM, Muir CS, Whelan SL, GAO Y, Ferlay J, Powell J. Cancer Incidence in Five Continents. Volume VI.Lyon: IARC Scientific Publications no 120,1992.

Pfister H. Papel do Papilomavírus humano no câncer anogenital. In: Lörincz AT, Reid R. Clínicas Obstétricas e Ginecológicas da América do Norte –Papilomavírus humano I. Rio de Janeiro: Interlivros; 1996. p.565-80.

Pinto PA, Mellinger BC. HPV in male patient. ***Urol Clin Nor Am*** 1999; 26:797-810.

UNICAMP
BIBLIOTECA CE

Pirog E, Baergen RN, Soslow RA, Tam D, DeMattia, AE, Chen YT, et al. Diagnostic accuracy of cervical low-grade squamous intraepithelial lesions is improved with MIB 1 immunostaining. ***Am J Surg Pathol*** 2002; 26:70-5.

Pollock PM, Welch J, Hayward NK. Evidence for three tumor suppressor loci on chromosome 9p involved in melanoma development. ***Cancer Res*** 2001; 61:1154-61.

Ragione FD, Russo GL, Oliva A, Mercurio C, Mastropietro S, Pietra VD, Zappia V. Biochemical characterization of p16INK4a- and p18-containing complexes in human cell lines. ***J Biol Chemist*** 1996; 271:15942-9.

Rasool O, Heyman M, Heyman LB, Brandter LB, Liu Y, Grander D, et al. p15ink4B and p16ink4 gene inactivation in acute lymphocytic leukemia. ***Blood*** 1995; 85:3431-6.

Rosenblatt C, Lucon AM, Pereyra EA, Pinotti JA, Arap S, Ruiz CA. HPV prevalence among partners of women with cervical intraepithelial neoplasia. ***Int J Gynaecol Obstet*** 2004; 84:156-61.

Rubin MA, Kleter B, Zhou M, Ayala G, Cubilla AL, Quint WGV, Pirog EC. Detection and typing of Human Papillomavirus DNA in penile carcinoma - evidence for multiple independent pathways of penile carcinogenesis. ***Am J Pathol*** 2001,159:1211-8.

Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, Fukuda T, Nakajima T. Expression status of p16 protein is associated with Human papillomavirus oncogenic potencial in cervical and genital lesions. ***Am J Pathol*** 1998; 153:1741-7.

Saslow D, Castle PE, Cox JT, Davey DD, Einstein MH, Ferris DG, et al. American Cancer Society Guideline for Human Papillomavirus (HPV) Vaccine Use to Prevent Cervical Cancer and Its Precursors. ***CA Cancer J Clin*** 2007; 57:7-28

Schifman M, Castle PE. Human papillomavirus - epidemiology and public health. ***Arch Pathol Lab Med*** 2003; 1271:930-4.

Schlecht NF, Kulaga S, Robitaille J, Ferreira S, Santos M, Miyamura RA, et al. Persistent Human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. ***JAMA*** 2001; 286:3106-14.

Sharpless N, Alson S, Chan S, Silver DP, Castrillon DH, DePinho RA. p16INK4a and p53 deficiency cooperate in tumorigenesis. ***Cancer Res*** 2002; 62:2761-5.

Svare EI, Kjaer SK, Worm AM, Østerlind A, Meijer CJLM, van den Brule AJC. Risk factors for genital HPV DNA in men resemble those found in women: a study of male attendees at a Danish STD clinic. ***Sex Transm Infect*** 2002; 78:215-8.

Sweetser DA, Chen CS, Blomberg AA, Flowers DA, Galipeau PC, Barrett MT, et al. Loss of heterozygosity in childhood de novo acute myelogenous leukemia. ***Blood*** 2001; 98:1188-94.

Takahashi S, Shimizu T, Takeyama K, Kunishima Y, Hotta H, et al. Detection of human papillomavirus DNA on the external genitalia of healthy men and male patients with urethritis. ***Sex Transm Dis*** 2003; 30:629-33.

Tam AS, Devereux TR, Patel AC, Foley JF, Maronpot RR, Massey TE. Perturbations of the INK4a/Arf gene locus in aflatoxin B1-induced mouse lung tumors. ***Carcinogen*** 2003; 24:121-32.

Teixeira JC, Derchain SFM, Teixeira LC, Santos CC, Panetta K, Zeferino LC. Avaliação do parceiro sexual e risco de recidivas em mulheres tratadas por lesões genitais induzidas por papilomavírus humano (HPV). ***RBGO*** 2002; 24:315-20.

Tsuda H, Hashiguchi Y, Nishimura S, Kawamura N, Inoue T, Yamamoto K. Relationship between HPV typing and abnormality of 1 cell cycle regulators in cervical neoplasm. ***Gynecol Oncol*** 2003; 91:476-85.

Van De Putte G, Kristensen GB, Lie AK, Baekelandt M, Holm R. Cyclins and proliferation markers in early squamous cervical carcinoma. ***Gynecol Oncol*** 2004; 92:40-6.

Villa LL. Aspectos moleculares da oncogênese por Papilomavírus. In: Bibbo M, Moraes AM. Lesões relacionadas à infecção por HPV no trato anogenital. Rio de Janeiro: Revinter; 1998. p.51-8.

Villuendas R, Sanchez-Beato M, Martinez JC, Saez AI, Martinez-Delgado B, Garcia JF, et al. Loss of p16/INK4A protein expression in non-Hodgkin's lymphomas is a frequent finding associated with tumor progression. ***Am J Pathol*** 1998; 153:887-97

Virmani AK, Muller C, Rathi A, Zoechbauer-Mueller S, Mathis M, Gazdar AF. Molecular oncology, markers, clinical correlates - aberrant methylation during cervical carcinogenesis. ***Clin Can Res*** 2001; 7:584-9.

Viscidi RP. Epidemiology of genital tract Human papillomavirus infections. In: Apgar BS, Brotzman GL, Spitzer M. Colposcopy: principles and practice. 1st Ed. Philadelphia: W.B. Sunders Company; 2002. p.1-22.

Volgareva G, Zavalishina L, Andreeva Y, Frank G, Krutikova E, Golovina D, et al. Protein p16 as a marker of dispastic and neoplastic alterations in cervical epithelial cells. ***BMC Cancer*** 2004; 4:58-68.

Wieland U, Pfister H. Papillomaviruses in human pathology: epidemiology, pathogenesis and oncogenic role. In: Gross GE, Barrasso R. Human papillomavirus infection - a clinical atlas. Wiesbaden: Ulstein Mosby; 1997. p.1-20.

Wright TC, Kurman RJ, Ferenczy A. Carcinoma and other tumours of the cervix . In: Kurman RJ. Blaunstein's pathology of the female genital tract. 4th Ed. Baltimore: Spring – Verlag. 1994. p.279-326.

Yamamoto LSU, Alves VAF. Histórico. In:Bibbo M, Moraes AM. Lesões relacionadas a infecção por HPV no trato anogenital. Rio de Janeiro: Revinter 1998. p.1-7.

Bibliografias de Normatizações

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
CÉSAR LATTES
DESENVOLVIMENTO DE COLEÇÃO

7. Bibliografia de Normatizações

França JL, Borges SM, Vasconcellos AC, Magalhães MHA. **Manual para normatização de publicações técnico-científicas**. 4ª ed., Editora UFMG, Belo Horizonte, 1998. 213p.

Normas e procedimentos para publicação de dissertações e teses. Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP. Ed. SAD – Deliberação CCPG-001/98 (alterada 2005).