

JOANA FRÓES BRAGANÇA BASTOS

**EXPRESSÃO DO p16^{INK4a} E DO p53 COMO MARCADORES
PROGNÓSTICOS DA NEOPLASIA INTRA-EPITELIAL
CERVICAL E SUA RELAÇÃO COM O PAPILOMAVÍRUS
HUMANO DE ALTO RISCO ONCOGÊNICO**

Tese de Doutorado

**ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. SOPHIE FRANÇOISE M. DERCHAIN
CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. LUIS OTÁVIO SARIAN**

**Unicamp
2007**

JOANA FRÓES BRAGANÇA BASTOS

**EXPRESSÃO DO p16^{INK4a} E DO p53 COMO MARCADORES
PROGNÓSTICOS DA NEOPLASIA INTRA-EPITELIAL
CERVICAL E SUA RELAÇÃO COM O PAPILOMAVÍRUS
HUMANO DE ALTO RISCO ONCOGÊNICO**

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

**ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. SOPHIE FRANÇOISE M. DERCHAIN
CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. LUIS OTÁVIO SARIAN**

**Unicamp
2007**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

B298e Bastos, Joana Fróes Bragança
Expressão do p16INK4a e do p53 como marcadores
prognósticos da neoplasia intra-epitelial cervical e sua
relação com o Papilomavirus humano de alto risco
oncogênico / Joana Fróes Bragança Bastos. Campinas,
SP: [s.n.], 2007.

Orientadores: Sophie Françoise Mauricette
Derchain, Luis Otávio Sarian
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Neoplasia Intra-Epitelial Cervical. 2. Marcadores
Biológicos. 3. Imunohistoquímica. 4. Colo uterino - Cancer.
I. Derchain, Sophie Françoise Mauricette. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
III. Título.

Título em inglês : Expression of p16INK4a and of p53 as prognostic markers of cervical
intraepithelial neoplasia and their relationship with high risk human papillomavirus

Keywords:

- Cervical intraepithelial neoplasia
- Biological marker
- Immunohistochemistry

Titulação: Doutor em Tocoginecologia
Área de concentração: Tocoginecologia

Banca examinadora:

Profa. Dra Sophie Françoise Mauricette Derchain
Prof. Dr. Gustavo Antonio de Souza
Prof. Dr. José Roberto Erbolato Gabiati
Prof. Dr. Sérgio Mancini Nicolau
Prof. Dr. André Luis Ferreira dos Santos

Data da defesa: 02 - 10 - 2007

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

Aluna: JOANA FRÓES BRAGANÇA BASTOS

Orientadora: Prof^a. Dr^a. SOPHIE FRANÇOISE M. DERCHAIN

Co-Orientador: Prof. Dr. LUIS OTÁVIO SARIAN

Membros:

1.

Sop. Der

2.

Luiz Otávio Sarian

3.

Luiz Otávio Sarian

4.

Luiz Otávio Sarian

5.

Luiz Otávio Sarian

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

Data: 02/10/2007

Dedico este trabalho...

*A minha Tia Lídice (in memorian),
que esteve e sempre estará presente em minha vida.*

*A meu filho, João Pedro,
que me fez mãe e iluminou minha vida
e a minha filha Ana,
que me faz revisitar a todo dia, com sua graça e ternura,
as sutilezas do mundo feminino.*

*Ao Pedro,
que me deu meus filhos e me ensinou a viver a dois.*

*Aos meus pais, Vânia e Aníbal,
por tudo.*

*A minhas irmãs, Hermínia e Celina,
mulheres corajosas, pelos seus exemplos e companheirismo.*

*Aos meus novos irmãos, Enrico e Miguel,
meu amor incondicional.*

Agradecimentos

À mestra Profa. Dra. Sophie Françoise Mauricette Derchain, que, com sua grande generosidade e sua cabeça fervilhante de novas idéias me orientou no mundo da pesquisa.

Ao querido amigo Luís Otávio Zanatta Sarian, pela co-orientação inteligente e incansável, e pela amizade tão definitiva em minha vida.

À Dra. Adriana Yoshida e Ana Beartriz Maito pela ajuda inestimável nos trabalhos de laboratório.

À Profa. Dra. Liliana Andrade que com sua delicadeza e sabedoria me orientou no mundo da imuno-histoquímica.

Ao Prof. Dr. José Vassalo, Dr. Francisco Pignataro e ao Dr. André Schenka pela supervisão da leitura das lâminas e revisão dos artigos.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Zeferino pelo apoio e exemplo profissional.

Ao Prof. Dr. Luiz Bahamondes, pelo apoio institucional do Departamento de Tocoginecologia.

Ao Prof. Dr. Gustavo Antonio de Souza, pelo suporte da área de Oncologia Ginecológica do CAISM.

Aos amigos do Laboratório de Patologia Experimental: Glauce Aparecida Pinto, Marisa de Almeida Matsura, Eduardo Prates, Priscila Biancchi Jannine, Júlio César Moraes pela paciência e apoio sempre presentes.

Às biólogas Denise Rocha Pita, Elizabete Campos e Lúcia Carvalho, pelo processamento dos exames de Captura de Híbridos 2.

Aos Professores Salete da Costa Gurgel, José Roberto Gabiatti e Júlio César Teixeira pelas valiosas avaliações no processo de qualificação, muitas delas incorporadas a esta tese.

À Margarete Souza Donadon, secretária da pós-graduação, pelo apoio durante os trâmites burocráticos.

Aos amigos Neusa Balducci, Sônia Pianca, Débora Fernanda, Anderson Valderrama da secretaria da área de oncologia, pela boa vontade e auxílio logístico.

Às amigas Regina Célia Nogueira Gomes e Patrícia Negrão, exemplos de mulheres e médicas, pela amizade e apoio sempre presentes.

Este estudo foi financiado pela
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP),
processos números 00/06394-0, 04/09309-5 e 06/01521-0 e
Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq),
processo número 307252/2004-3.

Sumário

Símbolos, Siglas e Abreviaturas	ix
Resumo	xi
Summary	xiii
1. Introdução	15
2. Objetivos	25
2.1. Objetivo Geral.....	25
2.2. Objetivos Específicos	25
3. Publicações.....	26
3.1. Artigo 1	26
3.2. Artigo 2	43
4. Discussão.....	62
5. Conclusões	66
6. Referências Bibliográficas.....	67
7. Anexos	75
7.1. Anexo 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	75
7.2. Anexo 2– Paracer do Comitê de Ética em pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas- Unicamp	77
7.3. Anexo 3 – Painel imuno-histoquímico :.....	79
7.4. Anexo 4 – Mini-currículo da candidata desde o seu ingresso na pós- graduação	81

Símbolos, Siglas e Abreviaturas

°C	Graus Celsius; <i>Celsius degrees</i>
CAF	Cirurgia de alta frequência
CAISM	Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CH2/HC2	Captura Híbrida 2 (<i>Hybrid Capture 2</i>)
CI/IC	Intervalo de confiança (<i>Confidence interval</i>)
CO	Colpocitologia oncológica
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DNA	Ácido desoxirribonucléico; <i>deoxyribonucleic acid</i>
et al.	E outro(s); e outra(s)
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FISH	Fluorescent in situ Hybridization
FU	<i>Follow up</i> (seguimento)
HE	Hematoxilina e Eosina (<i>Hematoxylin and eosin</i>)
HPV	Papilomavírus humano (<i>Human papillomavirus</i>)

H₂O₂	Água oxigenada (<i>Hydrogen peroxide</i>)
i.e.	Ou seja (<i>that is</i>)
IHC	Immunohistochemistry
NIC/CIN	Neoplasia intra-epitelial cervical (<i>Cervical intraepithelial neoplasia</i>)
CP/PC	Controle positivo; <i>Positive control</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase; <i>Polymerase chain reaction</i>
Pg/mcl	Picograma por microlitro; <i>Picogram per milliliter</i>
pRb	Proteína do retinoblastoma
RLU	Unidade relativa de luz; <i>Relative Light Unit</i>
Unicamp	Universidade Estadual de Campinas

Resumo

Objetivo: Avaliar a relação da expressão do p53 e do p16^{INK4a} em diferentes graus de neoplasia intra-epitelial cervical (NIC) e suas possíveis relações com a recidiva/persistência da NIC após conização diatérmica e a infecção persistente de papilomavírus humano (HPV) de alto risco oncogênico. **Sujeitos e métodos:** Este foi um estudo de coorte, com análise intermediária em corte transversal, para o qual foram selecionadas mulheres submetidas à conização diatérmica no período de fevereiro de 2001 a abril de 2004. Os resultados deste estudo são apresentados em dois artigos: o primeiro consiste em corte transversal incluindo 125 espécimes cirúrgicos de mulheres submetidas a conização diatérmica. Foram avaliadas a expressão do p53 e do p16^{INK4a} em diferentes graus de NIC e sua relação com a infecção pelo HPV de alto risco oncogênico realizado através da Captura de Híbridos 2 (CH2). No segundo artigo, com análise longitudinal foram incluídas 104 mulheres com NIC 2 ou 3, seguidas por até 24 meses após conização diatérmica. Foram avaliadas a expressão de p16^{INK4a} e p53 como fatores pródicos de persistência/recidiva de NIC e a sua relação com a infecção persistente por HPV de alto risco oncogênico após a conização cervical diatérmica. **Resultados:** No primeiro artigo foram incluídos 21 casos de

cervicites/NIC1, 17 NIC2 e 87 NIC3. Noventa e nove (79,2%) casos foram positivos para p16^{INK4a} (> 5% do epitélio corado), significativamente maior em lesões de alto grau ($p < 0.001$). A expressão do p53 não variou de acordo com o grau histológico. Não houve correlação entre a expressão da p16^{INK4a} e a detecção do HPV de alto risco oncogênico. A expressão do p16^{INK4a} não teve relação com a do p53. No segundo artigo, 104 mulheres com NIC 2 ou 3 foram acompanhadas por 24 meses, e detectou-se 12 casos de recidiva/persistência de NIC, sendo 8 nos primeiros 6 meses. Entre as mulheres com recidiva/persistência de NIC, 9 (75%) apresentaram persistência do HPV de alto risco oncogênico. A expressão da p16^{INK4a} foi moderada/forte em 96 casos (92%) e mais de 50% dos núcleos estavam corados para p53 em 80 (78%). A análise prospectiva não detectou diferença significativa na recidiva/persistência da NIC durante o follow up com segundo a expressão do p16^{INK4a} ou do p53. Nenhum dos parâmetros estudados teve relação com a infecção persistente pelo HPV. **Conclusões:** este estudo está em concordância com o conhecimento atual e mostra uma associação da positividade para p16^{INK4a} com a severidade da lesão cervical, embora esta proteína não esteja associada com a detecção de HPV de alto risco oncogênico pela CH2. Não houve correlação entre a expressão de p53 e a positividade para HPV nem houve associação da expressão do p53 com a do p16^{INK4a}. A análise prospectiva não mostrou correlação entre a expressão do p16^{INK4a} e do p53 e a recorrência/persistência da NIC ou persistência do HPV de alto risco oncogênico no seguimento de mulheres com NIC 2 ou 3 tratadas com conização diatérmica.

Summary

Objective: to concurrently investigate the immunoexpression of p53 and p16^{INK4a} in different grades of cervical intra-epithelial neoplasia (CIN) and their relation with the persistence/ recurrence of CIN and persistent infection by high-risk Human Papillomavirus (hr-HPV) after electrosurgical cervical conization.

Subject and methods: a series of 125 women subjected to electrosurgical conization was selected for this cross-sectional and cohort study. Enrollment was carried out between February 2001 and April 2004. The results of this study are presented in two articles: the first one consists of a cross-sectional analysis, including 125 surgical specimens of women who underwent diathermic conization. Expression of p53 and p16^{INK4a} were evaluated in different grades of CIN and their relation with hr-HPV infection was evaluated with HC2. The second article is a longitudinal analysis on 104 women with CIN 2 and 3, followed up for 24 months after electrosurgical cervical conization. Expression of p16^{INK4a} and p53 were tested as predictive markers of persistent/recurrent CIN and persistent infection by hr-HPV during follow up after electrosurgical cervical conization. **Results:** in the first series, 21 cases of CIN1, 17 CIN2 and 87 CIN3 were included. Ninety-nine (79.2%) cases stained moderate/strongly to p16^{INK4a},

significantly higher in high-grade CIN ($p < 0.001$). p53 expression did not relate with the grade of CIN and there was no relation between p16^{INK4a} expression and hr-HPV detection. Expression p16^{INK4a} and p53 were not correlated. In the second article, 104 women with CIN 2 or 3 were followed up for 24 months, and 12 (11%) persistent/recurrent CIN were observed, eight of them during the first 6 months follow-up. Among women with persistent/recurrent CIN, 9 (75%) presented persistent hr-HPV detection. p16^{INK4a} expression was moderate/strong in 96 cases (92%) and p53 stained in more than 50% of the nuclei in 80 (77%). The expression of p16^{INK4a} or p53 was not associated with persistent/recurrent CIN during follow-up. None of the studied parameters correlated with persistent hr-HPV detection. **Conclusion:** these results showed a strong association between p16^{INK4a} expression and grade of CIN, although this protein was not associated with hr-HPV detection by HC2. There was no relation between p53 and hr-HPV detection or p16^{INK4a} expression. Prospective analysis showed that p16^{INK4a} and p53 expression was not related with persistent/recurrent CIN or persistent hr-HPV detection during follow-up of women conservatively treated for CIN 2 or 3.

1. Introdução

O câncer de colo do útero é o segundo mais comum entre mulheres no mundo sendo responsável, anualmente, por cerca de 470 mil casos novos e pelo óbito de, aproximadamente, 230 mil mulheres. Quase 80% dos casos novos ocorrem em países em desenvolvimento onde, em algumas regiões, é o câncer mais comum entre as mulheres (Parkin et al., 2001; INCA, 2006).

Diferentemente dos outros cânceres, o câncer cervical é, em princípio, uma doença prevenível, já que se trata de uma patologia com longo período de lesões precursoras precedendo a neoplasia invasora. O potencial preventivo é ainda mais significativo quando se consideram os conhecimentos adquiridos no século XX em relação ao diagnóstico e tratamento da neoplasia intra-epitelial cervical (NIC) (Muñoz et al., 2003). Assim, o câncer do colo uterino torna-se a neoplasia maligna com a possibilidade de prevenção potencialmente mais eficaz, dentre as diversas formas de intervenção no combate as múltiplas manifestações desta doença.

A implantação de um sistema de rastreamento baseado, principalmente, na aplicação sistemática da colpocitologia oncológica (CO) associada ou não a testes

de detecção do papilomavirus humano (HPV), levou a uma queda da incidência e mortalidade do câncer de colo em alguns países às custas do diagnóstico de suas lesões precursoras (Denny, 2005).

Graduadas em NIC1, NIC2 ou NIC3, conforme a proporção da espessura do epitélio acometido por células neoplásicas, apresentam diferentes riscos de evolução para neoplasia invasora. Apenas 9% das mulheres com NIC1 evoluem para NIC2 ou NIC3 e menos de 1% delas têm evolução para câncer. Por outro lado, 22% das mulheres com NIC2 podem evoluir para NIC3, e 5% daquelas com NIC3 para carcinoma invasor (Östor, 1993).

A técnica mais empregada para tratamento das NIC, principalmente as consideradas de alto grau a NIC2 e NIC3, é a conização com bisturi frio ou com alça diatérmica. Embora a conização com bisturi tenha sido largamente empregada até o final da década de 1980, rapidamente a técnica com alça diatérmica ganhou espaço e confiabilidade, tornando-se o método de eleição. Como principais vantagens, a conização diatérmica pode ser realizada em nível ambulatorial e com anestesia local, enquanto a conização com bisturi a frio só pode ser realizada em centro cirúrgico e com bloqueio espinal ou anestesia geral. Realizadas com técnica apropriada e com pessoal bem treinado, as taxas de cura são semelhantes para ambas as técnicas (Duggan et al., 1999, Mathevet et al., 2003).

Embora a conização seja um tratamento simples e eficaz, as recidivas e doença residual pós-cone são freqüentes. Após o tratamento da NIC3 por conização a frio, com alça ou a laser, as taxas de doença residual ou recidiva variam de

5% a 25%. Alguns autores referem doença residual em até 30% dos espécimes de histerectomia realizadas após conização (Flannelly et al., 2001, Lin et al., 2001; Park et al., 2007). Embora a doença possa estar curada mesmo nos casos com margens do espécime de conização comprometidas por neoplasia, mulheres com remoção completa da NIC também têm chances de recidivas (Paraskevaïdis et al., 2003). Assim, os protocolos de seguimento, geralmente, consistem em consultas semestrais, por dois ou três anos, com exame ginecológico, colposcopia e coleta de CO. Entretanto, é importante considerar que a CO pode ser normal mesmo em casos onde há confirmação histológica de recidiva, o que torna necessário encontrar métodos mais sensíveis para acompanhar mulheres tratadas pela conização (Flannelly et al., 2001; Tangtrakul et al., 2002; Sarian et al., 2004a).

Com o advento de técnicas bio-moleculares que permitiram a identificação do HPV, vários estudos estabeleceram papel causal para este vírus na evolução da NIC (Wacholder, 2003). O papel da detecção viral nos programas de rastreamento tem sido objeto de muitos estudos e é hoje considerado um método adequado para detecção da NIC, quando associado à citologia (Syrjanen et al., 2005; Sarian et al., 2005; Bragança et al., 2005; Longatto-Filho et al., 2006; Gontijo et al., 2007; Koliopoulos et al., 2007).

Crescente interesse vem sendo dirigido à possível contribuição que a detecção do HPV possa ter no seguimento de mulheres tratadas da NIC. De fato, a permanência ou recorrência da NIC acontece em mulheres com infecções persistentes após o tratamento e recentemente tem se avaliado o papel dos testes de HPV para selecionar mulheres com maior risco de doença residual ou recidiva,

independentemente do estado das margens do cone (Nagai et al., 2000; Nobbenhuis et al., 2001; Sarian et al., 2004b, 2005; Bae et al., 2007; Park et al., 2007).

Zielinski et al. (2004) realizaram um estudo de meta-análise para comparar a acurácia dos testes de HPV e da CO e a presença de doença nas margens do cone na predição de doença residual ou recorrente pós-cone. Compilaram os resultados de 11 casuísticas e observaram que a sensibilidade da combinação do teste de HPV e das margens livres foi de 97% (95% IC 90–99%), semelhante aquela do teste de HPV associado ao resultado da CO pós-tratamento, que foi de 96% (95% IC 89–99%).

A especificidade da detecção do HPV de alto risco combinado com a CO foi de 81% (95% IC 77–84%), significativamente melhor que o teste de HPV combinado com a presença de doença nas margens do cone, 54% (95% IC 47–61%). Neste mesmo estudo, os autores verificaram que o valor preditivo negativo da citologia foi de 93% (95% IC 90–95%), dos testes de HPV para vírus de alto risco foi de 98% (95% IC 97–99%) e do estado das margens do cone foi de 91% (95% IC 87–94%). Nessa meta-análise quando comparados a combinação de testes, CO com resultado negativo e margens livres ofereceram um valor preditivo negativo de 92% (IC 85–96%), enquanto a combinação de CO e testes de HPV negativos de 99% (IC 98–100%) ou ainda teste de HPV e margens livres 99% (IC 95–100%). Zielinski et al. (2004) concluíram que a combinação do testes de HPV com a CO é a melhor para seguimento de mulheres após conização por NIC3.

Para que o HPV exerça seu efeito nas células da cérvix uterina, seus oncogenes devem afetar elementos do ciclo de divisão celular que culmina na mitose, fase em que ocorre a divisão do material celular e a bipartição da célula. (Alberts et al., 1994; Queiroz et al., 2006a). Os mecanismos moleculares detalhados que explicam os potenciais oncogênicos dos diferentes tipos de HPV têm emergido somente recentemente. Estudos vêm sugerindo que a integração do ácido desoxirribonucleico (DNA) do HPV (DNA-HPV) aos cromossomos humanos leva à perda de regulação do ciclo celular e à expressão de oncogenes virais, aumentando acentuadamente a proliferação das células e tornando muito mais freqüente a progressão da NIC para categorias mais graves ou para câncer (Wentzensen et al., 2004; Baak et al., 2006).

É provável que a diferença do potencial oncogênico dos diversos tipos virais esteja ligada, pelo menos em parte, com a expressão de dois oncogenes importantes, E6 e E7, o que ocorre frequentemente em células neoplásicas HPV-positivas, sendo considerada imperativa para iniciar e manter o fenótipo maligno celular (Syrjanen e Syrjanen, 1999; Wentzensen et al., 2004). Os oncogenes do HPV atuam em duas etapas distintas do ciclo celular: na regulação da entrada da célula em apoptose e no controle da passagem da fase G1 para S.

O oncogene E6 de HPV se liga à fosfoproteína nuclear p53 que é codificada pelo gene localizado no cromossoma 17p tendo atividade na supressão tumoral. Mutações neste gene têm sido descritas em uma grande variedade de carcinomas de diferentes órgãos como mama, pulmão, fígado, cólon e pele, sendo sua expressão

relacionada com um pior prognóstico nos tumores de mama e pulmão. (Levine et al., 1991; Hollstein et al., 1991; Rotter & Prokocimer, 1991).

A expressão do p53 na evolução do carcinoma cervical tem sido muito estudada assim como sua associação com outros fatores carcinogênicos como o HPV sendo Scheffner et al. (1991) os pioneiros em demonstrar a ligação do oncogene E6 do HPV 16 e18 a proteína p53. O oncogene E6 atua ligando-se a proteína p53, degradando-a. A p53 é fosforilada, tornando-se ativa, em situações onde há dano ao DNA. A p53 ativada atua como fator de transcrição para a proteína inibidora de ciclinas dependentes de quinase 1A, também chamada p21, responsável pela inativação de enzimas (ciclinas) envolvidas na replicação do DNA e proliferação celular. A p53 fosforilada também atua ativando outras enzimas que conduzem ao processo de morte celular programada, ou apoptose. Desta forma, o oncogene viral E6, ao se ligar e degradar a p53, impede a transcrição de p21, que inibiria a passagem da célula de G1 para S, ao mesmo tempo em que impede a morte de células com DNA alterado (Baak et al., 2006).

Diversos estudos falharam em demonstrar diferentes escores da imunorreatividade do p53 em espécimes HPV-positivas e negativas de NIC e de câncer cervical. Uma das hipóteses levantadas, leva em conta a mutação do p53. O gene mutado teria maior meia-vida do que o p53 selvagem, levando ao seu acúmulo no núcleo celular e sua conseqüente detecção imunohistoquímica em células neoplásicas. Por outro lado, a inativação do p53 pelo oncogene E6 do HPV de alto risco levaria a uma baixa expressão deste marcador em células neoplásicas infectadas pelo HPV. Este padrão de reatividade levaria a resultados contraditórios,

adicionando controvérsias ao debate sobre a função do p53 na neoplasia de colo uterino. Os resultados dos estudos clínicos são conflitantes também, com relação da expressão p53 com a progressão de NIC (Finlay et al., 1988; Bosari et al., 1993; Vassallo et al., 2000; Queiroz et al., 2006a).

Outro passo importante para a perda da regulação do ciclo celular é a ação do oncogene viral E7 que se liga ao gene do retinoblastoma, ou proteína do retinoblastoma (pRb), inativando-a. A pRb tem papel fundamental na manutenção da célula em G1, exercendo sua função por formar complexos estáveis com o fator de transcrição E2F. O E2F, quando livre, ativa diversas quinases dependentes de ciclinas, desencadeando o processo de replicação do DNA. A pRb também atua sobre o inibidor de ciclina dependente de quinase (CDK) 2 A, chamado abreviadamente de p16^{INK4a}, e sobre o inibidor de ciclina dependente de quinase 1 B, ou p27, os quais são importantes moduladores da parada do ciclo celular em G1. O p16^{INK4a} é parte integral da via do pRb, atuando conjuntamente com este no bloqueio do ciclo celular por inativação das CDKs. Sabe-se que o p16^{INK4a} e o p27 não podem exercer suas funções na ausência de pRb, liberando a célula para a replicação. Em síntese, o oncogene viral E7 atua reduzindo as concentrações de pRb e, por conseguinte alterando a expressão do p16^{INK4a} e do p27, acarretando o aumento de concentração de ciclinas dependentes de quinases que, em pleno funcionamento, permitem a entrada e manutenção da célula na fase S (Baak et al., 2006, Kalof & Cooper, 2006).

A proteína p16^{INK4a} é codificada no gene 9p21 que também codifica outras proteínas supressoras tumorais: a p14 (ARF) e a p15^{INK4b} (p15), O

padrão da expressão p16^{INK4a} no tecido humano varia com idade; na infância, a expressão essencialmente é confinada ao timo e na idade adulta é expressa no endométrio proliferativo, nos ductos mamários, em células do antro gástrico, no epitélio escamoso esofágico, nas glândulas salivares, e em algumas células neuroendócrinas (Nielsen et al., 1999).

A alta frequência das deleções de p16 em linhagens tumorais sugeriu um papel importante do p16 na carcinogênese. Este achado surgiu quando houve uma documentação clínica da inativação do p16^{INK4a} nos pacientes melanoma familiar (Soufir & Basset-Seguín, 2001; Sharpless et al., 2003). Após este achado, a expressão do p16^{INK4a} também foi relatada em outros tipos tumorais. A positividade difusa do p16^{INK4a} foi descrita em dermatofibrosarcoma, adenocarcinoma gástrico, linfomas de Hodgkin e não-Hodgkin, tumores neuroendócrinos pulmonares, incluindo os carcinóides, tumores de grandes células, carcinoma de pequenas células e tumores pulmonares escamosos e adenocarcinomas (Rocco et al., 1998; Rocco & Sidransky, 2001; Beasley et al., 2003).

Entretanto, as principais aplicações diagnósticas do teste de imunohistoquímica para p16^{INK4a} estão no campo da patologia ginecológica. A expressão da p16^{INK4a} foi investigada mais extensamente na patologia cervical, embora estejam surgindo novas aplicações deste marcador em várias localizações do trato genital feminino. No epitélio cervical normal a expressão do p16^{INK4a} está ausente ou, em alguns casos, é positiva focalmente, padrão não alterado nas cervicites e metaplasia escamosa do epitélio (Kalof et al., 2005). Na NIC a expressão da p16^{INK4a} está presente na maioria dos casos geralmente restrita ao terço basal do epitélio,

embora a porcentagem de positividade varie muito na literatura (Agoff et al., 2003; Dray et al., 2005). A superexpressão da p16^{INK4a} em células cervicais é interpretada normalmente como um marcador da integração do genótipo de HPV de alto risco (O' Neill & McCluggage, 2006; Kalof & Cooper, 2006).

Na NIC1, uma alta expressão da p16^{INK4a} tem sido considerada como fator de risco para a progressão da doença visto que este marcador é um indicador indireto da inclusão do HPV de alto risco na célula hospedeira. É possível que a expressão do p16^{INK4a} possa ser utilizada como método de triagem dos casos de NIC1, pois aqueles com maior expressão da p16^{INK4a} estariam associadas à integração do HPV de alto risco oncogênico e deveriam ter seguimento mais rigoroso (O' Neill & McCluggage, 2006).

O p16^{INK4a} também já vem sendo utilizado na prática clínica para diferenciar a metaplasia imatura atípica do epitélio escamoso da NIC. Nas NIC de alto grau, a expressão do p16^{INK4a} em dois terços ou mais do epitélio é freqüente, sendo um indicador seguro da gravidade da lesão. Sua utilização na prática clínica tem sido utilizada na redução da variação inter-observador no diagnóstico das NIC, principalmente na localização de lesões focais e no epitélio atrófico. Há também trabalhos mostrando sua utilização na avaliação das margens pós-tratamento excisional das NIC (McCluggage et al., 1996; Klaes et al., 2002).

Este estudo visa investigar a hipótese que a expressão do p53 e do p16^{INK4a} em espécimes de diferentes graus de NIC. A avaliação simultânea destes marcadores pode fornecer informações adicionais nos mecanismos

moleculares do desenvolvimento de NIC e a ajudar para compreender as influências recíprocas da alteração do ciclo celular relacionados à infecção pelo HPV. O estudo de marcadores moleculares em lesões escamosas pré-invasoras do colo do útero, cuja expressão possa estar afetada através infecção pelo HPV, trará informações relevantes para o entendimento do comportamento clínico da gravidade da NIC e sua recidiva após a conização diatérmica. Os conhecimentos atuais a respeito dos fatores que levam à recidiva da NIC são insuficientes, o que torna necessária a aquisição de informações para melhor determinar o risco de recidiva entre mulheres com infecção persistente pelo HPV.

Estudos clínicos sugerem que existe uma relação entre o p16^{INK4a} e o p53 e a persistência e progressão da NIC. Embora a expressão do p16^{INK4a} esteja associada a progressão da NIC 1 para NIC 3, resultados conflituosos são encontrados na expressão do p53 em amostras de NIC e carcinoma escamoso de colo (Klaes et al., 2001, Murphy et al., 2005). Neste estudo será avaliada a imuno expressão da p16^{INK4a} e do p53 em relação a gravidade da lesão cervical assim como sua relação com a persistência/recidiva da NIC e infecção pelo HPV, após conização cervical.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a relação entre a expressão do p53 e do p16^{INK4a} em diferentes graus de NIC e sua relação com a recidiva/persistência da NIC e infecção persistente por HPV de alto risco oncogênico após conização diatérmica.

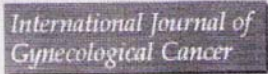
2.2. Objetivos Específicos

- **Artigo1:** Avaliar a expressão do p53 e do p16^{INK4a} em diferentes graus de NIC e sua relação com a detecção de HPV de alto risco oncogênico.
- **Artigo 2:** Avaliar a expressão de p16^{INK4a} e p53 como marcadores de recidiva de NIC e a sua relação com a infecção persistente por HPV após a conização cervical.

3. Publicações

3.1. Artigo 1

Manuscript Central http://mc.manuscriptcentral.co



[Edit Account](#) | [Instructions & Forms](#) | [Log Out](#) | [Get Help Now](#)



[Main Menu](#) → [Author Dashboard](#) → Submission Confirmation

You are logged in as Luis Sarian

Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *International Journal of Gynecological Cancer*.

Manuscript ID: IJGC-2007-00620

Title: Expression of p16INK4a and cervical infection with high-risk HPV are not related to p53 activity in cervical intraepithelial neoplasia

Authors: Bragança, Joana
Sarian, Luis
Pitta, Denise
Malto, Ana Beatriz
Vassallo, Jose
Pignataro, Francisco
Andrade, Líliliana Aparecida
Derchain, Sophie

Date Submitted: 05-Sep-2007

 Print  Return to Dashboard

Manuscript Central™ v4.0 (patent pending). © ScholarOne, Inc., 2007. All Rights Reserved.
Manuscript Central is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.
[Terms and Conditions of Use](#) - [ScholarOne Privacy Policy](#)

Expression of p16^{INK4a} and cervical infection with high-risk HPV are not related to p53 activity in cervical intraepithelial neoplasia

Joana Fróes Bragança, MD

Luis Otávio Sarian, MD, PhD

Francisco Pignataro, MD

Ana Beatriz Maito, medical student

José Vassallo, MD, PhD

Denise Rocha Pitta, Biologist

Liliana Angelo Andrade, MD, PhD

Sophie Derchain, MD, PhD

Department of Obstetrics and Gynecology, Department of Pathology Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Campinas, Brazil.

Corresponding author:

Sophie Derchain

Rua Antônio Hossri, 629 – Cidade Universitária

13083-370 – Campinas – SP.

Fone: +55-19-37889305 / Fax: + 55-19-3289 5935

E-mail: derchain@fcm.unicamp.br

Key words: cervical intraepithelial neoplasia, cancer, tumor marker, immunohistochemistry

ABSTRACT

Objective: To investigate the expression of p53 and p16^{INK4a} in cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and their relation with disease severity and high-risk Human papillomavirus (hr-HPV) status. **Subjects and methods:** A series of 125 women with previous positive Pap smear was selected for this cross-sectional study. All patients underwent gynecological examination, including colposcopy. Specimens for Pap smears, Hybrid Capture 2 (HC2) test and pathological analysis were obtained. After evaluation of CIN grade, immunohistochemical detection of proteins p53 and p16^{INK4a} was performed on paraffin embedded sections. The extent of immunoexpression of both proteins was analyzed in relation to CIN grade and hr-HPV status. **Results:** CIN was graded as 1 in 21 cases, 2 in 17, and 3 in 87 specimens. p16^{INK4a} positivity (at least 5% of epithelial cells stained) was found in 99/125 cases (79.2%), and was significantly higher in high-grade lesions as compared to low-grade CIN ($p < 0.001$). The expression of p53 did not differ across histological strata. Neither protein expression of p16^{INK4a}, nor of p53 correlated with HR-HPV status. Expression of p16^{INK4a} was not related with that of p53. **Conclusion:** Our study gives further support to previous findings of strong association of p16^{INK4a} immunostaining with severity of epithelial atypia, but this protein may not be considered a predictor of hr-HPV status determined with HC2. By contrast, immunoexpression of p53 was related to neither CIN grade nor to hr-HPV status.

INTRODUCTION

The TP53 gene, present in chromosome 17p, is a major constituent of the cell-cycle control system. Mutation of this gene leads to inactivation of the suppressor activity of p53, which, in turn, disrupts the mechanisms of DNA repair, induction of apoptosis and regulation of the cell growth^(1,2). The role played by the inactivation of p53 in the carcinogenesis of cervical cancer has been well documented. According to some studies, E6 oncogene of high-risk human papillomavirus (hr-HPV) enhances degradation of p53, what seems to be required for maintenance of proliferative phenotype of cervical carcinoma cells^(3,4). However, other reports failed to demonstrate different immunoreactivity scores of p53 in HPV-positive and -negative cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and cancer specimens, adding controversy to the debate^(5,6). In addition, clinical studies report conflicting results on the relationship between expression of p53 and progression of CIN^(7,8).

The effect exerted by HR-HPV infection on the regulation of the cell cycle seems to vary from case to case and is dependent on host and viral factors. It has been unequivocally established that development of CIN does not occur if HPV infection is absent but, conversely, only a minority of HPV infected women will develop the disease^(9,10). p16^{INK4a} has been demonstrated as a surrogate marker of hr-HPV, and the over expression of this protein in cervical cells is usually interpreted as a marker of the integration of hr-HPV genotype. p16^{INK4a} is involved in a negative feedback pathway with the Rb protein, which, in turn, is inactivated by the E7 oncogene of hr-HPV. The E6 and E7 pathways intersect at the point where inhibition of pRb by E7 is further enhanced by inactivation of p53 by E6. The combined reduction of both proteins leads to the shift from phase G1 to S of the cell cycle, resulting in cell proliferation. This oversimplified description is not intended to be a

full review of all other known mechanisms in cervical carcinogenesis. There must be additional still unknown interactions between the E6 and E7 pathways, which might account for the divergent patterns of expression of p53 and p16^{INK4a} among studies^(11,12,13,14).

The main purpose of the present study was to concurrently investigate the immunoexpression of p53 and p16^{INK4a} in CIN specimens of different grades. Until now, the relations between these two proteins in cervical carcinogenesis have not been sufficiently understood, and previous results are scattered and conflicting.

MATERIALS AND METHODS

Selection of the women and examination workup

A series of 125 women, treated at the Colposcopy Clinic of the Medical School Hospital of Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Campinas, Brazil, was selected for this cross-sectional study. These patients had been diagnosed as presenting cytological abnormalities in referral Pap smears from February 2001 to April 2004. All patients were subjected to an interview addressing clinical and socio-demographic concerns, and to a thorough pelvic examination, including colposcopy. New cervical samples for Pap smears and for Hybrid Capture II (HC2) were obtained immediately before performing biopsy or electrosurgical conization. The Committee for Ethics in Medical Research of the institution approved the present study. All patients signed an informed consent form, stating their agreement to participate of the study.

Cytological diagnosis

Cervical smears were collected immediately before conization, fixed in alcohol and sent to our Cytopathology Laboratory. Smears were stained according to the

Papanicolaou technique, evaluated using the 2001 Bethesda System Terminology and classified as atypical squamous cell (ASC), low squamous intra-epithelial lesion (LSIL), high squamous intra-epithelial lesion (HSIL) ⁽¹⁵⁾.

Hybrid Capture 2[®]

The storage of specimens and all reagents, as well as test procedures were done according to the manufacturer's instructions (*Digene Diagnostics Inc., USA*). Specimens for HC2 were tested for probe B (high-risk HPVs: types 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 and 68) ⁽¹⁶⁾, and classified as positive when the relative light unit ratio (RLU) was 1 pg/ml or greater [index resulting from the ratio between RLU of the specimen/mean RLU of two positive controls (PC)-HC].

Histopathology

Biopsies and treatment of cervical lesions (electrosurgical conization) were preferentially accomplished during the same procedure. Tissue samples were fixed in 10% phosphate-buffered formalin, embedded in paraffin and stained with hematoxylin and eosin (HE) for morphological diagnosis. Pathological criteria were in accordance to the World Health Organization, grading CIN in three degrees ⁽¹⁷⁾.

Immunohistochemistry (IHC)

IHC reactions were performed on 5µm sections obtained from the paraffin embedded tissue blocks. Sections were transferred to silanized slides, deparaffinized in xylene and hydrated in ethanol and phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4). Antigen retrieval was performed after endogenous peroxidase blocking with 3% H₂O₂ in a steamer at 90° C for 30 min. The slides were then incubated for 30 minutes in a humid

chamber at 37°C with the antibodies: anti-p53 (clone DO-7; diluted 1 in 100; Dakicytotation, Copenhagen, Denmark) and anti-p16 (clone-NCC-RAs-001; diluted 1 in 20; Novocastra, Newcastle, UK). Specific binding of primary antibodies were detected by the Envision® system (Dakicytotation) for p53 (30 minutes at room temperature; and by the Novolink® system for p16 (Novocastra). Labelling was visualized with 3,3'-diaminobenzidine (D-5637; Sigma, St. Luis, MO, USA) added to H₂O₂ 3% in phosphate-buffered saline (pH 7.6). Counterstaining was made with Mayer's hematoxylin and mounted permanently with Entellan® (Merck, Darmstadt, Germany). Positive controls consisted of tissues with previous immunoreactivity for each marker. Negative controls consisted of the same tissues used as positive controls, where the primary antibodies were omitted.

Assessment of immunostaining

Reading of immunostaining slides was performed by one investigator, who was uninformed of the morphological diagnoses and of HPV status. Digitalized photographs of high-power fields (400×) were taken from areas showing the most intense immunoreaction (hot-spots) with a Nikon COOLPIX Camera 995. Images were transferred to personal-computer-based software for histological analyses (Imagelab® 2000).

Immunostaining for p16^{INK4A} was semi-quantified as *negative/focal* when less than 5% of cells were positive, *moderate/strong* when 5–100% were positive in a nuclear and cytoplasmic pattern. For p53, the percentage of cells with nuclear staining was assessed. The semi-quantitative analysis of p16^{INK4A} was preferred because it facilitated statistical analysis without loss of information, given the fact that nuclear-

cytoplasmic staining might be hard to define in a precise manner. By contrast, the nuclear pattern of p53 staining allows precise counts of the nuclei stained, which obviates the need for semi-quantification.

Statistical analysis

Data were recorded in digital spreadsheets (Open Office 2.0[®]) and analyzed using the *R environment for statistical computing*⁽¹⁸⁾. All statistical calculations were set to 95% confidence intervals and significance levels of 5%. Chi-square for trends was used to assess the expression of p16^{INK4a} across histological strata and the Kruskal-Wallis test was used to evaluate the expression of p53 in the different degrees of CIN. A linear regression model was fit to assess the expression of p16^{INK4a} in relation to HR-HPV status and to the expression of p53.

RESULTS

Patients' age ranged from 21 to 59 years (mean 31 years). Cytological diagnoses that motivated referral were 113 (90%) HSIL and 12 (10%) persistent LSIL. After examination in our clinic, all cytological diagnoses were confirmed. Morphological analysis rendered 21 cases of CIN 1 (16.8%), 17 of CIN 2 (13.6%) and 87 CIN 3 (69.6%). HC2 was positive for HR-HPV in 112 out of 125 cases (89.6%) and negative in 13 (10.4%) (data not shown).

Most lesions stained moderate/strong for p16^{INK4a} (99/125; 79.2%). Among the low-grade epithelial lesions, a high proportion expressed negative/focal expression of p16 (69%), whereas only 3% showed moderate/strong expression. Conversely, the percentage of CIN 3 in the group of negative/focal expression of p16^{INK4a} was substantially lower compared

to that found in lesions staining moderate/strong p16^{INK4a} (23% *versus* 82%; $p < 0.001$). The mean percentage of cells expressing p53 was around 65%, with no difference across histological strata ($p = 0.17$). Expression of both p16^{INK4a} and p53 did not correlate with HR-HPV status, as shown in Table 1.

Multivariate analysis, taking into account both CIN grade and hr-HPV status, did not disclose any significant difference in p53 staining in relation to the expression of p16^{INK4a} (Table 2).

DISCUSSION

Our results, derived from the largest number of cases in the recent literature addressing the subject, support the view that the patterns of expression of proteins p16^{INK4a} and p53 are a result of independent pathways of carcinogenesis. The variable expression of p16^{INK4a} and p53 are related the integration of hr-HPV E7 and E6, respectively, and the present results, in addition to what was already known on the subject, suggest that these carcinogenic mechanisms may be independent from each other.

Previous reports have demonstrated unexpected patterns of p16^{INK4a} and p53 protein expression, in conflict with the actions postulated for these two gene products ^(19,20,21). A reasonable explanation for this unexpected behavior may be the interaction between p53 and pRb (and, as consequence, p16^{INK4a}), which has not been fully explored so far. In this study, we detected different and unrelated patterns of expression of p16^{INK4a} and p53. E6 and E7 are considered the principal transforming proteins of HPV, and their participation in the process that leads to CIN has been intensively studied in recent years^(22,23). Both proteins drive host cells to become completely transformed by inactivating p53 and pRb. These effects have only

been demonstrated for HPV types 16 and 18 so far, although many other HPV types are considered of high oncogenic potential. We considered the evaluation of protein p16^{INK4a} more reliable than pRb, because its pattern of immunoexpression is more consistently predictive of increased cervical epithelial atypia, whereas conflicting results have been reported concerning pRb ^(7,24,25). Moreover, there is a hypothetical synergy between the effects of E6 and E7, which would occur where both p53 and pRb act together shifting cell cycle from G1 to S ⁽¹²⁾.

So far, there is no proven correlation between the expression of p53 and pRb, while p16^{INK4a} is a known marker of HPV integration in host genome ^(26,27). The relationship between immunostaining for p16^{INK4a} and the grade of CIN has been already established, although variability has been detected, especially in low-grade lesions ^(28,29). In our sample, a significant increased expression of p16^{INK4a} in high-grade CIN was confirmed. On the other hand, the pattern of expression of p53 protein in CIN is much less predictable, and data from the literature are conflicting ^(2,6,19). Wang *et al* ⁽²⁶⁾ detected increased expression of proteins p16^{INK4a} and p14^{ARF}, and decreased or stable expression of p53 in relation to progression of severity of CIN. Contrasting to these results, Skomedal *et al.* ⁽³⁰⁾ did not find any difference in the protein expression of p53 as related to the degree of differentiation and histological type of the neoplasm. Our data reinforce the lack of correlation between immunodetection of p53 and the degree of CIN.

A relevant finding of the present study is the lack of correlation between the expression of proteins p16^{INK4a} and p53. This might be explained, either by the fact that the two markers are not good representatives of the biological processes triggered by E6 and E7 or by the fact that the point where the E6 and E7 pathways intersect is located beyond the point where p53 and pRb act in the cell cycle control mechanism. In this respect, our finding is not

in line with the study by Queiroz *et al.* ⁽³¹⁾, which detected a lower expression of p53 in subjects negative for HR-HPV and with incipient expression of p16^{INK4a}.

Differences in technical protocols, in quantization of staining and limitations inherent to immunohistochemistry on archival tissues may account for the divergent findings reported in many studies. Another important limitation is that all individual protein that is studied is only a small part of a complex machinery of cell cycle control. In spite of that, our study reliably demonstrated that immunostaining for p16 is strongly associated with severity of epithelial atypia, but may not be considered a predictor of hr-HPV status. This of clinical importance, because many practitioners might feel tempted to consider p16^{INK4a} staining a reliable marker of persistent hr-HPV infection. In opposition, immunoexpression of p53 is of no value for the assessment of either CIN grade or HR-HPV status. Furthermore, considering previous and present evidence, it is likely that both proteins are related to independent pathways of cervical carcinogenesis.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for grants #06/01521-0 and 04/09309-5. JV, LAA and SD are researchers of the Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERENCES

1. Oka K, Suzuki Y, Nakano T. Expression of p27 and p53 in cervical squamous cell carcinoma patients treated with radiotherapy alone: radiotherapeutic effect and prognosis. *Cancer*. 2000; 88(12):2766-73.
2. Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, Andreau K, Medema R, Kroemer G. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene*. 2004; 23(16):2825-37.
3. Milde-Langosch K, Albrecht K, Joram S, Schlechte H, Giessing M, Löning T. Presence and persistence of HPV infection and p53 mutation in cancer of the cervix uteri and the vulva. *Int J Cancer*. 1995; 63(5):639-45.
4. Ekalaksananan T, Pientong C, Sriamporn S *et al*. Usefulness of combining testing for p16 protein and human papillomavirus (HPV) in cervical carcinoma screening. *Gynecol Oncol*. 2006;103(1):62-6.
5. Troncone G, Martinez J C, Palombini L *et al*. Immunohistochemical expression of mdm2 and p21WAF1 in invasive cervical cancer: correlation with p53 protein and high risk HPV infection. *J Clin Pathol*. 1998; 51(10): 754–760.
6. Giannoudis A & Herrington CS. Differential expression of p53 and p21 in low grade cervical squamous intraepithelial lesions infected with low, intermediate, and high risk human papillomaviruses. *Cancer*. 2000; 89(6):1300-7.
7. Castle PE & Giuliano AR. Chapter 4: Genital tract infections, cervical inflammation, and antioxidant nutrients--assessing their roles as human papillomavirus cofactors. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2003; 31:29-34.
8. Lorenzato M, Caudroy S, Bronner C *et al*. Cell cycle and/or proliferation markers: what is the best method to discriminate cervical high-grade lesions? *Hum Pathol*. 2005; 36(10):1101-7.

9. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjose S *et al.* Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* 2003; 348:518-27.
10. Kalof AN, Evans MF, Simmons-Arnold L, Beatty BG, Cooper K. p16INK4A immunoexpression and HPV in situ hybridization signal patterns: potential markers of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol.* 2005; 29(5):674-9.
11. Klaes R, Benner A, Friedrich T *et al.* p16INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol.* 2002; 26(11):1389-99.
12. Kim YT & Zhao M. Aberrant cell cycle regulation in cervical carcinoma. *Yonsei Med J.* 2005; 46(5):597-613.
13. Murphy N, Ring M, Heffron CC *et al.* p16INK4A, CDC6, and MCM5: predictive biomarkers in cervical preinvasive neoplasia and cervical cancer. *J Clin Pathol.* 2005 May;58(5):525-34.
14. Baak JP, Kruse AJ, Robboy SJ, Janssen EA, van Diermen B, Skalan I . Dynamic behavioural interpretation of cervical intraepithelial neoplasia with molecular biomarkers. *J Clin Pathol.* 2006; 59(10):1017-28.
15. Solomon D, Davey D, Kurman R *et al.* Forum Group Members; Bethesda 2001 Workshop. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA.* 2002; 287(16):2114-9.
16. Nindl I, Lorincz A, Mielzynska I *et al.* Human papillomavirus detection in cervical intraepithelial neoplasia by the second-generation hybrid capture microplate test, comparing two different cervical specimen collection methods. *Clin Diagn Virol.* 1998; 10(1):49-56.

17. Scully RE, Bonfiglio TA, Kurman RJ, Silverberg SG, Wilkins EJ. Histological typing of female genital tract tumors. World Health Organization – International histological classification of tumors. 2nd ed. Berlin: Springer-Verlag; 1994.
18. R Development Core Team (2004). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria. ISBN 3-900051-00-3, URL <http://R-project.org>
19. Busby-Earle RM, Steel CM, Williams AR, Cohen B, Bird CC. p53 mutations in cervical carcinogenesis-low frequency and lack of correlation with human papillomavirus status. *Br J Cancer*. 1994; 69(4):732-7.
20. Agoff SN, Lin P, Morihara J, Mao C, Kiviat NB, Koutsky LA. p16(INK4a) expression correlates with degree of cervical neoplasia: a comparison with Ki-67 expression and detection of high-risk HPV types. *Mod Pathol*. 2003; 16(7):665-73.
21. Horner SM, DeFilippis RA, Manuelidis L, DiMaio D. Repression of the human papillomavirus E6 gene initiates p53-dependent, telomerase-independent senescence and apoptosis in HeLa cervical carcinoma cells. *J Virol*. 2004;78(8):4063-73.
22. Wright TC Jr, Cox JT, Massad LS, Twiggs LB, Wilkinson EJ; 2001 Consensus Guidelines for the Management of Women with Cervical Cytological Abnormalities. 2001 ASCCP-sponsored Consensus Conference. *J Low Genit Tract Dis*. 2002; 6(2):127-143.
23. Zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst*. 2000; 92(9):690-8.
24. Fiedler M, Müller-Holzner E, Viertler HP *et al*. High level HPV-16 E7 oncoprotein expression correlates with reduced pRb-levels in cervical biopsies. *FASEB J*. 2004; 18(10):1120-2.

25. Harbour JW & Dean DC. Rb function in cell-cycle regulation and apoptosis. *Nat Cell Biol.* 2000; 2(4):E65-7
26. 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(8):1355-60.
27. O'Neill CJ & McCluggage WG. p16 expression in the female genital tract and its value in diagnosis. *Adv Anat Pathol.* 2006;13(1):8-15.
28. Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D *et al.* Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer.* 2001; 92(2):276-84
29. Murphy N, Ring M, Killalea AG *et al.* p16INK4A as a marker for cervical dyskaryosis: CIN and cGIN in cervical biopsies and ThinPrep smears. *J Clin Pathol.* 2003; 56(1):56-63.
30. Skomedal H, Kristensen GB, Lie AK, Holm R. Aberrant expression of the cell cycle associated proteins TP53, MDM2, p21, p27, cdk4, cyclin D1, RB, and EGFR in cervical carcinomas. *Gynecol Oncol.* 1999; 73(2):223-8.
31. Queiroz C, Silva TC, Alves VA *et al.* P16(INK4a) expression as a potential prognostic marker in cervical pre-neoplastic and neoplastic lesions. *Pathol Res Pract.* 2006; 202(2):77-83.

Table 1 – Immunoexpression of proteins p16^{INK4a} and p53 in different grades of cervical intraepithelial neoplasia (CIN)

Histopathologic grade	p16 ^{INK4a}			p53	
	Negative/focal	Moderate/strong	p	Mean (SD)	p
CIN 1	18 (69%)	3 (3%)		62.4% (22.4)	
CIN 2	2 (8%)	15 (15%)		71.0% (15.6)	0.17**
CIN 3	6 (23%)	81 (82%)	<0.001*	61.5% (19.4)	
hr-HPV					
Negative	5 (19%)	8 (9%)	Ref	61.1 (20.8)	Ref
Positive	21 (81%)	91 (91%)	0.31***	63.1 (19.4)	0.76***
Total	26 (100%)	99 (100%)			

hr-HPV: high-risk HPV infection detected with Hybrid Capture 2[®] assay; SD: standard deviation; *Chi-square for trends; **Kruskal-Wallis; ***linear regression;

Table 2 – Expression of p53 in relation to p16^{INK4a} status

p16 ^{INK4a}	p53	
	Mean (SD)	p*
0 to 5%	61.6 (20.8)	
>5%	62.3 (19.4)	0.61

OR: odds ratio; SD: standard deviation; adjusted with: *adjusted for CIN grade and hr-HPV status

3.2. Artigo 2

----- Mensagem Original

----- Assunto: Gynecologic Oncology: Submission

Confirmation De: "Gynecologic Oncology" <gyn@elsevier.com> Data: Qua, Setembro 5, 2007 4:51 pm Para:

derchain@supernet.com.br -----

Title: Reliability of p16INK4A and P53 as markers of HPV persistence and CIN recurrence after cervical conization Corresponding Author: Dr. Sophie Derchain
Authors: Joana F Bragança, MD; Luis O Sarian, MD, PhD; Adriana Yoshida, MD; Ana Beatriz Maito, medical student; Andre Schenka, PhD; Liliana A Andrade, MD, PhD;

Dear Dr. Derchain,

This is to confirm that the above-mentioned manuscript has been received for consideration in Gynecologic Oncology. You will be able to check on the progress of your manuscript by logging on to the Elsevier Editorial System for Gynecologic Oncology as an author: <http://ees.elsevier.com/ygyno/> Your paper will be given a manuscript number shortly and you will soon receive an e-mail with this number for your reference.

Thank you for submitting your manuscript to Gynecologic Oncology. Should you have any questions, please feel free to contact our office. Kind regards,

Meghan Riley Gynecologic Oncology, Editorial-Production Office Elsevier 525 B Street, Suite 1900 San Diego, CA

92101-4495 USA Phone: (619) 699-6753 Fax: (619) 699-6859 E-mail:

gyn@elsevier.com

Reliability of p16^{INK4A} and P53 as markers of HPV persistence and CIN recurrence after cervical conization

Joana Fróes Bragança, MD

Luis Otávio Sarian, MD, PhD

Adriana Yoshida, MD

Ana Beatriz Maito, medical student

André Schenka, MD, PhD

Liliana Angelo Andrade, MD, PhD

Sophie Derchain, MD, PhD

Department of Obstetrics and Gynecology, Department of Pathology Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Campinas, Brazil.

Corresponding author.

Sophie Derchain

Rua Antônio Hossri, 629 – Cidade Universitária

13083-370 – Campinas – SP.

Fone: +55-19-37889305 / Fax: + 55-19-3289 5935

E-mail: derchain@fcm.unicamp.br

Key words: cervical intraepithelial neoplasia, treatment, biological marker, immunohistochemistry

Abstract

Objectives : to assess the recurrence rate of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) and the relation between persistent (after conization) high-risk human papillomavirus (hr-HPV) infection with the immunoexpression of p16^{INK4a} and p53. **Subjects and methods:**

A series of 104 women subjected to electrosurgical conization was selected for this cross-sectional study. Enrollment was carried out between February 2001 and April 2004 and followed up until December 2006. All women underwent pelvic examination and samples for Pap smears and Hybrid Capture 2 (HC2) were collected. Follow-up (FU) visits were scheduled at each 6 months. This analysis is the result of a 24 months follow-up. Pathological assessment disclosed: 17 cases of CIN 2 and 87 cases of CIN 3.

Results: Twelve cases (11%) of persistent/recurrent CIN were detected during FU. Ninety-six cases (92.1%) stained moderate/strongly for p16^{INK4a} and 80 (76.2%) for p53. The proportion of women with persistent/recurrent CIN was statistically similar regardless of the expression of the two markers. The prospective analysis did not detect any significant difference in persistent/recurrence CIN during FU, regarding p16^{INK4a} (OR = 0.8; 95%CI 0.1 to 6.4) or p53 (OR = 0.9; 95%CI 0.2 to 3.2) positivity. The persistence of hr-HPV was similar in the three arbitrary subsets of women: the whole cohort, women with p16^{INK4a} negative/focal and those with moderate/strong p16^{INK4a}.

Conclusions: This study has demonstrated that p16^{INK4a} and p53, although being well established markers of CIN progression and outcome, are insufficient predictors of CIN recurrence or hr-HPV persistence after conservative treatments.

Introduction

Recurrence after conservative treatments for cervical intraepithelial neoplasia (CIN) is certainly one of the major concerns of practitioner gynecologists. The disease recurs in 5-10% of women treated with diathermy conization in up to 24 months after surgery ^[1,2]. Many studies have been conducted so far analyzing the factors involved with recurrence, and persistent high-risk human papillomavirus (hr-HPV) infection is present in almost 80% of recurrent cases ^(3,4,5). On the other hand, recurrences are restricted to no more than 50% of women with persistent hr-HPV infection, which prompted investigators to assess factors other than the persistent virus that may help the disease to recur ⁽⁶⁾. Host factors (e.g. immunological competence, nutrition) and biomolecular characteristics of CIN have been receiving attention from investigators ^[7].

On the pathological grounds, the oncogenic mechanisms triggered by hr-HPV oncogenes E6 and E7 are currently being investigated. The knowledge obtained so far is still limited, but the relationships of some cell cycle mediators with E6 and E7 are well understood ^[8,9,10,11]. p16^{INK4a} and p53 constitute part of a complex amalgam of proteins that interact to control the cell shift from G1 to S. p16^{INK4a} has been demonstrated to be a surrogate marker of hr-HPV, and its overexpression in cervical cells is normally interpreted as a marker of the integration of HR-HPV genotype ^[12,13,14,15]. Mutation of the gene leads to the inactivation of the suppressor activity of p53, which in turn disrupts the mechanisms of DNA repair, apoptosis induction and regulation of the cell growth ^[16]. There is firm documentation of the role played by the inactivation of p53 in the carcinogenesis of cervical cancer. It is believed that the HPV E6 oncogene enhances p53 degradation, and

inactivation of the gene seems to be required for maintenance of proliferative phenotypes of cervical carcinoma cells [17,18].

Clinical studies have suggested a relationship between p16^{INK4a} and p53 with CIN progression and outcomes. The expression of p16^{INK4a} augments in line with the progression of CIN 1 to CIN 3, whereas variable and conflicting immunostaining for p53 has been found in different samples of CIN and squamous cervical cancers [19,20]. It is not known, however, whether p16^{INK4a} and p53 expression may relate to the recurrence rates of CIN after conservative treatments. Theoretically, these two markers allow evaluating the degree of integration of hr-HPV in the host genome, therefore reflecting the aggressiveness of the disease. In this study, we prospectively assess the recurrence rate of CIN and the relation between persistent hr-HPV infection after cervical conization with the expression of p16^{INK4a} and p53, as a means of investigating the potential use of these markers as risk estimators of CIN recurrence in women with persistent hr-HPV infection after conization.

Subjects and Methods

Women selection and examination routine

A series of 104 women, treated at the Colposcopy Clinic of Medical School Hospital of Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Campinas, Brazil, due to cytological abnormalities in referral Pap smears, was selected for this prospective study. All women were subjected to an interview, addressing clinical and socio-demographic concerns, and shortly afterwards to a thorough pelvic examination, including colposcopy. Collection of new cervical samples for Pap smears and for Hybrid Capture

2 (HC2) was performed immediately before performing biopsy or electrosurgical conization. Enrollment was carried out between February 2001 and April 2004. Follow-up (FU) visits were scheduled at each 6 months during the first two years and annually thereafter. Patients were followed for up to 24 months (mean 16.2mths). Exact figures for the FU visits attendance and disease persistence/recurrence are provided in table 1. Pap smear, HC2 and colposcopy, with biopsy when necessary, were performed at each visit. The local Ethics Committee approved the study protocol and all women signed an informed consent form stating their agreement to enter the study.

Cytological diagnosis

Cervical smears were collected immediately before conization, fixed in alcohol and sent to our Cytopathology Laboratory. Smears were stained according to the Papanicolaou technique, and evaluated using the 2001 Bethesda System Terminology^[21].

Hybrid Capture 2[®]

The storage of specimens and all reagents, as well as test procedures were done according to the manufacturer's instructions (*Digene Diagnostics Inc., USA*). Specimens for HC2 were tested for probe B (high-risk HPVs: types 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 and 68)^[22], and classified as positive when the relative light unit ratio (RLU) was 1 pg/ml or greater [index resulting from the ratio between RLU of the specimen/mean RLU of two positive controls (PC)-HC].

Histopathology

Biopsies and treatment of cervical lesions (electrosurgical conization) were preferentially accomplished during the same procedure. Tissue samples were fixed in 10% phosphate-buffered formalin, embedded in paraffin and stained with hematoxylin and eosin (HE) for morphological diagnosis. Pathological criteria were in accordance to the World Health Organization, grading CIN in three degrees ^[23].

Immunohistochemistry (IHC)

IHC reactions were performed on 5 µm sections obtained from the paraffin embedded tissue blocks. Sections were transferred to silanized slides, deparaffinized in xylene and hydrated in ethanol and phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4). Antigen retrieval was performed after endogenous peroxidase blocking with 3% H₂O₂ in a steamer at 90°C for 30 min. The slides were then incubated for 30 minutes in a humid chamber at 37°C with the antibodies: anti-p53 (clone DO-7; diluted 1 in 100; Dakicytomation, Copenhagen, Denmark), and anti-p16 (clone-NCC-RAs-001; diluted 1 in 20; Novocastra, Newcastle, UK). Specific binding of primary antibodies were detected by the Envision® system for p53 (30 minutes at room temperature; Dakicytomation, Copenhagen, Denmark) and by the Novolink® system for p16 (Novocastra). Labelling was visualized with 3,3'-diaminobenzidine (D-5637; Sigma, St. Luis, MO, USA) added to H₂O₂ 3% in phosphate-buffered saline (pH 7.6). Counterstaining was made with Mayer's hematoxylin and mounted permanently with Entellan® (Merck, Darmstadt, Germany). Positive controls consisted of tissues with previous immunoreactivity for each marker. Negative controls consisted of the same tissues used as positive controls, where the primary antibodies were omitted.

Assessment of immunostaining

Reading of immunostaining slides was performed by one investigator, who was uninformed of the morphological diagnoses and of hr-HPV status. Digitalized photographs of high-power fields (400×) were taken from areas showing the most intense immunoreaction (hot-spots) with a Nikon COOLPIX Camera 995. Images were transferred to personal-computer-based software for histological analyses (Imagelab® 2000).

Immunostaining for p16^{INK4a} was semi-quantified as *negative/focal* when less than 5% of cells were positive, *moderate/strong* when 5–100% were positive in a nuclear and cytoplasmic pattern. For p53, the percentage of cells with nuclear staining was assessed. The semi-quantitative analysis of p16INK4A was preferred because it facilitated statistical analysis without loss of information, given the fact that nuclear-cytoplasmic staining might be hard to define in a precise manner. By contrast, the nuclear pattern of p53 staining allows precise counts of the nuclei stained, which obviates the need for semi-quantification.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using R environment for statistical computing (R environment), and 95% confidence intervals (95%CI) were calculated where appropriate. Cumulative probabilities of CIN persistence/recurrence were calculated using the Nelson-Aalen cumulative hazard estimator method. Multivariate survival (Cox proportional hazards) analysis was used to calculate Hazard Ratios (HR) for A)

persistent/recurrent CIN as a function of p16^{INK4A} and p53 immunostaining and B) persistent HPV infection in three distinct cohorts: 1) the complete sample; 2) women with p16^{INK4a} negative/focal; and 3) women with p16^{INK4A} moderate/strong; adjusted for clinical and epidemiological characteristics.

Results

Patient's ages ranged 21.8-61.6 years (mean 35.9). Twelve cases (11%) of persistent/recurrent CIN were detected during. Persistent/recurrent disease were more prevalent in women with persistent hr-HPV (9/36 = 25%) compared to women whose hr-HPV infection was cleared after conization (3/68 = 4%). Table 1 shows the persistence/recurrence probabilities in three distinct groups: hr-HPV positive (during FU), hr-HPV negative and the complete cohort.

Ninety-six cases (92.1%) stained strongly for p16^{INK4a} and 80 (76.2%) for p53. The prospective analysis did not detect any significant difference in persistent/recurrence CIN during FU regarding p16^{INK4a} (OR = 0.8; 95%CI 0.1 to 6.7) or p53 (OR = 0.9; 95%CI 0.2 to 3.2) (Table 2).

The persistence of HPV was similar in the three arbitrary subsets of women: the whole cohort, women with p16INKa4 negative/focal and those with p16INKa4 moderate/strong. Neither of the studied parameters was shown to relate with HPV persistence over time, as can be seen in Table 3.

Discussion

The lack of biological markers other than persistent hr-HPV infection to predict CIN persistence/recurrence after diathermy conization precludes a better clinical management of women submitted to this type of treatment. p16^{INK4a} and p53 have been studied to large extent so far, as predictors of disease outcome and as markers of the progression from low- to high-grade CIN [15]. In clinical settings, prediction markers are urgently needed in order to reduce follow-up consultations, patients' discomfort and expenses. The cyclin-dependent kinase inhibitor p16^{INK4a} is one of the most promising candidate predictive markers, because it has been shown to be a reliable surrogate marker of HPV oncogenes integration in the host cervical cells. The staining patterns of p16^{INK4a} across the different CIN grades has been firmly described, and attempts have been made to use these markers as potential tools to predict, for instance, the potential outcome of CIN2 in untreated women [24]. p53 has well known functions within the cell-cycle control mechanisms. Although the staining patterns of the marker remain controversial in CIN lesions, the reduced expression of p53 is an acknowledgeable sign of effective HPV E6 integration in the host's genome [9].

p16^{INK4a} has been proposed as a marker of high-grade CIN in cytological specimens (25,26). However, its role as an adjunct in the diagnosis of high-grade CIN was severely contested [27,28]. It would be of interest to gynecology practitioners to circumvent the limited positive predictive value of hr-HPV testing in determining which women will recur after diathermy conization. So far, a management strategy for women treated for CIN has not yet been established. Several investigators propose the use of hr-HPV testing, because HPV-negative women will enjoy a probability of less than 5% to

have a recurrence, contrasted to up to 30% in those with persistent hr-HPV infection [6,29]. However, there are no clear guidelines for those women who have a positive test, given that a more strict follow-up routine would adversely affect the quality of life and lead to unaffordable medical costs, especially when considering public health systems. These arguments justify the search for other markers that could help define a subset of hr-HPV positive women with at substantial risk of CIN recurrence. The search has been focused mainly on biological markers that can be detected by immunostaining, because the technique is affordable and has widespread availability.

In the present report, we did not find any major relation between p16^{INK4a} and p53 expression with the persistence/recurrence of CIN and with persistent hr-HPV infection after cervical conization. In 2004, investigators published a well conducted report addressing the virus clearance after treatment as related to p16^{INK4a} staining in CIN specimens [30]. In that study, although p16^{INK4a} showed a very good correlation with CIN/cancer grade and HR-HPV infection, the marker was of no use to predict HPV clearance after conization. Unfortunately, their results were based upon a series of only 67 CIN cases, collected retrospectively. These negative features of the study demanded the confirmation of its findings by a larger cohort. We provide this confirmation with almost twice the number of cases, now collected prospectively and followed-up for up to 24 months. We believe that our findings, unfortunately, rule out p16^{INK4a} as a candidate marker of CIN recurrence and hr-HPV clearance in patients subject to cervical conization. We also used the same approach to evaluate other potential marker, p53, with the same disappointing results. However, to our knowledge, the evaluation of p53

as a potential marker of CIN recurrence after diathermy conization had not yet been attempted in the existing literature.

This study has demonstrated that p16^{INK4a} and p53, although being good and well-known markers of CIN progression and outcome, are insufficient predictors of CIN recurrence after conservative treatments. To our knowledge, the most reliable marker of increased risk of CIN recurrence is still a positive hr-HPV test after conization, but the low predictive positive value of hr-HPV testing precludes its widespread use in clinical practice.

Acknowledgements

The authors acknowledge the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for grants #06/01521-0 and 04/09309-5. JV, LAA and SD are researchers of the Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

1. Flannelly G, Bolger B, Fawzi H, De Lopes AB, Monaghan JM. Follow up after LLETZ: could schedules be modified according to risk of recurrence? *BJOG*. 2001; 108:1025-30.
2. Milojkovic M. Residual and recurrent lesions after conization for cervical intraepithelial neoplasia grade 3. *Int J Gynaecol Obstet*. 2002; 76:49-53.
3. Parazzini F, La Vecchia C, Negri E *et al*. Risk factors for cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer*. 1992; 69:2276-82.
4. Sarian LO, Derchain SF, Andrade LA, Tambascia J, Morais SS, Syrjanen KJ. HPV DNA test and Pap smear in detection of residual and recurrent disease following loop electrosurgical excision procedure of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol*. 2004; 94(1):181-6.
5. Lorenzato M, Caudroy S, Bronner C *et al*. Cell cycle and/or proliferation markers: what is the best method to discriminate cervical high-grade lesions? *Hum Pathol*. 2005; 36(10):1101-7.
6. Zielinski GD, Bais AG, Helmerhorst TJ *et al*. HPV testing and monitoring of women after treatment of CIN 3: review of the literature and meta-analysis. *Obstet Gynecol Surv* 2004; 59(7):543-53.
7. Castle PE, Giuliano AR. Chapter 4: Genital tract infections, cervical inflammation, and antioxidant nutrients--assessing their roles as human papillomavirus cofactors. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2003; 31:29-34.
8. Kim YT, Zhao M. Aberrant cell cycle regulation in cervical carcinoma. *Yonsei Med J*. 2005; 46(5):597-613.

9. Baak JP, Kruse AJ, Robboy SJ, Janssen EA, van Diermen B, Skaland I. Dynamic behavioural interpretation of cervical intraepithelial neoplasia with molecular biomarkers. *J Clin Pathol*. 2006; 59(10):1017-28.
10. Benevolo M, Mottolese M, Marandino F *et al*. Immunohistochemical expression of p16(INK4a) is predictive of HR-HPV infection in cervical low-grade lesions. *Mod Pathol*. 2006;19(3):384-91.
11. Narisawa-Saito M, Kiyono T. Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: Roles of E6 and E7 proteins. *Cancer Sci*. 2007 Jul 23; [Epub ahead of print]
12. Wang SS, Trunk M, Schiffman M *et al*. Validation of p16^{INK4a} as a marker of oncogenic human papillomavirus infection in cervical biopsies from a population-based cohort in Costa Rica. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004;13(8):1355-60.
13. Guimarães MC, Gonçalves MA, Soares CP, Bettini JS, Duarte RA, Soares EGJ. Immunohistochemical expression of p16^{INK4a} and bcl-2 according to HPV type and to the progression of cervical squamous intraepithelial lesions. *Histochem Cytochem*. 2005; 53(4):509-16.
14. Kalof AN, Evans MF, Simmons-Arnold L, Beatty BG, Cooper K. p16^{INK4a} immunoexpression and HPV in situ hybridization signal patterns: potential markers of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol*. 2005; 29(5):674-9.
15. O'Neill CJ, McCluggage WG. p16 expression in the female genital tract and its value in diagnosis. *Adv Anat Pathol*. 2006;13(1):8-15.
16. Oka K, Suzuki Y, Nakano T. Expression of p27 and p53 in cervical squamous cell carcinoma patients treated with radiotherapy alone: radiotherapeutic effect and prognosis. *Cancer*. 2000; 88(12):2766-73.

17. Gonzalez Martin A. Molecular biology of cervical cancer. *Clin Transl Oncol*. 2007; 9(6):347-54.
18. Horner SM, DeFilippis RA, Manuelidis L, DiMaio D. Repression of the human papillomavirus E6 gene initiates p53-dependent, telomerase-independent senescence and apoptosis in HeLa cervical carcinoma cells. *J Virol*. 2004; 78(8):4063-73.
19. Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D *et al*. Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer*. 2001; 92(2):276-84.
20. Murphy N, Ring M, Heffron CC *et al*. p16^{INK4a} CDC6, and MCM5: predictive biomarkers in cervical preinvasive neoplasia and cervical cancer. *J Clin Pathol*. 2005; 58(5):525-34.
21. Solomon D, Davey D, Kurman R *et al*. Forum Group Members; Bethesda 2001 Workshop. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA*. 2002; 287(16):2114-9.
22. Nindl I, Lorincz A, Mielzynska I *et al*. Human papillomavirus detection in cervical intraepithelial neoplasia by the second-generation hybrid capture microplate test, comparing two different cervical specimen collection methods. *Clin Diagn Virol* 1998; 10(1):49-56.
23. Scully RE, Bonfiglio TA, Kurman RJ, Silverberg SG, Wilkins EJ. Histological typing of female genital tract tumors. World Health Organization – International histological classification of tumors. 2nd ed. Berlin: Springer-Verlag; 1994.
24. Guedes AC, Brenna SM, Coelho SA, Martinez EZ, Syrjänen KJ, Zeferino LC. p16(INK4a) expression does not predict the outcome of cervical intraepithelial neoplasia grade 2. *Int J Gynecol Cancer*. 2007 Mar 15; [Epub ahead of print]

25. Guo M, Hu L, Baliga M, He Z, Hughson MD. The predictive value of p16(INK4a) and hybrid capture 2 human papillomavirus testing for high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Clin Pathol*. 2004;122(6):894-901.
26. Pientong C, Ekalaksananan T, Kongyingyoes B, Kritpetcharat O, Swadpanich U, Pengsa P, Yuenyao P. Immunocytochemical staining of p16INK4a protein from conventional Pap test and its association with human papillomavirus infection. *Diagn Cytopathol*. 2004; 31(4):235-42.
27. Bose S, Evans H, Lantzy L, Scharre K, Youssef E. p16(INK4A) is a surrogate biomarker for a subset of human papilloma virus-associated dysplasias of the uterine cervix as determined on the Pap smear. *Diagn Cytopathol*. 2005; 32(1):21-4.
28. Moore GD, Lear SC, Wills-Frank LA, Martin AW, Snyder JW, Helm CW. Differential expression of cdk inhibitors p16, p21cip1, p27kip1, and cyclin E in cervical cytological smears prepared by the ThinPrep method. *Diagn Cytopathol*. 2005; 32(2):82-7.
29. Sarian LO, Derchain SF, Pitta DR, Andrade LA, Morais SS, Figueiredo PG. Human papillomavirus detection by hybrid capture II and residual or recurrent high-grade squamous cervical intraepithelial neoplasia after large loop excision of the transformation zone (LLETZ). *Tumori*. 2005; 91(2):188-92.
30. Branca M, Ciotti M, Santini D 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(4):354-65.

Table 1 – Cumulative probabilities of CIN persistence/recurrence in hr-HPV positive and negative women

Visit	Persistence/recurrences over time					
	hr-HPV positive	Cumulative Probability of recurrence (95%CI)	Hr-HPV negative	Cumulative Probability of recurrence (95%CI)	Complete cohort	Cumulative Probability of recurrence (95%CI)
6 months	7/36	19.4% (5.4 to 31.4%)	1/68	1.5% (0 to 4.3%)	8/104	7.7% (2.4 to 12.7%)
12 months	1/20	23.5% (7.5 to 37.7%)	1/55	3.3% (0 to 7.6%)	2/75	10.2% (3.9 to 16%)
18 months	1/17	28% (9.9 to 42.4%)	0/42	-	1/59	11.7% (4.8 to 16%)
24 months	0/10	-	1/33	6.2% (0 to 13.1%)	1/43	13.7% (5.8 to 21%)

Table 2 – Histological CIN recurrences as related to the expression of p16^{INK4A} and p53

Marker	Histological persistence/recurrence			HR* (IC95%)
	No n (%)	Yes N (%)	Total n (%)	
p16 ^{INK4a}				
Negative/focal	7(87)	1(13)	8(100)	Reference
Moderate/strong	85(88)	11(12)	96(100)	0.8 (0.1 to 6.7)
p53				
0 to 50%	21(87)	3(13)	24(100)	Reference
50 to 100%	71(89)	9(11)	80(100)	0.9 (0.2 to 3.2)

HR = hazard ratio

Table 3 – Prospective analysis of the persistence of HPV infection in women with different p16^{INK4a} status

Characteristic	Hazard Ratio (95% CI)		
	Whole cohort	p16 ^{INK4a} negative/focal	p16 ^{INK4a} moderate/strong
P16 ^{INK4A} positive	1.1 (0.5 to 2.4)	-	-
p53 > 50%	1.1 (0.4 to 2.3)	1.3 (0.7 to 11.4)	1.4 (0.6 to 3.3)
Age ≤ 30 years	1.7 (0.6 to 3.3)	9.3 (0.1 to 67.5)	1.0 (0.2 to 4.2)
Positive conization margins	1.5 (0.7 to 3.0)	NA	1.3 (0.6 to 2.8)
Age at first sexual intercourse <18 years	1.9 (0.7 to 3.0)	1.6 (1.0 to 2.6)	1.3 (0.6 to 2.7)
Life time partners ≥ 2	1.6 (0.6 to 3.4)	18.7 (1.1 to 67.6)	1.5 (0.7 to 3.5)
Oral hormonal contraception	0.9 (0.6 to 2.0)	0.5 (0.1 to 11.5)	0.9 (0.4 to 2.3)
Smoking	1.6 (0.6 to 3.0)	3.0 (0.4 to 21.2)	1.4 (0.7 to 2.8)

4. Discussão

Um dos mais maiores problemas do tratamento conservador das NIC de alto grau é a grande taxa de recidiva ou persistência da doença (Milojkovic, 2002). Nosso estudo avaliou 104 mulheres submetidas a conização por lesões de alto grau por 24 meses. Doze pacientes apresentaram recidivas/persistência da doença sendo oito no primeiro retorno pós-cirúrgico. Embora nove apresentassem CH2 positivas para HPV de alto risco oncogênico, 3 mulheres com recidiva não apresentavam infecção persistente pelo HPV. É possível que a recorrência da doença não esteja ligada somente a infecção persistente pelo HPV, mas também a multifocalidade da doença, inadequada avaliação dos espécimes cirúrgicos (Sarian et al., 2004b).

Com isso, o controle da infecção pelo HPV após a conização se mostrou relevante, porém não suficiente, no manejo de mulheres com NIC e submetidas a conização diatérmica (Arbyn et al., 2005). Por outro lado, devido ao baixo valor preditivo positivo dos testes para HPV, apenas cerca de 25% das mulheres com testes positivos apresentarão recidivas, e não há medida profilática capaz de mudar este padrão de risco.

Atualmente, poucos são os serviços de patologia cervical que tenham introduzido em seus protocolos assistências o teste de HPV nas avaliações clínicas subseqüentes a conização diatérmica. Em primeiro lugar, tal procedimento seria economicamente inviável para a maioria das mulheres e dos serviços de patologia cervical. Em segundo lugar, não está definida qual seria a melhor conduta para mulheres com infecção persistente pelo HPV após a conização (Flannelly et al., 2001; Sarian et al., 2004b; Bae et al., 2007). Sabe-se, entretanto, que estas mulheres estão sob risco elevado cerca de cinco vezes mais de apresentarem recidiva quando comparadas àquelas cujos testes para HPV teriam se tornado negativos após a conização. Portanto, outros marcadores que auxiliem o ginecologista a identificar mulheres com maiores chances de apresentar recidivas após conização diatérmica seriam importantes.

No presente estudo, objetivamos investigar se duas das proteínas mais conhecidas na regulação do ciclo celular, a p16^{INK4A} e o p53, poderiam ser usadas para ajudar na predição de recorrência da NIC após conização diatérmica (Keating et al. 2001; Kruse et al., 2001, 2003).

A p16^{INK4A} tem sua expressão aumentada conforme se agrava a NIC e é um marcador confiável da integração do genoma do HPV de alto risco (e, portanto, da atuação dos oncogenes E6 e E7) já a p53, por seu turno, é proteína diretamente relacionada ao controle da passagem do ciclo celular de G1 para S, sendo que sua expressão é fundamental para que o processo de apoptose se dê em quantidade e qualidade suficientes para evitar a proliferação celular desordenada (Kim et al., 2005; Baak et al., 2006).

Sem entrar em detalhamentos biológicos, já abordados anteriormente ao longo da introdução e dos dois artigos preparados para a publicação, pode-se dizer que, nas lesões em que se tenha a informação sobre a expressão da p16^{INK4A} e da p53, também se teria informação sobre o estado do mecanismo de controle de proliferação celular. O presente estudo procurou tirar proveito dos conhecimentos previamente obtidos sobre a p16^{INK4A} e a p53 em termos clínicos. Até o momento, os estudos mais consistentes sobre estas proteínas têm caráter principalmente diagnóstico, enquanto os estudos sobre a aplicação clínica destes marcadores no seguimento pós tratamento ainda se encontram em fase incipiente (Branca et al., 2004; Queiroz et al., 2006a, 2006b; Guedes et al., 2007).

Na presente amostra, composta de mulheres acompanhadas por até 24 meses, tanto a p16^{INK4A} como a p53 não demonstraram ter relevância clínica, pelo menos sob o aspecto do controle pós operatório das mulheres submetidas a tratamento conservador da NIC.

A adição da quantificação de p16^{INK4A} ou do p53 ao arsenal propedêutico parecia razoável do ponto de visto biológico e clínico (Klaes et al., 2001; Kruse et al., 2001; Kruse et al., 2003). Ambos os marcadores estão diretamente associados à gravidade da NIC, e sabe-se que quão mais grave a neoplasia pré invasora, maior sua chance de recidiva. Entretanto, nossas expectativas não se confirmaram. É possível que a avaliação da p16^{INK4A} e da p53 através de imunohistoquímica não seja suficientemente precisa para determinar a situação efetiva em que se encontra o ciclo celular, a ponto de se antever o desenlace clínico das lesões. De

fato, os estudos biológicos sobre p16^{INK4A} apenas demonstraram relação deste marcador com o grau da NIC e, secundariamente, com a integração do genoma viral.

Já com relação à p53, há também resultados controversos. Embora sua participação no controle do ciclo celular seja conhecida há longa data, os resultados com imunohistoquímica em casos de NIC foram controversos. Em princípio, se esperaria menor expressão de p53 em paralelo ao agravamento da NIC ou mesmo câncer, porém quantificações por imunohistoquímica nem sempre chegaram a esta conclusão. É possível, portanto, que embora a hipótese de potencial relação clínica entre a expressão de p16^{INK4A} e p53 faça sentido, teoricamente, limitações do método de quantificação destes marcadores, aqui incluído nosso estudo, impossibilitem comprovar tal correlação.

O tamanho amostral foi mais que adequado e as quantificações imunohistoquímicas foram realizadas dentro de padrões pré definidos e com controle rigoroso de qualidade. O seguimento também foi efetivo, permitindo a obtenção de quantidades substantivas de dados prospectivos. Duas direções poderiam ser então tomadas, já que a obtenção de marcador de risco para recidivas é necessária: 1) tentar novas quantificações destes mesmos marcadores, cujo papel biológico é conhecido e potencialmente associável à desenlaces clínicos, através de técnicas de maior precisão quanti-qualitativa (ex. linear array; cDNA, FISH); 2) verter para testes com outras moléculas relacionadas ao ciclo celular, ainda que seus papéis biológicos não estejam claramente definidos e que eventuais correlações clínicas não sejam tão prováveis quanto aquelas atribuíveis à p16^{INK4A} e p53.

5. Conclusões

- **Artigo 1:** A expressão da p16^{INK4A} aumentou significativamente de acordo com a gravidade da NIC, embora a expressão do p53 não tenha variado nos diversos graus de NIC. Não houve correlação entre a expressão do p53 e da p16^{INK4A} com a detecção de HPV de alto risco oncogênico.
- **Artigo 2:** Neste estudo o p16^{INK4a} e o p53, foram marcadores insuficientes para prever a recidiva/persistência da NIC após tratamento conservador. Também não foi observada nenhuma associação entre a expressão da p16 e da p53 com a infecção persistente por HPV de alto risco oncogênico após conização.

6. Referências Bibliográficas

Agoff SN, Lin P, Morihara J, Mao C, Kiviat NB, Koutsky LA. p16(INK4a) expression correlates with degree of cervical neoplasia: a comparison with Ki-67 expression and detection of high-risk HPV types. *Mod Pathol*. 2003; 16(7):665-73.

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. Molecular Biology of the Cell Published by Garland Publishing, 1994 Chapter 17 – The General Strategy of the Cell Cycle. Disponível on-line em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/books/cell.section4584>

Arbyn M, Paraskevaidis E, Martin-Hirsch P, Prendiville W, Dillner J. Clinical utility of HPV-DNA detection: triage of minor cervical lesions, follow-up of women treated for high-grade CIN: an update of pooled evidence. *Gynecol Oncol*. 2005;99(3 Suppl 1):S7-11.

Baak JP, Kruse AJ, Robboy SJ, Janssen EA, van Diermen B, Skaland I. Dynamic behavioural interpretation of cervical intraepithelial neoplasia with molecular biomarkers. *J Clin Pathol*. 2006; 59(10):1017-28.

Bae JH, Kim CJ, Park TC, Namkoong SE, Park JS. Persistence of human papillomavirus as a predictor for treatment failure after loop electrosurgical excision procedure. *Int J Gynecol Cancer*. 2007 18; [Epub ahead of print]

Beasley MB, Lantuejoul S, Abbondanzo S et al. The P16/cyclin D1/Rb pathway in neuroendocrine tumors of the lung. *HumPathol*. 2003;34(2):136-42.

Bosari S, Roncalli M, Viale G, Bossi P, Coggi G. p53 immunoreactivity in inflammatory and neoplastic diseases of the uterine cervix. *J Pathol*. 1993;169(4):425-30.

Braganca JF, Derchain SF, Sarian LO et al. Aided visual inspection with acetic acid (VIA) and HPV detection as optional screening tools for cervical cancer and its precursor lesions. *Clin Exp Obstet Gynecol*. 2005;32(4):225-9.

Branca M, Ciotti M, Santini D 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(4):354-65.

Denny L. The prevention of cervical cancer in developing countries. *BJOG*. 2005;112(9):1204-12.

Dray M, Russell P, Dalrymple C et al. p16(INK4a) as a complementary marker of high-grade intraepithelial lesions of the uterine cervix. I: Experience with squamous lesions in 189 consecutive cervical biopsies. *Pathology*. 2005;37(2):112-24.

Duggan BD, Felix JC, Mudespah LI, Gebhardt JA, Groshen S, Morrow CP. Cold-knife conization versus conization by the loop eletrosurgical excision procedure: a randomized, prospective study. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 180:276-82.

Finlay CA, Hinds PW, Tan TH, Eliyahu D, Oren M, Levine AJ. Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc70-p53 complex with an altered half-life. *Mol Cell Biol*. 1988;8(2):531-9.

Flannelly G, Bolger B, Fawzi H, De Lopes AB, Monaghan JM. Follow up after LLETZ: could schedules be modified according to risk of recurrence? *BJOG*. 2001; 108:1025-30.

Gontijo RC, Derchain SF, Roteli-Martins C et al. Human papillomavirus (HPV) infections as risk factors for cytological and histological abnormalities in baseline PAP smear-negative women followed-up for 2 years in the LAMS study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2007; 133(2):239-46.

Guedes AC, Brenna SM, Coelho SA, Martinez EZ, Syrjänen KJ, Zeferino LC. p16(INK4a) Expression does not predict the outcome of cervical intraepithelial neoplasia grade 2. *Int J Gynecol Cancer.* 2007 15; [Epub ahead of print]

Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers *Science.* 1991; 5;253(5015):49-53.

Instituto Nacional do Câncer-Ministério da Saúde Estimativa de incidência de Câncer no Brasil para 2006. acessado em 10/08/2007 . Disponível online em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2006/>

Kalof AN, Evans MF, Simmons-Arnold L, Beatty BG, Cooper K. p16INK4A immunoexpression and HPV in situ hybridization signal patterns: potential markers of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol.* 2005; 29(5):674-9.

Kalof AN, Cooper K. p16INK4a immunoexpression: surrogate marker of high-risk HPV and high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Adv Anat Pathol.* 2006;13(4):190-4.

Keating JT, Cviko A, Riethdorf S et al. Ki67, cyclin E, and p16INK4 are complimentary surrogate biomarkers for human papillomavirus-related cervical neoplasia. *Am J surg Pathol* 2001; 25:884-91.

Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D et al. Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer.* 2001 15;92(2):276-84.

Klaes R, Benner A, Friedrich T et al. p16INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol*. 2002; 26(11):1389-99.

Kim YT, Zhao M. Aberrant cell cycle regulation in cervical carcinoma. *Yonsei Med J*. 2005 31;46(5):597-613.

Koliopoulos G, Arbyn M, Martin-Hirsch P, Kyrgiou M, Prendiville W, Paraskevaidis E. Diagnostic accuracy of human papillomavirus testing in primary cervical screening: a systematic review and meta-analysis of non-randomized studies. *Gynecol Oncol*. 2007;104(1):232-46.

Kruse AJ, Baak JP, de Bruin PC et al. The HS . Ki67 immunoquantitation in cervical intraepithelial neoplasia (CIN): a sensitive marker for grading. *J Pathol* 2001; 193:48-54.

Kruse AJ, Baak JP, Janssen EA et al. Low and high risk CIN1 and CIN2 lesions: prospective value of grade, HPV and Ki67 immunoquantitative variables. *J Pathol* 2003; 199:462-70.

Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour suppressor gene. *Nature*. 1991;351(6326):453-6.

Lin CT, Tseng CJ, Lai CH et al. Value of human papillomavirus deoxyribonucleic acid testing after conization in the prediction of residual disease in the subsequent hysterectomy specimen. *Am J Obstet Gynecol*. 2001;184:940-5.

Longatto-Filho A, Erzen M, Branca M et al. Human papillomavirus testing as an optional screening tool in low-resource settings of Latin America: experience from the Latin American Screening study. *Int J Gynecol Cancer*. 2006;16(3):955-62.

Mathevet P, Chemali E, Roy M, Dargent D. Long-term outcome of a randomized study comparing three techniques of conization: cold knife, laser, and LEEP. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2003;106(2):214-8.

McCluggage WG, Bharucha H, Caughley LM et al. Interobserver variation in the reporting of cervical colposcopic biopsy specimens: comparison of grading systems *J Clin Pathol*. 1996;49(10):833-5.

Milojkovic M. Residual and recurrent lesions after conization for cervical intraepithelial neoplasia grade 3. *Int J Gynaecol Obstet* 2002; 76:49-53.

Muñoz N, Bosch FX, de Sanjose S et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003; 348:518-27.

Murphy N, Ring M, Heffron CC et al. p16^{INK4a} CDC6, and MCM5: predictive biomarkers in cervical preinvasive neoplasia and cervical cancer. *J Clin Pathol*. 2005;58(5):525-34.

Nagai Y, Maehama T, Asato T, Kanazawa K. Persistence of human papillomavirus infection after therapeutic conization for CIN 3: is it an alarm for disease recurrence? *Gynecol Oncol* 2000; 79:294-9.

Nielsen GP, Stemmer-Rachamimov AO, Shaw J, Roy JE, Koh J, Louis DN. Immunohistochemical survey of p16INK4A expression in normal human adult and infant tissues. *Lab Invest*. 1999;79(9):1137-43.

Nobbenhuis MA, Meijer CJ, van den Brule AJ et al. Addition of high-risk HPV testing improves the current guidelines on follow-up after treatment for cervical intraepithelial neoplasia. *Br J Cancer* 2001; 84:796-801.

O'Neill CJ, McCluggage WG. p16 expression in the female genital tract and its value in diagnosis. *Adv Anat Pathol*. 2006;13(1):8-15.

Östor AG. The natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int J Gynecol Pathol* 1993; 12:186-92.

Paraskevaidis E, Kalantaridou SN, Paschopoulos M, Zikopoulos K, Diakomanolis E, Dalkalitsis N, et al. Factors affecting outcome after incomplete excision of cervical intraepithelial neoplasia. *Eur J Gynecol Oncol*. 2003; 24:541-3.

Park JY, Lee SM, Woo Yoo C et al. Risk factors predicting residual disease in subsequent hysterectomy following conization for cervical intraepithelial neoplasia (CIN) III and microinvasive cervical cancer. *Gynecol Oncol*. 2007 18; [Epub ahead of print].

Queiroz C, Silva TC, Alves VA et al. Comparative study of the expression of cellular cycle proteins in cervical intraepithelial lesions. *Pathol Res Pract*. 2006a; 202(10):731-7a.

Queiroz C, Silva TC, Alves VA et al. p16(INK4a) expression as a potential prognostic marker in cervical pre-neoplastic and neoplastic lesions. *Pathol Res Pract*. 2006b;202(2):77-83b.

Rocco JW, Sidransky D. p16(MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression. *Exp Cell Res*. 2001;264(1):42-55.

Rocco JW, Li D, Liggett WH Jr, Duan L, Saunders JK Jr, Sidransky D, O'Malley BW Jr. p16INK4A adenovirus-mediated gene therapy for human head and neck squamous cell cancer. *Clin Cancer Res*. 1998;4(7):1697-704.

Rotter V, Prokocimer M p53 and human malignancies. *Adv Cancer Res*. 1991;57:257-72.

Sarian LO, Derchain SF, Pitta R, Morais SS, Rabelo-Santos SH. Factors associated with HPV persistence after treatment for high-grade cervical intra-epithelial neoplasia with large loop excision of the transformation zone (LLETZ). *J Clin Virol*. 2004a;31(4):270-4.

Sarian LO, Derchain SF, Andrade LA, Tambascia J, Morais SS, Syrjanen KJ. HPV DNA test and Pap smear in detection of residual and recurrent disease following loop electrosurgical excision procedure of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol*. 2004b;94(1):181-6.

Sarian LO, Derchain SF, Naud P et al. Evaluation of visual inspection with acetic acid (VIA), Lugol's iodine (VILI), cervical cytology and HPV testing as cervical screening tools in Latin America. This report refers to partial results from the LAMS (Latin AMERICAN Screening) study. *J Med Screen*. 2005;12(3):142-9.

Scheffner M, Münger K, Byrne JC, Howley PM. The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(13):5523-7.

Sharpless NE, Kannan K, Xu J, Bosenberg MW, Chin L. Both products of the mouse Ink4a/Arf locus suppress melanoma formation in vivo. *Oncogene*. 2003 7;22(32):5055-9.

Soufir N, Basset-Seguin N. The INK4a-ARF locus: role in the genetic predisposition to familial melanoma and in skin carcinogenesis *Bull Cancer*. 2001;88(11):1061-7.

Syrjanen SM, Syrjanen KJ. New concepts on the role of human papillomavirus in cell cycle regulation. *Ann Med*. 1999;31(3):175-87.

Syrjanen K, Naud P, Derchain S et al. Comparing PAP smear cytology, aided visual inspection, screening colposcopy, cervicography and HPV testing as optional screening tools in Latin America. Study design and baseline data of the LAMS study. *Anticancer Res*. 2005;25(5):3469-80.

Tangtrakul S, Linasmita V, Israngura N, Srisupundit S, Bullangpoti S, Wilailak S. Detection of residual disease by cytology in patients with cervical intraepithelial neoplasia III post-large loop excision of the transformation zone. *J Obstet Gynaecol Res*. 2002;28(2):95-8.

Vassallo J, Derchain SF, Pinto GA, Martinez EZ, Syrjänen KJ, Andrade LA. High risk HPV and p53 protein expression in cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Gynaecol Obstet*. 2000;71(1):45-8.

Wacholder S. Chapter 18: Statistical issues in the design and analysis of studies of human papillomavirus and cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2003;(31):125-30.

Wentzensen N, Vinokurova S, von Knebel Doeberitz M. Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. *Cancer Res* 2004; 64:3878-84.

Zielinski GD, Bais AG, Helmerhorst TJ et al. HPV testing and monitoring of women after treatment of CIN 3: review of the literature and meta-analysis. *Obstet Gynecol Surv* 2004;59(7):543-53.

7. Anexos

7.1. Anexo 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

PERSISTÊNCIA DO DNA-HPV APÓS A CONIZAÇÃO COM CIRURGIA DE ALTA FREQUÊNCIA (CAF) EM MULHERES COM NIC 2 OU 3

Eu, Sra _____, portadora do RG _____, atendida no Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM) no ambulatório de Patologia Cervical, participo da pesquisa “Persistência do DNA-HPV após a Conização com Cirurgia de Alta Frequência (CAF) em mulheres com NIC 2 ou 3”. Fui convidada a participar de uma continuação desta pesquisa que será realizada com o material que eu já coletei antes (aquela que identifica o vírus). Sei que este estudo tem como objetivo avaliar a presença do HPV de alto risco oncológico no meu colo uterino antes e após a conização por cirurgia de alta frequência. O exame que foi feito antes identificou se tinha vírus ou não e este novo teste, chamado PCR irá determinar o tipo específico de vírus eventualmente presente no material que eu já coletei.

Fui esclarecida quanto ao meu direito de não participar da pesquisa e a não aceitação na participação no estudo não implicará na perda dos direitos iniciais rotineiramente oferecidos pelo ambulatório. Sei também que a qualquer momento posso desistir de participar da pesquisa, sem nenhum dano para a minha saúde e tratamento. Também fui

informada de que não terei custos para participar da pesquisa, pois, o intervalo entre as consultas será o mesmo realizado de rotina no ambulatório. Sei que todas as informações pessoais serão avaliadas somente pelo médico que me atendeu e que as fichas ficarão de posse do(s) Doutore(s) responsáveis pela pesquisa, Doutora Sophie Françoise Mauricette Derchain, Dr. Luis Otávio Zanatta Sarian e Dra. Joana Fróes Bragança que manterão o sigilo da fonte destas informações. Em caso de dúvidas ou esclarecimento, tenho o direito de entrar em contato com os Drs. Luís Otávio Zanatta Sarian, Joana Fróes Bragança e Sophie F M Derchain, no telefone 3788-9305 ou com o Comitê de Ética em Pesquisa da UNICAMP no telefone 3788-8936.

Nome da paciente _____

Assinatura da paciente: _____

Campinas, _____ de _____ de 200____.

Nome do pesquisador _____

Assinatura do pesquisador: _____

Campinas, _____ de _____ de 200____.

7.2. Anexo 2– Parecer do Comitê de Ética em pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas- Unicamp



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas, SP
(0_19) 3788-8936
FAX (0_19) 3788-8925
www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html
cep@fcm.unicamp.br

CEP, 21/09/04.
(Grupo III)

PARECER PROJETO: N° 309/2004

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “RECIDIVA DA NEOPLASIA INTRA-EPITELIAL CERVICAL APÓS CONIZAÇÃO DIATÉRMICA EM MULHERES COM INFECÇÃO PELO PAILOMAVÍRUS HUMANO (HPV), EM FUNÇÃO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS MARCADORAS DA REGULAÇÃO DO CICLO”

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Sophie Françoise Mauricette Derchain

INSTITUIÇÃO: CAISM/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 28/06/2004

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 21/09/05

II - OBJETIVOS

Avaliar a ocorrência de persistência ou recidiva da neoplasia intra-epitelial após conização diatérmica, em até 36 meses após o tratamento, em mulheres com infecção pelo HPV em função da expressão de proteínas relacionadas ao controle de ciclo celular, da apoptose e da invasividade tumoral e neo-angiogênese. A pesquisa pretende auxiliar no planejamento de medidas propedêuticas e terapêuticas que visem otimizar o seguimento clínico após o tratamento conservador da neoplasia intra-epitelial.

III - SUMÁRIO

Trata-se de uma pesquisa de doutorado na forma de estudo clínico prospectivo envolvendo mulheres atendidas no laboratório de Patologia Cervical do CAISM submetidas à conização diatérmica do colo do útero e com neoplasia intra-epitelial cervical 2 ou 3. as mulheres serão acompanhadas por 36 meses. O tamanho amostral será calculado com base em informações estabelecidas sobre a prevalência de infecção dos HPV tipo 16 18 e outros de alto risco oncogênico. Os critérios de inclusão e exclusão estão bem definidos e a metodologia da pesquisa está bem detalhada.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

O protocolo está bem explicado e o TCLE está claro. O material coletado para teste de HPV será coletado em conjunto com aquele para a colpocitologia oncológica, sem desconforto adicional para as mulheres participantes da pesquisa.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na IX Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 21 de setembro de 2004.


Prof. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

7.3. Anexo 3 – Painei imuno-histoquímico :

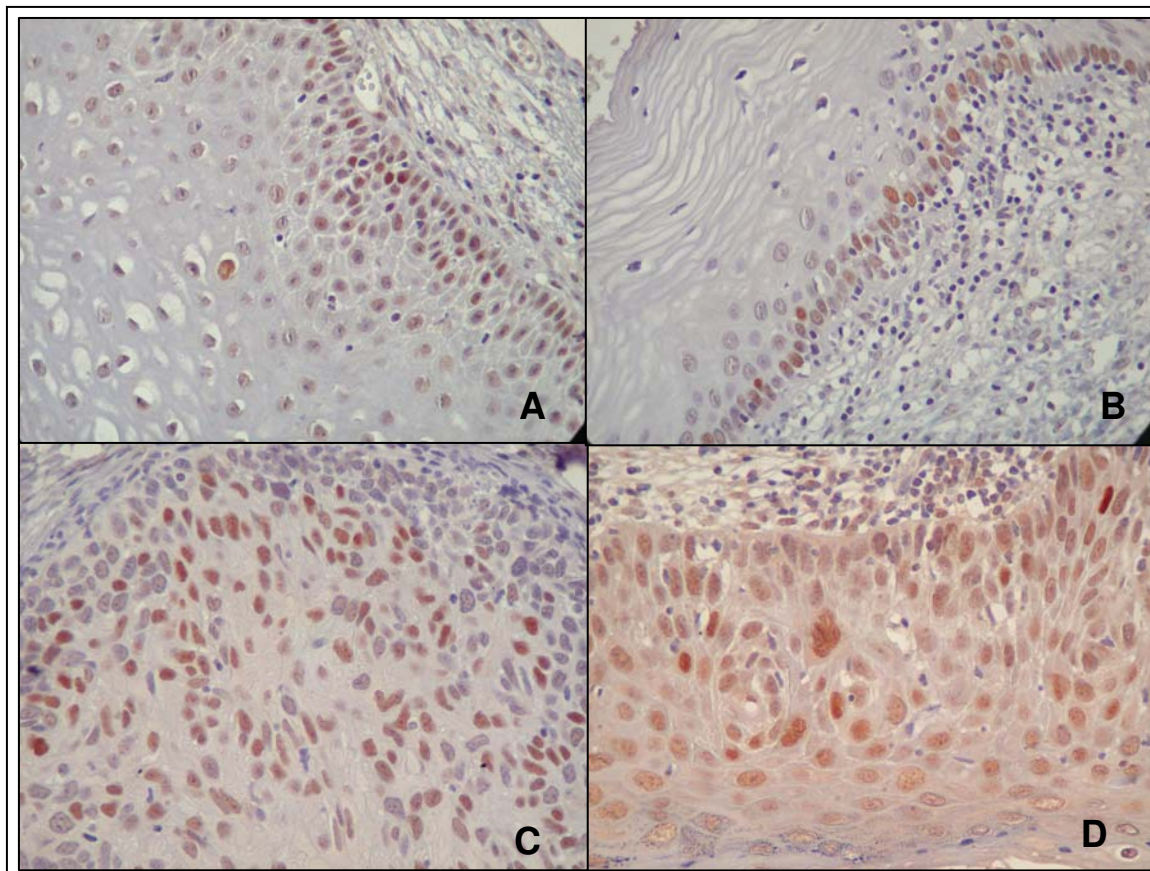


Figura 1. Fotomicrografia representativa de casos positivos para p53 de A. NIC I, 400X (aumento original). B. NIC I, 400X (aumento original). C. NIC III, 400X (aumento original). D. NIC III, 400X (aumento original).

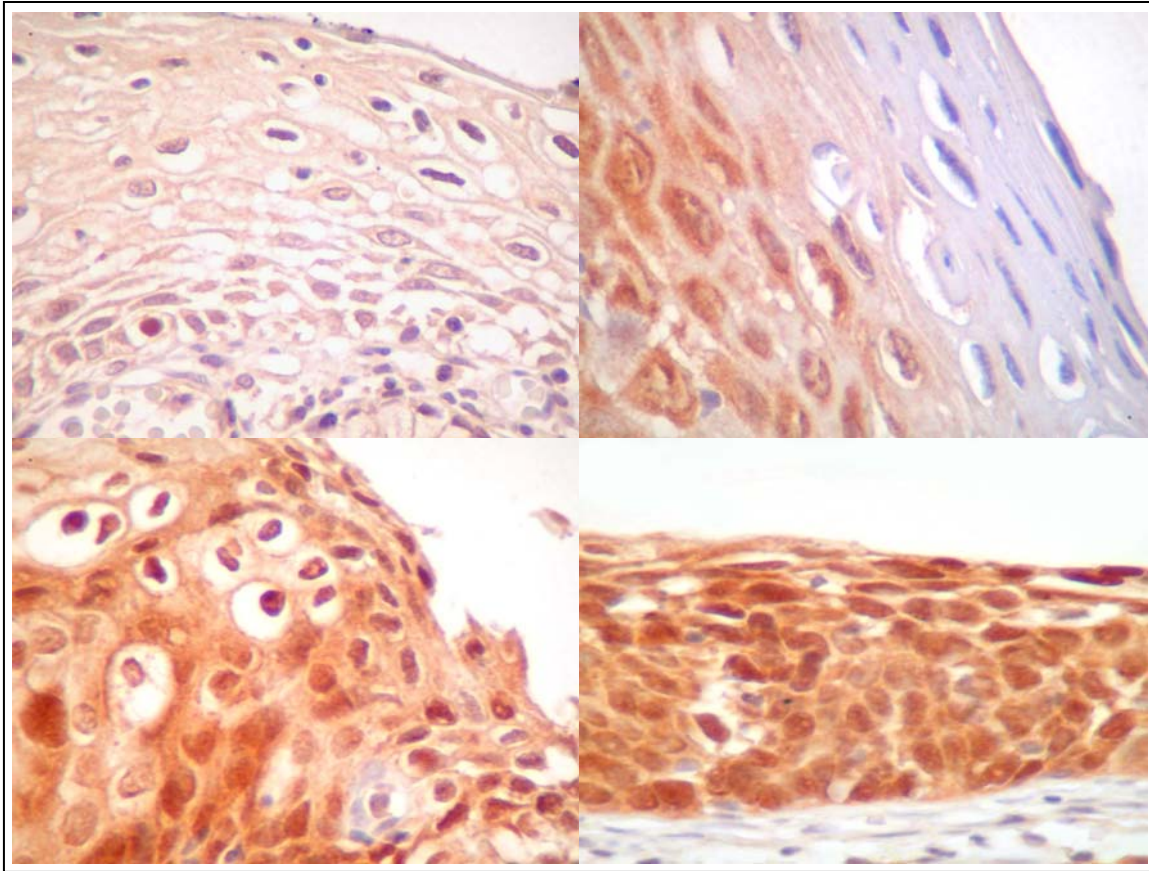


Figura 2. Imunoperoxidase, 400X (aumento original). B. NIC I. Positividade (nuclear e citoplasmática) para p16^{INK4A} restrita à porção displásica do epitélio (terço basal). Imunoperoxidase, 400X (aumento original). C. NIC II. Positividade (nuclear e citoplasmática) para p16^{INK4A} em toda a espessura do epitélio. Imunoperoxidase, 400X (aumento original). D. NIC III. Positividade (nuclear e citoplasmática) para p16^{INK4A} em toda a espessura do epitélio. Imunoperoxidase, 400X (aumento original).

7.4. Anexo 4 – Mini-currículo da candidata desde o seu ingresso na pós-graduação

I-Mestrado

Contribuição da Inspeção Visual com Ácido Acético e da Captura Híbrida II como métodos adjuntos à colpocitologia oncológica na detecção das lesões precursoras e/ou do câncer cervical - Universidade Estadual de Campinas/2004.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sophie Françoise Mauricette Derchain.

II-Trabalhos publicados na íntegra em periódicos indexados no Scielo ou Pubmed:

1. Gontijo R, Derchain S, Roteli-Martins C, Sarian L, Bragança J, Silva SM, Zeferino LC. Avaliação de métodos alternativos a citologia no rastreamento de lesões cervicais: detecção de DNA-HPV e inspeção visual. Rev. Bras. Ginecol. Obstet., Abr 2004, vol.26, no.3, p.251-251.
2. Gontijo R, Derchain S, Roteli-Martins C, Sarian L, Bragança J, Zeferino LC, Silva SM Avaliação de métodos alternativos à citologia no rastreamento de lesões cervicais: detecção de DNA-HPV e inspeção visual. Rev. Bras. Ginecol. Obstet., 2004;26(4):269-275.
3. Braganca JF, Derchain SF, Sarian LO, Messias da Silva SM, Labatte S, Zeferino LC. Contribuição da inspeção visual com ácido acético e da captura híbrida II como métodos adjuntos à colpocitologia oncológica na detecção das lesões precursoras e/ou do câncer cervical. Rev. Bras. Ginecol. Obstet., Jan 2005, 27(1)46-46.

4. Syrjanen K, Naud P, Derchain S, Roteli-Martins C, Longatto-Filho A, Tatti S, Branca M, Erzen M, Hammes LS, Matos J, Gontijo R, Sarian L, Braganca J, Arlindo FC, Maeda MY, Lorincz A, Dores GB, Costa S, Syrjanen S. Comparing PAP smear cytology, aided visual inspection, screening colposcopy, cervicography and HPV testing as optional screening tools in Latin America. Study design and baseline data of the LAMS study. *Anticancer Res.* 2005;25(5):3469-80.
5. Sarian LO, Derchain SF, Naud P, Roteli-Martins C, Longatto-Filho A, Tatti S, Branca M, Erzen M, Serpa-Hammes L, Matos J, Gontijo R, Braganca JF, Lima TP, Maeda MY, Lorincz A, Dores GB, Costa S, Syrjanen S, Syrjanen K. Evaluation of visual inspection with acetic acid (VIA), Lugol's iodine (VILI), cervical cytology and HPV testing as cervical screening tools in Latin America. This report refers to partial results from the LAMS (Latin American Screening) study. *J Med Screen.* 2005;12(3):142-9.
6. Braganca JF, Derchain SF, Sarian LO, Messias da Silva SM, Labatte S, Zeferino LC. Aided visual inspection with acetic acid (VIA) and HPV detection as optional screening tools for cervical cancer and its precursor lesions. *Clin Exp Obstet Gynecol.* 2005;32(4):225-9.
7. Longatto-Filho A, Erzen M, Branca M, Roteli-Martins C, Naud P, Derchain SF, Hammes L, Sarian LO, Braganca JF, Matos J, Gontijo R, Lima T, Maeda MY, Tatti S, Syrjanen S, Dores G, Lorincz A, Syrjanen K. Human papillomavirus testing as an optional screening tool in low-resource settings of Latin America: experience from the Latin American Screening study. *Int J Gynecol Cancer.* 2006; 16(3):955-62.
8. Gontijo RC, Derchain SF, Roteli-Martins C, Braganca JF, Sarian LO, Moraes SS, Maeda MY, Longatto-Filho A, Syrjanen K. Human papillomavirus (HPV) infections as risk factors for cytological and histological abnormalities in baseline PAP smear-negative women followed-up for 2 years in the LAMS study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2007;133(2):239-46.

III-Trabalhos publicados na íntegra em periódicos nacionais:

1. Gontijo RC, Derchain SF, Ortiz RT, Guarise R, Sarian LO, Braganca JF, Zeferino LC. Fatores associados às alterações da colpocitologia oncológica, à inspeção visual com ácido acético e à detecção de DNA-HPV. J Bras Doenças Sex Transm 14(4):4-8, 2002.
2. Bonilha A, Scherer P, Paz AR, Bragança JF, Garcia AC, Derchain S. Sigmoidectomia na cirurgia citorrredutora de carcinoma de ovário avançado. Rev Ciênc Méd, Campinas, 12(3):227-233, jul/set, 2003.
3. Zeferino LC, Teixeira JC, Bragança JF. Expandir a cobertura do rastreamento do câncer do colo uterino em mulheres entre 35 e 49 anos de idade é uma prioridade. Femina, setembro 2003, vol 31 n8.
4. Gontijo R, Roteli-Martins C, Derchain SF, Braganca JF, Zeferino LC, Sarian LO, Seera, MP. Comportamento sexual e idade como fatores de risco para lesões intra-epiteliais e invasoras do colo do útero. Rev Ciênc Med, Campinas, 13(1):13-21, jan-mar, 2004.

IV-Trabalhos apresentado em congressos

1. Bragança JF, Montemor EB, Guarisi R, Ortiz R, Zeferino LC, Sarian LO. Fatores sócio-demográficos e reprodutivos associados às alterações citológicas e à detecção de DNA-HPV por captura de híbridos II em mulheres atendidas num programa de rastreamento de lesões cervicais. In: VIII Simpósio Internacional da Sociedade Brasileira de Patologia do Trato Genital Inferior e colposcopia, 2002 Campo Grande, MS. In: Anais do VIII Simpósio Internacional da Sociedade Brasileira de Patologia do Trato Genital Inferior e colposcopia.
2. Bragança JF, Sarian LO, Gontijo R, Silva SM, Zeferino LC, Derchain S, Syrjanen KJ. Screening for cervical cancer: comparing health workers and their relatives with public health service users In: 5th International Multidisciplinary

Congress – EUROGIN, 2003, Paris, França. Final Programme and Abstract book of 5th International Multidisciplinary Congress – EUROGIN, 2003 p.176.

3. Gontijo R, Roteli-Martins C, Derchain SF, Braganca JF, Zeferino LC, Sarian LO, Seera, MP. Comportamento sexual e idade como fatores de risco para lesões intra-epiteliais e invasoras do colo do útero. 50 Congresso Brasileiro de Ginecologia e Obstetrícia, 2003, Recife – Brasil. In: Anais do 50 Congresso Brasileiro de Ginecologia e Obstetrícia, 2003.
4. Gontijo, R; Silva, SM; Bragança, J; Derchain, S; Zeferino LC. Papel da captura de híbridos II em mulheres com resultado citológico de ASCUS. In: Congresso Paulista de Obstetrícia e Ginecologia, 2004, São Paulo, 2004.
5. Gontijo, RC; Silva, SM ; Bragança JF ; Derchain, S; Zeferino, L C. Papel da captura de híbridos II em mulheres com resultado citológico ASCUS. In: IX Congresso Paulista de Obstetrícia e Ginecologia, 2004, São Paulo, 2004.
6. Gontijo, RC ; Rotteli-Martins, C ; Sarian, L ; Zeferino, L C ; Bragança, J F . Sexual behaviour and age as risk factors for intraepithelial and invasive uterine lesions. In: 21st International Papillomavirus Conference, 2004, Cidade do México. In: Abstract Book 21st International Papillomavirus Conference, 2004. p.161.
7. Naud, P; Derchain, S; Rotteli-Martins, C; Longatto Filho, A ; Tatti, S ; Branca, M; Erzen, M; Hammes, L Serpa; Matos, J ; Gontijo, R. C. ; Sarian, L ; Lima, T P ; Maeda, M Y S ; Bragança, J F ; Costa, S ; Syrjanen, S . Aided visual inspection with acetic acid and iodine as optional screening tools in Latin America. Data from the LAMS study. In: 21st International Papillomavirus Conference, 2004, Cidade do México. Abstract Book 21st International Papillomavirus Conference, 2004. p. 148-148.
8. Bragança J, Rabelo-Santos SH, Sarian LO, Natalin RY, Derchain S. Visual inspection with acetic acid: Correlation with Pap Smear. XV International Congress of Cytology, 2004, Santiago do Chile – Chile. In: Abstract book of XV International Congress of Cytology, 2004.

9. Bragança JF, Derchain S, Zeferino Lc, Sarian L, Dufloth RM, Montemor EB, Munhoz D, Silva SM, Campos EA, Syrjanen KJ. Visual Inspection with acetic acid, hybrid capture II and Pap test performances in detecting biopsy-confirmed squamous cervical lesions. 10th Biennial International Gynecologic Cancer Society Meeting (IGCS) - Edinburgh, Scotland. October 3-7, 2004. In: Abstracts Int J Gynecol Cancer. 2004 Sep-Oct;14 Suppl 1:1-267.
10. Silva, S M ; Sarian, L O ; Discacciati, M ; Lopes, E; Westin, M C ; Andrade, L A ; Gontijo, R. C. ; Bragança, J ; Mendonça, M R ; Derchain, S ; Zeferino, L C . Diagnóstico final em mulheres com lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau na citologia para rastreamento do câncer cervical. In: V Congresso Brasileiro de Citologia Clínica, 2005, Goiania. Revista Brasileira de Análises Clínicas, 2005. v. 37. p.20b-20b.
11. Gontijo, R. C; Derchain, S F, Roteli-Martins, C, Bragança, JF; Sarian, L; Moraes, SS. Incidência de lesão cervical subsequente em mulheres com citologia de rasrtramento normal segundo a detecção do papilomavírus humano. 51 Congresso Brasileiro de Ginelologia e Obstetrícia, 2005, Rio de Janeiro. In:Anais do 51 Congresso Brasileiro de Ginelologia e Obstetrícia, 2005.
12. Gontijo, R; Derchain S; Martins, CR; Bragança, J; Sarian, L; Moraes, SS; Longatto Filho, A; Syrjanen, K. Human papillomavirus infections as risk factors for cytological and histological abnormalities in baseline pap smear-negative women followed-up for two years in the LAMs study. In: Eurogin 2006, 2006, Paris. Eurogin final program and abstracts, 2006. p.145-145.
13. Maito, AB; Derchain, SF; Sarian, LOZ; Bragança, JF; Schenka A. Persistência ou reicidiva da NIC em até 24 meses segundo a expressão da p16 e p53. XII Congresso Paulista de Ginecologia e Obstetrícia, 2007, São Paulo. In: Anais do XII Congresso Paulista de Ginecologia e Obstetrícia p.151.