



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

**PERFIL GENOTÍPICO DA INFECÇÃO POR PAPILOMAVÍRUS HUMANO E
EXPRESSÃO DE p16^{INK4A} E Ki-67 EM MULHERES DO AGRESTE DE
PERNAMBUCO APRESENTANDO LESÃO CERVICAL**

PAULO JOSÉ CUNHA MIRANDA

RECIFE/PE

2016

PAULO JOSÉ CUNHA MIRANDA

**PERFIL GENOTÍPICO DA INFECÇÃO POR PAPILOMAVÍRUS HUMANO E
EXPRESSÃO DE p16^{INK4A} E Ki-67 EM MULHERES DO AGRESTE DE
PERNAMBUCO APRESENTANDO LESÃO CERVICAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Medicina Tropical

Orientadora: Prof^a. Dra. Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho, MD, PhD

Coorientador: Prof. Dr. Jacinto da Costa Silva Neto, MD, PhD

RECIFE/PE

2016

Catálogo na fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa - CRB4-1010

M672p Miranda, Paulo José Cunha.
Perfil genotípico da infecção por papilomavírus humano e expressão de p16^{ink4a} e Ki-67 em mulheres do Agreste de Pernambuco apresentando lesão cervical / Paulo José Cunha Miranda. – 2016.
122 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientadora: Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical. Recife, 2016.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Papilomavírus humano. 2. Genotipagem. 3. Carcinoma Cervical. 4. Ki-67. 5. p16^{INK4A}. I. Coêlho, Maria Rosângela Cunha Duarte (Orientadora). II. Título.

618.9883

CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2016-270)

**ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
TROPICAL DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO, NO DIA
28 DE SETEMBRO DE 2016.**

Aos vinte e oito (28) dias do mês de setembro de dois mil e dezesseis, às 08:00 horas, na Sala Prof. Murillo La Greca – 3º. and. do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CCS/UFPE), em sessão pública, teve início a defesa da Tese intitulada “PERFIL GENOTÍPICO DA INFECÇÃO POR PAPILOMAVÍRUS HUMANO E EXPRESSÃO DE p16^{INK4A} E Ki-67 EM MULHERES DO AGRESTE DE PERNAMBUCO APRESENTANDO LESÃO CERVICAL” do aluno **Paulo José Cunha Miranda**, na área de concentração Medicina Tropical, sob a orientação da Profa. Dra. Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho (UFPE) e coorientação do Prof. Dr. Jacinto da Costa Silva Neto (UFPE). O doutorando cumpriu todos os demais requisitos regimentais para a obtenção do grau de DOUTOR em Medicina Tropical. A Banca Examinadora foi indicada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical, na sua Reunião ordinária e homologada pela Diretoria de Pós-graduação, através do Processo Nº 23076.040736/2016-16 em 12/09/2016, composta pelos Professores: Vera Magalhães da Silveira, do Departamento de Medicina Tropical da UFPE; Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFPE; Virgínia Maria Barros de Lorena, do Departamento de Imunologia do CPqAM/FIOCRUZ; Ana Pavla Almeida Diniz Gurgel, do Departamento de Engenharia e Meio Ambiente da UFPB; e Bárbara Simas Chagas, do Departamento de Genética da UFPE. Após cumpridas as formalidades, o candidato foi convidado a discorrer sobre o conteúdo da Tese. Concluída a explanação, o candidato foi arguido pela Banca Examinadora que, em seguida, reuniu-se para deliberar e conceder ao mesmo a menção (Aprovado/Reprovado/Em exigência) Aprovado da referida Tese. E, para constar, lavrei a presente Ata que vai por mim assinada, Secretário(a) de Pós-Graduação, e pelos membros da Banca Examinadora.

Recife, 28 de setembro de 2016.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Vera Magalhães da Silveira

Profa. Dra. Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho

Profa. Dra. Virgínia Maria Barros de Lorena

Profa. Dra. Ana Pavla Almeida Diniz Gurgel

Profa. Dra. Bárbara Simas Chagas



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

REITOR

Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Nicodemos Teles de Pontes Filho

**COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MEDICINA TROPICAL**

Valdênia Maria Oliveira de Souza

**VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MEDICINA TROPICAL**

Maria Amélia Vieira Maciel

CORPO DOCENTE

Ana Catarina de Souza Lopes	Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho
Ana Lúcia Coutinho Domingues	Marli Tenório Cordeiro
Célia Maria Machado Barbosa de Castro	Ricardo Arraes de Alencar Ximenes
Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto	Valdênia Maria Oliveira de Souza
Fábio André dos Santos Brayner	Vlúdia Maria Assis Costa
Heloísa Ramos Lacerda de Melo	Vera Magalhães de Silveira
Maria Amélia Vieira Maciel	Rejane Pereira Neves

CORPO DOCENTE COLABORADOR

Líbia Cristina Rocha Vilela Moura
Virginia Maria Barros de Lorena

A você minha Lane, dedico este trabalho. Foi com você que apreendi que a vida é uma longa, imprevisível, porém formidável caminhada, quando trilhada com Obstinação, Bondade, Solidariedade, Amor e acima de tudo com Fé. Sempre sigo com você, no meu pensamento e no meu coração. Obrigado pelo incentivo, paciência, compreensão, dedicação e carinho ao longo deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À minha esposa Lane, pelo incentivo, companheirismo, trabalho, compreensão e carinho, que tornaram possível a conclusão deste trabalho.

Às minhas filhas Anna Paula, Patrícia e Mariana, pela feliz convivência, incentivo e por terem cedido um pouco dos seus preciosos tempos que passamos juntos.

Ao meu pai “*in memoriam*” por tudo que representou para mim.

À minha mãe, pelo amor, dedicação, carinho e solidariedade, em todos os momentos da minha vida.

À amiga e Professora Dra^a. Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação de Medicina Tropical da UFPE, pela orientação, confiança, paciência, incentivo e dedicação à vida acadêmica.

Ao amigo e Professor Dr. Jacinto Costa Neto, pela dedicação, competência e oportunidade que me deu para realizar e concluir o presente projeto, sempre me incentivando e orientando em todas as fases do trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, Professores e Funcionários, em especial ao Secretário, ao Sr. Walter Galindo, pela dedicação e empenho para com o crescimento do programa.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para que o projeto se tornasse realidade.

“Embora ninguém possa voltar
atrás e fazer um novo começo...
Qualquer um pode recomeçar
agora e fazer um novo fim!”

(Francisco Xavier)

RESUMO

MIRANDA, Paulo José Cunha, Perfil genotípico da infecção por Papilomavírus humano e expressão de p16^{ink4a} e Ki-67 em mulheres do Agreste de Pernambuco apresentando lesão cervical. 122f. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Pernambuco – Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical. Recife, Pernambuco.

O carcinoma cervical uterino é o quarto tipo de câncer mais prevalente no mundo, e mais de 90% são associados ao Papilomavírus Humano (HPV). No Brasil, o genótipo 16 (HPV-16) apresenta-se como o mais frequentemente presente no câncer cervical. Em Pernambuco é elevada a incidência de câncer cervical, embora há poucos dados sobre o perfil genotípico do HPV na população, particularmente fora da região metropolitana. Este trabalho teve por objetivo identificar os genótipos do HPV em lesões intraepiteliais cervicais e invasivas de mulheres e sua correlação com a expressão dos biomarcadores p16^{INK4A} e Ki-67. Foram analisadas mulheres da região do Agreste de Pernambuco, no período de 2009 a 2010, diagnosticadas por citologia como portadoras de lesão intraepitelial de baixo grau (LSIL), lesão intraepitelial de alto grau (HSIL) ou carcinoma invasivo. A identificação dos genótipos do HPV foi realizada em amostras cervicais utilizando a técnica de PCR-RFLP. As amostras foram coletadas com o auxílio de escova cervical estéril e colocadas em meio líquido. A expressão dos biomarcadores p16^{INK4A} e Ki-67 foi realizada a partir de biopsias parafinadas, por imunohistoquímica. Das 221 amostras analisadas 42,7% (90/211) apresentaram única infecção por HPV, enquanto que 57,3% (121/211) tinham infecções com vários tipos virais. Os HPV-16, HPV-31, HPV-35 e HPV-18 foram os genótipos detectados em NIC 1 (Neoplasia intraepitelial cervical grau 1) com única infecção, enquanto que HPV16/11, HPV16/6 e HPV18/6 foram mais frequentes nas coinfeções. HPV-16 e HPV-18 foram mais frequentes em NIC 2 (Neoplasia intraepitelial cervical grau 2) com infecção única por HPV, enquanto HPV16/6, HPV 16/11 e HPV 16/31 foram mais prevalentes nas coinfeções. HPV-16, HPV-18, HPV-31 foram mais comumente detectados em NIC 3 (Neoplasia intraepitelial cervical grau 3) com infecção única pelo HPV, enquanto HPV 16/6, HPV 16/11 e HPV 16/18 foram os mais detectados nas coinfeções. Nos casos de câncer cervical, HPV-16 e HPV-31 foram os mais frequentes em infecção única, enquanto que HPV16/6 e HPV18/11 foram os mais frequentes nas coinfeções. A infecção múltipla com HPV-16 apresentou 2,7 vezes maior risco de NIC 3 ($p=0.04$). Múltiplas infecções com HPV16 e excluindo os tipos HPV18/31 foram associados com NIC 3 ($p=0.01$). A expressão de p16^{INK4A} foi observada em 100% dos cânceres, 97,6% em NIC 3, 83,3% em NIC 2 e em 55,4% de NIC 1. A expressão de Ki-67 ocorreu em 100%

dos cânceres, 98.8% das NIC 3, 83.3% das NIC 2 e 69.6% das NIC 1. HPV-16 foi o mais prevalente tanto em infecções únicas como em múltiplas. Este foi o primeiro estudo que realizou a detecção e genotipagem tipo-específica de HPV circulantes na população feminina do interior de Pernambuco, região Agreste.

Palavras-chave: Papilomavírus humano, Genotipagem, Carcinoma Cervical, Ki-67, p16^{INK4A}.

ABSTRACT

MIRANDA, Paulo José Cunha, Genotypic profile of infection by Human papillomavirus and p16^{INK4a} and Ki-67 expression in women of Agreste of Pernambuco presenting cervical injury. 122f. Doctoral Thesis, Federal University of Pernambuco - Health Sciences Center Graduate Program in Tropical Medicine. Recife, Pernambuco.

Uterine cervical cancer is the fourth most prevalent cancer in the world, and more than 90% are associated with human papillomavirus (HPV). In Brazil, the genotype 16 (HPV-16) appears as the most often present in cervical cancer. In Pernambuco is the high incidence of cervical cancer, although there are few data on the genotypic profile of HPV in the population, particularly outside the metropolitan area. This study aimed to identify the HPV genotypes in cervical intraepithelial lesions and invasive of women and its correlation with the expression of p16^{INK4a} and Ki-67 biomarker. Were analyzed women in the Agreste Region of Pernambuco, in the period from 2009 to 2010, diagnosed by cytology as having low-grade squamous intraepithelial lesions (LSIL), squamous intraepithelial lesion high grade (HSIL) or invasive carcinoma. The identification of HPV genotypes in cervical samples was performed using PCR-RFLP. The samples were collected with the aid of sterile cervical brush and placed in a liquid medium. The expression of p16^{INK4a} and Ki-67 biomarkers was performed from biopsies paraffin for immunohistochemistry. Of the 221 analyzed samples 42.7% (90/211) had only HPV infection, while 57.3% (121/211) had infections with multiple HPV types. HPV-16, HPV-31, HPV-35 and HPV-18 were genotype detected in CIN 1 (cervical intraepithelial neoplasia grade 1) with single infection, whereas HPV16 / 11, HPV16 / 6 and HPV18 / 6 were more frequent in coinfection. HPV-16 and HPV-18 were more frequent in CIN 2 (cervical intraepithelial neoplasia grade 2) with a single HPV infection, whereas HPV16/6, HPV 16/11 and HPV16/31 were more prevalent in coinfections. HPV-16, HPV-18, HPV-31 are most commonly detected in CIN 3 (cervical intraepithelial neoplasia grade 3) with a single HPV infection, while HPV16/6, HPV16/11 and HPV16/18 were the most frequently detected in coinfection. In cases of cervical cancer, HPV-16 and HPV-31 were the most frequent single infection, while HPV16/6 and HPV18/11 were the most frequent in coinfection. Multiple infection with HPV-16 had 2.7 times higher risk of CIN 3 ($p = 0.04$). Multiple infections with HPV-16 and excluding HPV18/31 types were associated with CIN 3 ($p = 0.01$). The p16^{INK4a} expression was observed in 100% of all cancers, 97.6% in CIN 3, 83.3% in CIN 2 and 55.4% of CIN 1. The expression of Ki-67 occurred in 100% of all cancers, 98.8% of CIN 3, 83.3% of

CIN 2 and 69.6% of IAS 1. HPV-16 was the most prevalent both in single infections as multiple. This was the first study that performed the detection and genotyping type-specific of circulating HPV in the female population of the interior of Pernambuco, Agreste region.

Keywords: Human papillomavirus, Genotyping, Cervical carcinoma, Ki-67, p16^{INK4A}, Pernambuco.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Morfologia do Papilomavírus.	21
Figura 2	Genoma do HPV.	22
Figura 3	Prevalência estimada de infecções por HPV em mulheres nas diferentes regiões do mundo.	25
Figura 4	Fatores implicados na dinâmica da transmissão do HPV.	26
Figura 5	Citologia de lesões pré-cancerosas e carcinoma cervical invasivo provocado pelo Papilomavírus Humano (HPV).	29
Figura 6	Diferentes fases das lesões promovidas pela infecção do epitélio cervical pelo Papilomavírus Humano (HPV).	30
Figura 7	Incidência de câncer cervical no Brasil (por 100 mil habitantes).	32
Figura 8	Esquema proposto de rastreamento combinado de câncer cervical.	40
Figura 9	Base molecular da superexpressão de p16 ^{INK4A} em células transformadas por HPV.	42
Figura 10	Árvore filogenética do Papilomavírus Humano destacando os genótipos cobertos pelas vacinas (vermelho) e sugerindo possível proteção cruzada para outros tipos de HPV (azul).	46
Artigo 1	Perfil genotípico da infecção por Papilomavírus Humano em mulheres do Agreste de Pernambuco com diagnóstico histopatológico de lesão cervical de baixo e alto grau	
Figura 1	Quantidades relativas de tipos virais contemplados e não-contemplados pela vacinação preventiva anti-HPV em infecções únicas e múltiplas na população.	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Papilomavírus humano (HPV) mais prevalentes em mulheres da cidade de Natal-RN.	36
Tabela 2	Características da população de mulheres com idade entre 25 e 35 anos no Estado de Pernambuco.	37
Tabela 3	Eficácia das metodologias de rastreamento de câncer cervical.	41
Tabela 4	Especificações técnicas das vacinas contra HPV disponíveis no mercado.	45
Artigo 1	Perfil genotípico da infecção por Papilomavírus Humano em mulheres do Agreste de Pernambuco com diagnóstico histopatológico de lesão cervical de baixo e alto grau	
Tabela 1	Diversidade de HPV como infecções simples e múltiplas.	56
Tabela 2	Distribuição dos tipos de HPV entre NIC 1, NIC 2, NIC 3 e câncer considerando infecções simples e múltiplas.	57
Tabela 3	Distribuição das infecções simples e múltiplas por HPV em amostras cervicais NIC 1, NIC 2, NIC 3 e câncer. Ui: Única infecção por HPV. MI: Múltipla infecção por HPV. (*) <i>P-value</i> e ORs em comparação com NIC 1. (-) DNA de HPV não detectado. Negrito – estatisticamente significativo ($p < 0.05$).	60
Artigo 2	Estudo de associação entre a expressão das proteínas p16^{INK4a} e Ki-67 e o diagnóstico histopatológico em mulheres infectadas pelo Papilomavírus humano na Região Agreste de Pernambuco	
Tabela 1	Expressão imunohistoquímica de p16 ^{INK4A} em 211 amostras (HPV positivas) de colo uterino.	72
Tabela 2	Expressão imunohistoquímica de Ki-67 em 211 amostras (HPV positivas) de colo uterino.	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
CH2	Captura híbrida de segunda geração
NIC	Neoplasia Intraepitelial Cervical
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DST	Doenças sexualmente transmissíveis
EV	Epidermodisplasia verruciforme
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPV	Papilomavírus Humano
HSIL	Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau
IARC	<i>International Agency for Cancer Research</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
Kb	Quilobase
LBC	Citologia em base líquida
LSIL	Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau
OMS	Organização Mundial da Saúde
Pb	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PCR-RFLP	PCR-Polimorfismo do Comprimento do Fragmento de Restrição
HPV	Papilomavírus humano
IST	Infecções sexualmente transmissíveis

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 O Papilomavírus Humano (HPV)	21
2.2 Etiopatogênese das infecções por HPV	24
2.3 Manifestações clínicas das infecções por HPV	27
2.4 HPV de alto risco e câncer cervical	28
2.5 As infecções por HPV no Brasil	31
2.5.1 A situação no nordeste do Brasil	35
2.6 Diagnóstico	38
2.6.1 Métodos citológicos e histológicos	38
2.6.2 Métodos moleculares	38
2.7 Prevenção e tratamento	43
3. OBJETIVOS	48
3.1 Geral	48
3.2 Específicos	48
4. METODOLOGIA	49
4.1 Desenho do Estudo	49
4.2 População do Estudo	49
4.3 Local do Estudo	49
4.4 Categorização das amostras	49
4.5 Técnicas utilizadas	50
4.5.1 Extração do DNA	50
4.5.2 PCR/RFLP	50
4.5.3 Genotipagem	51
4.5.4 Imunohistoquímica para p16 ^{INK4A} e Ki-67	51
4.6 Análise estatísticas	52
4.7 Aspectos éticos da pesquisa	52
5. RESULTADOS	53
5.1 Perfil genotípico da infecção por Papilomavírus Humano em mulheres do Agreste de Pernambuco com diagnóstico histopatológico de lesão cervical de baixo e alto grau	53

5.2 Estudo de associação entre a expressão das proteínas p16^{INK4a} e Ki-67 e o diagnóstico histopatológico em mulheres infectadas pelo Papilomavírus humano na Região Agreste de Pernambuco 69

6. CONCLUSÃO DA TESE 78

7. REFERÊNCIAS

APÊNDICE A: Artigo 1 “Genotypic profile of infection with Human Papillomavirus in women of Agreste Region of pernambuco with histopathological diagnosis of lower and high grade of cervical lesion”, submetido ao periódico: *International Journal of Gynecological Pathology*.

APÊNDICE B: Artigo 2 “Association Study between the expression of p16^{INK4a} and Ki-67 proteins and the histopathologic diagnosis in women infected with human papillomavirus in Agreste region of Pernambuco”, submetido ao periódico: *International Journal of Gynecological Cancer*.

ANEXO: Aprovação do Comitê de Ética do CCS-UFPE

1. INTRODUÇÃO

O carcinoma cervical uterino é o quarto tipo de câncer mais comum e a quarta maior causa de morte em mulheres em todo o mundo (JEMAL *et al.*, 2011; SIEGEL *et al.*, 2016). O Papilomavírus Humano (HPV) é considerado o principal agente etiológico da doença, sendo responsável por mais de 90% de todos os casos (GARGIULIO *et al.*, 2007; NAKAGAWA *et al.*, 2010; VELDHUIJZEN *et al.*, 2010; ALMONTE *et al.*, 2011; BARRETO *et al.*, 2013).

Neste contexto, o HPV destaca-se como o mais prevalente agente infeccioso sexualmente transmitido entre humanos, onde a população mais atingida é formada por mulheres jovens. Partindo-se desta premissa, praticamente qualquer indivíduo pode entrar em contato com o vírus pelo menos uma vez durante a sua vida, justificando a liderança do HPV como agente etiológico mais comum das doenças sexualmente transmissíveis (MYERS *et al.*, 2000; MOSCICKI, 2011).

São conhecidos mais de 200 tipos de HPV dos quais cerca de 40 são responsáveis pela infecção do trato genital, incluindo os tipos 16, 18, 31, 52 e 58, os quais são considerados como genótipos de alto risco oncogênico e agentes etiológicos do câncer cervical. Em contrapartida, os tipos HPV-6 e HPV-11 são considerados como tipos de baixo risco e responsáveis pelo surgimento de verrugas genitais, caracterizadas como uma condição benigna (AYRES & SILVA, 2010; FARID *et al.*, 2011).

Apesar das infecções por HPV na maioria das vezes ocorrer em mulheres com faixa etária entre 25 e 39 anos e se caracterizarem como transitórias assintomáticas e/ou subclínicas, diversos estudos revelaram que o vírus por si só não constitui o único fator de risco para o desenvolvimento do câncer, embora seja considerado o mais importante deles (CASTLE *et al.*, 2002; PINTO *et al.*, 2002; SOUZA & VILLA, 2003; COGLIANO *et al.*, 2005; HIBBITTS *et al.*, 2006; CASTLE, 2008; SILVA *et al.*, 2009; MARKS *et al.*, 2011).

O processo infeccioso tem início na penetração do HPV nas células em diferenciação na camada basal do tecido epitelial da pele e mucosas, geralmente por via de microferimentos ou lesões maiores. Em seguida, uma sequência de eventos relacionados às funções vegetativas virais se instala, sendo promovida por determinados genes, localizados em regiões consideradas precoces e tardias, de acordo com o padrão de expressão dos genes virais (BRENTJENS *et al.*, 2002; ABU *et al.*, 2005).

O método mais utilizado de rastreamento e controle do câncer do colo do útero se baseia em esquemas empregando a técnica de citologia oncótica, pela qual células epiteliais atípicas são observadas (INCA, 2014). Entretanto, o teste para genótipos de HPV de alto risco tem se

tornado componente integral do prognóstico para o câncer cervical, baseando-se em duas premissas: o grau de subjetividade do exame citológico e a forte evidência que HPV de alto risco possui uma relação íntima com o desenvolvimento da doença. Neste contexto, a utilização de uma variedade de métodos moleculares foi introduzida ao longo dos anos, tais como, captura híbrida, ensaios de *Southern Blot*, hibridação *in situ*, além da reação em cadeia de polimerase (PCR). Estas técnicas têm se mostrado como uma das mais sensíveis para a identificação do DNA viral existente nos mais diversos materiais clínicos (GILLISON *et al.*, 2000; NAGPAL *et al.*, 2002; CORTEZZI *et al.*, 2004; GIOVANELLI *et al.*, 2004).

O conhecimento do potencial oncogênico de alguns tipos virais associado aos esforços para a prevenção contra a infecção do HPV tornou possível o desenvolvimento de vacinas. Três delas, uma bivalente, uma quadrivalente e outra nonavalente, oferecem 100% de proteção contra os HPV-16, HPV-18, HPV-6, HPV-11, HPV-31, HPV-33, HPV-45, HPV-52 e HPV-58. Em contrapartida, as vacinas disponíveis atualmente contribuem na proteção dos agentes etiológicos responsáveis por mais de 90% dos casos de lesões benignas e malignas (HARPER *et al.*, 2006; BURD, 2007; CDC, 2010; SCARINCI *et al.*, 2010; CHAGAS *et al.*, 2015).

A prevalência das infecções por HPV inspira preocupação em nível mundial. De forma geral, a prevalência das infecções por HPV varia de uma região geográfica para outra, bem como dentro de um mesmo país. Diversas revisões sistemáticas disponíveis na literatura, versando sobre a prevalência do HPV, exploraram diferentes aspectos relacionados ao tema. Por sua contribuição, destaca-se a investigação de Smith *et al.* (2008), ao revelarem informações extremamente importantes sobre a saúde da mulher em diferentes regiões do mundo.

Estudos epidemiológicos apontam que a infecção pelo HPV é considerada como a causa necessária, contudo não suficiente para o surgimento do câncer cervical. Exame de rastreamento ineficiente e exposição aos fatores de risco para infecção pelo HPV são abordados nas análises epidemiológicas relacionadas ao câncer cervical. Os estudos relacionados à prevalência do HPV realizados no Brasil abrangem informações de mulheres que são direcionadas ao serviço de saúde para rastreamento ou tratamento (MUÑOZ *et al.*, 2003; MARTINS *et al.*, 2005; AYRES & SILVA, 2010).

No Brasil, o perfil de prevalência da infecção por HPV de alto risco é semelhante ao encontrado nos países subdesenvolvidos, entre 18 e 27%, atingindo um maior número de mulheres com idade inferior a 35 anos e permanecendo por volta de 15% em indivíduos de 35

até 65 anos (NONNENMACHERA *et al.*, 2002; RAMA *et al.*, 2008; NAKAGAWA; SCHIRMER e BARBIERI, 2010).

A maioria dos estudos epidemiológicos relacionados ao HPV no Brasil se concentra na região Sudeste, especialmente nas capitais e regiões metropolitanas, trazendo à luz a necessidade de novas investigações, as quais visem traçar um perfil mais realista da mulher brasileira. Em razão das dimensões continentais do país e da sua diversidade socioeconômica e cultural, a mulher nordestina, em particular, a pernambucana, revela elevada discrepância dentro do contexto nacional, sendo importante ressaltar a elevada incidência de câncer cervical na região. Atualmente, apesar de crescente, ainda é muito escasso o material científico sobre o assunto, e a literatura consultada concentra-se em Recife, onde os HPV-16, 31 e 33 configuram os tipos mais comuns (LORENZATO *et al.*, 2000; BALDEZ DA SILVA *et al.*, 2009; AYRES e SILVA, 2010; CHAGAS *et al.*, 2011). Além disso, o perfil no interior do Estado é praticamente desconhecido, refletindo a carência de tais dados, em diferentes outras regiões brasileiras.

Diante deste relato, o presente trabalho apresenta resultados que permitiram avaliar a prevalência dos diferentes tipos de HPV na Região Agreste do Estado de Pernambuco, bem como verificar a correlação da prevalência com as lesões diagnosticadas pela citologia e histologia, contribuindo para a construção do perfil da situação no interior do Estado, a partir do depósito de dados e informações que poderão servir de base para o implemento de campanhas preventivas e vacinais, bem como fonte para investigações futuras.

O presente documento está estruturado em uma extensa revisão da literatura, seguido de duas produções científicas. A primeira trata-se de um artigo original, intitulado “Perfil genotípico da infecção por Papilomavírus Humano em mulheres do Agreste de Pernambuco com diagnóstico histopatológico de lesão cervical de baixo e alto grau”, enfatizando questões sobre o percentual de mulheres que podem não estar protegidas pelas vacinas adotadas, pelo fato de que algumas infecções por HPV são causadas por genótipos prevalentes no Estado de Pernambuco, não contemplados no espectro de imunização das vacinas. Este trabalho foi submetido ao periódico *International Journal of Gynecological Pathology*. A segunda produção científica, outro artigo original, intitulado “Estudo de associação entre a expressão das proteínas p16^{INK4a} e Ki-67 e o diagnóstico histopatológico em mulheres infectadas pelo Papilomavírus humano na Região Agreste de Pernambuco” e submetido para publicação no periódico *International Journal of Gynecological Cancer*, abordando os resultados da investigação científica ao longo de dois anos de pesquisa.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O Papilomavírus Humano (HPV)

O HPV pertence à família *Papillomaviridae* e ao gênero *Papillomavirus* sendo uma partícula não envelopada, medindo cerca de 55 a 60 nm, constituída de DNA de fita dupla e envolvida por um capsídeo em arranjo icosaédrico (Figura 1). Uma das características principais do HPV é apresentar tropismo por células epiteliais, causando infecções tanto na pele quanto em mucosas (NOAD & ROY, 2003; FARID *et al.*, 2011).



Figura 1. Morfologia do Papilomavírus. Fonte: <http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/virus/virus-15.php>.

O revestimento externo do HPV é constituído por proteínas de alta e baixa massa molecular. As proteínas de alta massa molecular formam 72 capsômeros, cujo arranjo, cria para o vírus uma semelhança a um pequeno diamante. O genoma viral é circular e formado por um anel de DNA com dupla fita contendo cerca de 8000 pb (8 Kb), controlados por uma única região, constituída de genes promotores e reguladores (FAUQUET *et al.*, 2005; YANG *et al.*, 2006).

Apesar da simplicidade estrutural, o genoma do HPV se encontra distribuído em três regiões: a região precoce (E – *Early region*), a região tardia (L – *Late region*) e a região regulatória não codificante (URR – *Upstream Regulatory Region*) ou longa região de controle (LCR – *Long Control Region*) (Figura 2) (STANLEY, 2010). As duas primeiras regiões são expressas nas fases inicial e tardia da infecção, respectivamente. Elas são assim denominadas, de acordo com a localização e as propriedades funcionais, isto é, funções vegetativas do vírus, como regulação do DNA e distúrbio do ciclo celular (região E), e de síntese das proteínas

estruturais formadoras do capsídeo (região L). Os genes *E* também estão relacionados com o potencial oncogênico de alguns tipos de HPV de alto risco e do ponto de vista da transformação celular, as sequências codificantes E5, E6 e E7 apresentam maior importância (BRENTJENS *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2003).

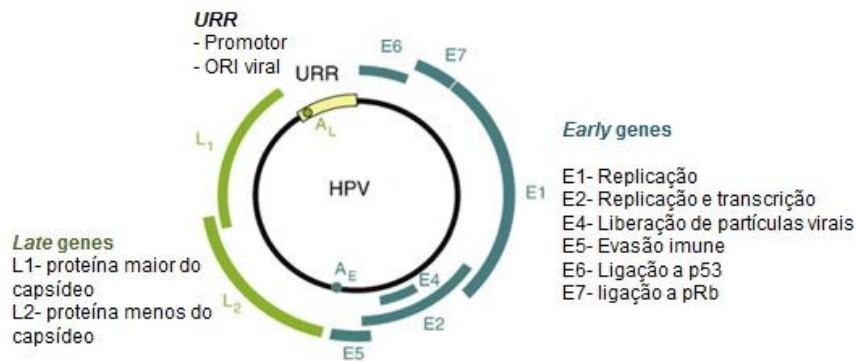


Figura 2. Genoma do HPV. Fonte: Adaptado de Stanley (2010).

Segundo Leto *et al.* (2011), a região *E* contém genes responsáveis por diversas funções específicas no início da infecção: replicação (*E1* e *E2*), transcrição do DNA (*E2*), maturação e liberação das partículas virais (*E4*), transformação (*E5*, *E6* e *E7*) e pelo processo de imortalização das células (*E6* e *E7*). A proteína codificada pelo gene *E1* exibe atividade para ATPase e helicase, as quais promovem replicação viral e inibem a integração viral ao genoma da célula hospedeira. Em contrapartida, a proteína codificada pelo gene *E2* aumenta significativamente a afinidade da proteína codificada por *E1*, induzindo a replicação viral e revelando o importante papel de *E2* na prevenção da transformação oncogênica na célula infectada.

O potencial oncogênico dos HPVs de alto risco está diretamente relacionado às proteínas codificadas pelos genes *E6* e *E7*, resultando na estimulação de proliferação celular ou supressão das proteínas celulares envolvidas no processo de apoptose. Dado que os queratinócitos perdem a habilidade de replicar o DNA quando diferenciados, os genes *E6* e *E7* permitem ao HPV utilizar proteínas da regulação do ciclo celular da célula hospedeira para continuar de modo irrestrito a síntese de DNA. Alguns estudos demonstraram a degradação de supressores tumorais. O produto do gene *E6* aumenta a degradação da proteína p53, enquanto

o produto de *E7* promove a degradação da proteína pRb (SCHFFNER *et al.*, 1993; GIARRE *et al.* 2001).

A inativação da pRb resulta na superexpressão de outro supressor tumoral, a proteína p16^{INK4a}, em função de um *feedback* negativo. A p16^{INK4a} normalmente age inibindo as cinases 4 e 6 dependentes de ciclina, entretanto sua ação é ineficaz no contexto da proliferação celular durante a infecção por HPV. Dada a associação entre a p16^{INK4a} com as lesões pré-neoplásicas e neoplásicas, esta proteína pode ser utilizada como ferramenta de rastreamento do câncer do colo uterino (ANDERSSON *et al.*, 2006).

Os genes da região L, isto é, *L1* e *L2*, codificam as proteínas de baixa e alta massa molecular que formam o capsídeo. A razão molar entre as proteínas *L1* e *L2* é estimada em 30:1. A região *L1* se caracteriza como a mais conservada no genoma dos HPV e seus produtos, cerca de 360 moléculas, representam mais de 80% das proteínas presentes. As proteínas expressas na região *L2* interagem com as proteínas expressas pela região *L1*, contribuindo para o aumento, de pelo menos 50 vezes, na eficiência da incorporação do DNA viral (CHEN *et al.*, 2000; BRENTJENS *et al.*, 2002; ZHAO *et al.*, 2005; YANG *et al.*, 2006).

A região NCR possui de 500 a 1000 pb, configurando uma longa região de controle do genoma, localizada entre as regiões *L1* e *E6*. Geralmente, esta região não é conservada e está vinculada a vários locais que contém fatores de controle de transcrição nucleares e virais, envolvidos na expressão do gene, bem como fatores de controle da replicação viral (OLIVEIRA *et al.*, 2003; NAKAGAWA; SCHIRMER e BARBIERI, 2010; FARID *et al.*, 2011).

O ciclo de infecção do HPV está diretamente relacionado ao ciclo de diferenciação da célula hospedeira. O vírus requer acesso direto às células basais através de um ferimento ou por um processo inflamatório já instalado. A infecção progride para as células adjacentes e o padrão observado nas lesões intraepiteliais acompanha uma série de eventos comandados por diversos genes (DOORBAR, 2005; LIZANO; BERUMEN e GARCÍA-CARRANCÁ, 2009).

Determinados eventos do ciclo de infecção do HPV ainda não foram elucidados, em particular, os processos de fixação, penetração, endocitose e transporte do genoma viral para o núcleo. Ressalta-se que o ciclo infeccioso não induz citólise, necrose ou viremia, entretanto promove inibição da síntese de interferon (YANG *et al.* 2006; WIDDICE e MOSCICKI, 2008; VELDHUIJZEN *et al.*, 2010; LETO *et al.*, 2011).

São conhecidos mais de 200 tipos de HPV como agentes etiológicos de diferentes afecções e cerca de 40 deles já foram isolados de lesões genitais benignas e malignas, os quais foram responsáveis desde verrugas simples até o câncer cervical. Neste contexto, os HPVs são

divididos em duas categorias: de alto e baixo risco (CARVALHO *et al.*, 2005; FARID *et al.*, 2011; SMITH *et al.*, 2011).

Dos genótipos conhecidos, cerca de 100 foram completamente caracterizados e compartilham de 60 a 70% de similaridade na sequência de nucleotídeos do gene *L1*. Entretanto, considera-se uma nova espécie de HPV quando o genoma apresenta uma variação maior que 10% não somente no gene *L1* e sim, no conjunto *L1*, *E6* e *E7*. As diferenças entre 2 e 10% neste grupo de genes representam novas subespécies e as variações menores que 2% identificam novos tipos de HPV (PRADO *et al.* 2005, LETO *et al.*, 2011; ONON, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Taxonomicamente, os HPV estão agrupados em cinco gêneros: *Alfa-*, *Beta-*, *Gama-*, *Mu-* e *Nupapillomavirus*. Historicamente, os HPVs foram classificados considerando-se o tropismo particular para cada tipo, por determinado tecido epitelial ou de acordo com a local do isolamento (DE VILLIERS *et al.*, 2004). Esta classificação não pode ser considerada inteiramente correta, uma vez que certos genótipos podem ser encontrados tanto em epitélio genital como no tegumento. Por outro lado, não pode ser negligenciada em razão do largo uso na literatura médica e científica.

2.2 Etiopatogênese das infecções por HPV

O HPV é o agente infeccioso viral com maior transmissão sexual em todo o mundo e qualquer indivíduo sexualmente ativo é susceptível à infecção genital. As maiores incidências e prevalências ocorrem em mulheres jovens e alguns tipos de HPV podem ser responsáveis pelo desenvolvimento do câncer cervical (VELDHUIJZEN *et al.* 2010).

Estima-se que os HPV-16 e 18 são responsáveis por mais de 70% de todos os cânceres cervicais em todo o mundo. Nos países desenvolvidos, o percentual varia de 72-77% e nos países menos desenvolvidos corresponde de 65-72% dos casos. Desde 1995, a Agência Internacional da Pesquisa do Câncer (IARC) categorizou os tipos 16 e 18 como carcinogênicos para humanos. Estudos posteriores incluíram os genótipos 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 66 no grupo de HPV de alto risco, uma vez comprovado seu potencial carcinogênico (MUÑOZ, 2000; CLIFFORD *et al.*, 2006; FARIDI *et al.*, 2011).

Acredita-se que apenas a infecção por HPV, por si só, não seja capaz de resultar no câncer cervical. Somente uma pequena fração de mulheres infectadas desenvolve esta patologia e possivelmente outros cofatores intrínsecos e ambientais podem estar envolvidos, tais como, o

comportamento sexual, o tipo do vírus, o uso de contraceptivos orais por mais de 5 anos, infecção por *Chlamydia trachomatis*, a predisposição genética, a resposta imune, bem como o grau de escolaridade, a etnia, o estado civil, os fatores hormonais, a ingestão de esteróides sexuais, a deficiência nutricional e o perfil socioeconômico (MUÑOZ, 2000; SILVA *et al.*, 2009; FARIDI *et al.*, 2011).

Outros fatores relacionados como: tabagismo, consumo de álcool, uso de drogas ilícitas, promiscuidade e prática sexual com penetração não segura, foram associados ao maior risco de infecções por HPV. Além disso, a relação tabagismo com infecções por HPV aumenta significativamente o risco de carcinoma no pescoço e cabeça, uma vez que tal combinação pode promover a persistência de determinados HPV de elevado potencial carcinogênico (SINHA *et al.*, 2012). A figura 3 apresenta a distribuição da prevalência do HPV em mulheres nas diferentes regiões do mundo.

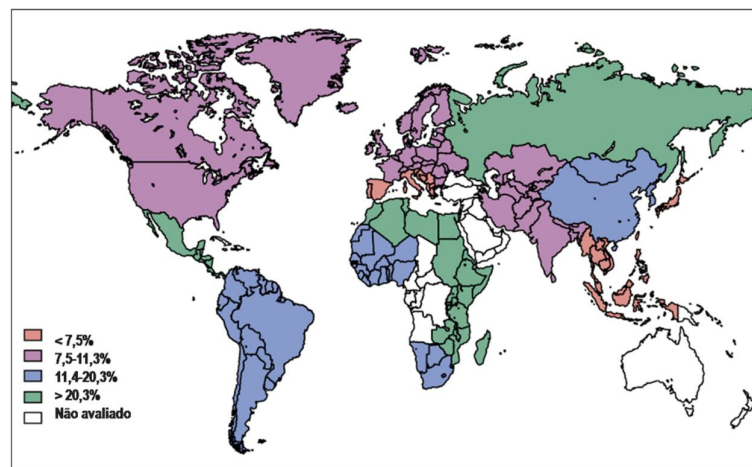


Figura 3. Prevalência estimada de infecções por HPV em mulheres nas diferentes regiões do mundo. Fonte: Veldhuijzen *et al.* (2010).

Um extenso estudo sobre a prevalência do HPV relacionada ao fator idade investigou 346.160 mulheres em diferentes regiões do mundo durante 10 anos, sendo observado que as infecções por HPV variaram de país para país, bem como no âmbito regional e nos subgrupos da população de um único país. Pesquisadores identificaram que a população jovem de mulheres em idade laboral e sexualmente ativa é legitimamente o mais susceptível. Além disso, os países ocidentais apresentam os maiores índices de infecção (SMITH *et al.*, 2008).

Segundo Veldhuijzen *et al.* (2010), as mulheres entre 25 e 35 anos com citologia normal são duas vezes mais susceptíveis à infecção por HPV em todas as regiões do mundo. O risco de infecção cervical por HPV é estimado em 80% e a grande maioria dessas infecções, mais de 90%, são detectadas dentro de dois anos, com poucos casos tornando-se persistentes. Um segundo pico de prevalência de infecção por HPV foi observado em mulheres com mais de 44 anos em três diferentes regiões geográficas, Europa, África e América do Sul, onde o HPV foi detectado em até aproximadamente 20% das infecções.

Prevalência de HPV em mulheres com 44 ou mais anos pode ser justificado por três importantes fatores: 1- uma resposta imune deficiente como resultado de alterações hormonais da menopausa, as quais podem induzir a reativação de infecções por HPV latentes; 2- o aumento da atividade sexual nas mulheres e seus parceiros nesta faixa, incluindo relacionamentos extraconjugais e 3- padrões na população investigada por estudos de coorte (DE SANJOSÉ *et al.*, 2007). Na Figura 4 estão apresentados os principais fatores de risco relacionados à dinâmica da transmissão do HPV.

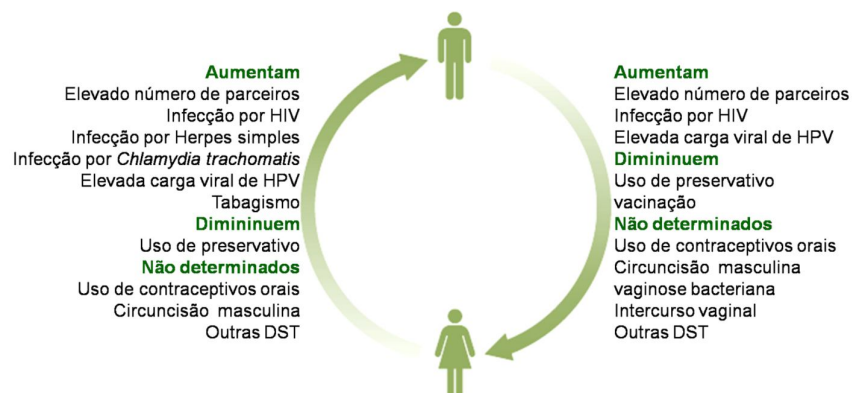


Figura 4. Fatores implicados na dinâmica da transmissão do HPV. Fonte: adaptado de Veldhuijzen *et al.* (2010).

Os fatores de transmissão do HPV de homens para mulheres, bem como a situação inversa apresentam certas semelhanças e de acordo com Veldhuijzen *et al.* (2010), podem influenciar a exposição, a susceptibilidade do hospedeiro e a persistência. A exposição ao vírus está relacionada diretamente ao histórico do comportamento sexual do indivíduo, ao número de parceiros ao longo da vida, à frequência de relações sexuais e quaisquer outras formas de contato íntimo oral, anal e/ou digital-vaginal e digital-anal. Neste contexto, o uso de preservativos é virtualmente efetivo, sugerindo proteger individualmente o usuário, homem ou

mulher (DUNE *et al.*, 2006; BURCHELL *et al.*, 2006b; WINNER *et al.*, 2006; STANLEY, 2010).

A susceptibilidade do hospedeiro à infecção diz respeito a dois grupos de fatores intrínsecos classificados como não modificáveis e modificáveis. O primeiro grupo concentra o comportamento sexual, aspectos genéticos e imunocomprometimento (HILDESCHEIM e WANG, 2002; CASTLE *et al.*, 2006; DE VUYST *et al.*, 2008; VEROUX *et al.*, 2009). O segundo grupo diz respeito ao uso de contraceptivos orais, preservativos, vaginoses, principalmente relacionadas à *Chlamydia trachomatis* e a circuncisão, cujo resultado é positivo tanto para homens no caso da transmissão, quanto para mulheres, em se tratando da infecção (SMITH *et al.*, 2003, FUKUCHI *et al.*, 2009; BAETEN *et al.*, 2010).

A persistência do HPV no organismo não tem sido estimada de forma consistente pela literatura. Em um estudo de meta-análise realizado por Koshiol *et al.* (2008) foi verificado que o vírus pode persistir no organismo por um período entre 6 e 12 meses, respondendo por até 78% dos casos de câncer cervical. Algumas propriedades do vírus também estão associadas à sua persistência, por exemplo, os HPV de alto risco são mais persistentes que os de baixo risco, no entanto, diversos outros fatores podem estar relacionados com a persistência do vírus, por exemplo, a carga viral, níveis hormonais, tabagismo e presença de outras DST como aids, herpes e vaginoses (BROWN *et al.*, 2005).

2.3 Manifestações clínicas das infecções por HPV

As verrugas compreendem as manifestações clínicas mais comuns e características das infecções por HPV, cujos tumores pleomórficos afetam pele e mucosas, particularmente, das regiões anogenital, laríngea e oral. Nas lesões benignas, a replicação do vírus ocorre extracromossomalmente, enquanto nas lesões malignas, o DNA viral é integrado aos cromossomos da célula hospedeira, sem que haja replicação, ocorrendo inativação da expressão da proteína E2, a qual age como regulador negativo da expressão dos oncogenes *E6* e *E7*, cujos produtos comprometem a atividade das proteínas p53 e pRb (LEVI *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2003; DOORBAR, 2005).

Embora a maioria das lesões regrida espontaneamente, diferentes fatores intrínsecos e ambientais podem resultar na progressão da lesão em um câncer. O reconhecimento de subtipos oncogênicos configura uma das maiores preocupações na área da saúde pública em todo mundo, tornando-se crucial para a prevenção e cumprimento de estratégias de controle do câncer

cervical. Neste contexto, os HPV de alto risco possuem o maior papel nos eventos relacionados à oncogênese, embora uma imensa lacuna concernente à natureza da relação entre os diferentes tipos do vírus com a diferenciação do epitélio e o desenvolvimento do câncer ainda exista (LORENZATO *et al.*, 2000; ANDERSON *et al.*, 2006; LIZANO *et al.*, 2009).

As lesões malignas da mucosa constituem uma série de condições dolorosas importantes, caracterizadas por ulcerações, nódulos e por não apresentarem tendência de regressão espontânea. Diversos tipos de HPV de alto risco, tais como, 16, 18, 21, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52 e 58, foram identificados em casos de câncer da orofaringe (10-50%), vulva (30-85%), vagina ($\approx 60\%$), pênis ($\approx 40\%$), ânus (70%), cérvix (mais de 80%) e na doença de Bowen genital (100%) (HEIDERMAN *et al.*, 2007; BONANNI *et al.*, 2009; DE VUYST *et al.*, 2009; BURKI, 2011; MOSCICKI, 2011).

2.4 HPV de alto risco e câncer cervical

A análise morfológica das células cervicovaginais pelo método de Papanicolaou é bastante empregada na identificação das neoplasias. Os principais achados histológicos associados aos efeitos citopatológicos da infecção por HPV incluem: cavidade perinuclear, binucleação, queratinização citoplasmática atípica, atipia nuclear e degeneração nuclear em diversos graus (Figura 5) (YAMAMOTO *et al.*, 2004).

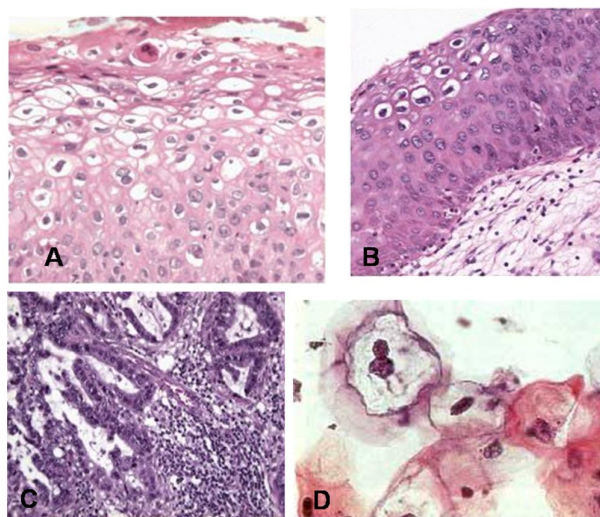


Figura 5. Citologia de lesões pré-cancerosas e carcinoma cervical invasivo provocado pelo Papilomavírus Humano (HPV). A-Lesão intraepitelial de grau 1 (baixo grau); B- lesão intraepitelial de grau 2 (alto grau); C- adenocarcinoma invasivo (Fonte: Lie e Kristensen, 2008) e D- células infectadas por HPV. Fonte: INCA, 2012.

A história natural do câncer cervical envolve alterações reversíveis no tecido cervical, de um estado normal, no qual nenhuma neoplasia é detectada no epitélio escamoso até diversos estados de atipia celular, incluindo o câncer propriamente dito ou Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC). Neste contexto, a NIC pode ser classificada em três tipos de acordo com a gravidade, isto é, grau 1 ou lesões intraepiteliais de baixo grau (LSIL) e graus 2 e 3 ou lesões epiteliais de alto grau (HSIL). Sabe-se que as LSIL podem progredir para HSIL e finalmente ao câncer cervical invasivo, entretanto, a regressão ao estado normal pode ser observada (SCHELECHT *et al.*, 2003).

De acordo com Rama *et al.* (2006), a história natural do carcinoma cervical pode ser dividida em três fases: 1- quando a infecção está presente e outras manifestações não são observadas; 2- quando as alterações morfológicas estão estabelecidas no epitélio da cérvix, caracterizando as lesões intraepiteliais; e 3- quando a lesão se torna irreversível, isto é, atravessa a membrana basal do epitélio, caracterizando o carcinoma invasivo, podendo levar a paciente a óbito.

O câncer cervical caracteriza-se por uma fase pré-maligna bem definida, a qual pode ser identificada por exame citológico e confirmada por exame histológico. Esta fase representa

diversos tipos de anormalidades, variando entre displasia leve (grau 1), moderada (grau 2) e grave (grau 3), caracterizando o carcinoma *in situ* (Figura 6).

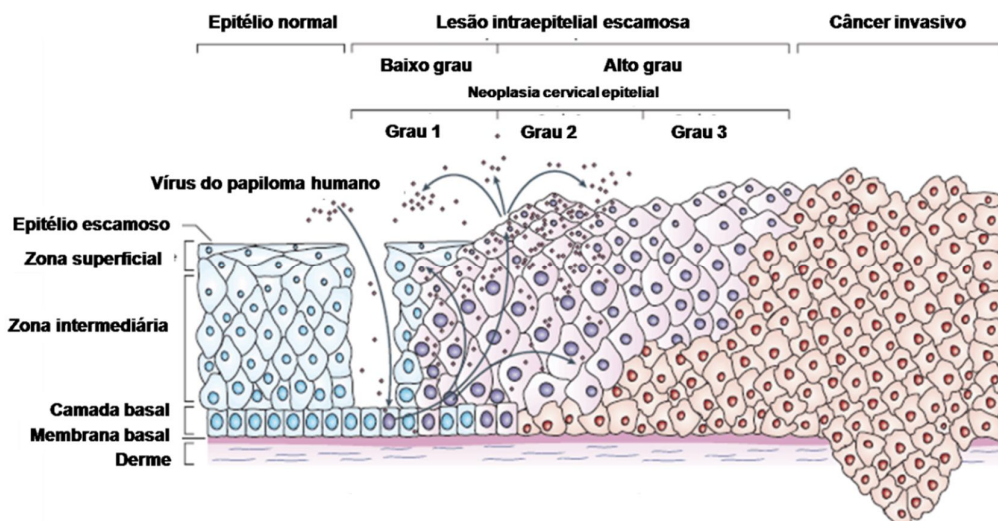


Figura 6. Diferentes fases das lesões promovidas pela infecção do epitélio cervical pelo Papilomavírus Humano (HPV). Fonte: Adaptado de Woodman, & Young (2007).

As células basais do epitélio cervical estão arranjadas sobre a membrana basal, a qual é suportada pela derme. O HPV acessa as células através de microabrasões do epitélio cervical. A partir da infecção, os genes proximais, *E1*, *E2*, *E4*, *E5*, *E6* e *E7*, são expressos e o DNA viral é replicado. Nas camadas superiores e intermediárias do epitélio, o genoma viral é replicado mais tarde pelos genes distais *L1* e *L2*. Ressalta-se ainda que a proliferação do vírus pode iniciar uma nova infecção. Durante estados de LSIL ocorre replicação viral produtiva, enquanto que um número desconhecido de HPV de alto risco pode progredir para HSIL. A lesão não tratada pode progredir ao câncer microinvasivo e invasivo, associado com a integração do genoma viral às células hospedeiras (RAMA *et al.*, 2006).

Cerca de dezoito tipos de HPV de alto risco apresentam interesse particular, visto que são associados com diferentes tipos de cânceres anogenitais. Estes vírus foram reunidos em três grupos filogenéticos, dois dos quais afiliados com o HPV-16 e 18 e o terceiro grupo, constituído por tipos de HPV menos investigados, 30, 53, 56 e 66. É importante salientar que apesar do reconhecimento do fato das infecções por HPV de alto risco possam desencadear um processo

tumoral maligno, fatores adicionais do indivíduo e do ambiente também estão implicados e participam do evento (PRADO *et al.*, 2005; NAKAGAWA *et al.*, 2010; MOSCICKI, 2011).

Um estudo de meta-análise, de Sanjosé *et al.* (2007) verificou que dentre os cinco tipos de HPV de alto risco mais prevalentes nas infecções em mulheres, o HPV-16 se destacou como o mais frequentemente encontrado nos tumores cervicais e orais em todo o mundo. Apenas no Japão, Taiwan e África ocidental o vírus ocupou o segundo lugar da lista, sendo observada maior prevalência do HPV-52. Entretanto, os cinco tipos mais comuns de HPV nas lesões malignas, em escala mundial foram: 16, 18, 31, 58 e 52, sendo os quatro primeiros, responsáveis por mais de 80% dos casos. Diante destes fatos, o HPV-16 foi eleito o tipo viral mais importante do ponto de vista do risco epidemiológico (LIZANO *et al.*, 2009; NAKAGAWA *et al.*, 2010).

Desde sua descoberta, o HPV-16 foi alvo de diversas investigações acerca de sua virologia. Muito do que se conhece sobre a história natural, patogenicidade e oncogenicidade do HPV provêm dos resultados obtidos nos estudos com o tipo 16. Neste contexto, o HPV-16 é o genótipo mais proeminente dentre os papilomavírus, em função da elevada prevalência nos casos de câncer cervical. No entanto, o vírus pode também ser associado a diferentes tipos de infecções e tumores, em outras áreas de tecido epitelial, tais como, pele, boca, faringe, pênis e ânus (CARVALHO *et al.* 2005; FARIDI *et al.*, 2011).

Evidências indicam que a persistência do HPV-16 e de outros tipos potencialmente oncogênicos parece ser essencial no desenvolvimento de neoplasias cervicais. Além disso, uma alta carga viral em mulheres com citologia normal tem sido associada com o aumento do risco de desenvolvimento de displasia e carcinoma *in situ*. Uma mulher cujo teste foi positivo para HPV de alto risco apresenta um risco 35 vezes maior em desenvolver HSIL ou um câncer cervical. Contudo, o risco da progressão ao câncer é maior se não for detectado e tratado. Felizmente, esta transição pode levar de anos a décadas, permitindo a oportunidade de diagnóstico (LORENZATO *et al.*, 2000; CARVALHO *et al.*, 2005; ANDERSON *et al.*, 2006; LIE e KRISTENSEN, 2008; FARIDI *et al.* 2011).

2.5 As infecções por HPV no Brasil

O Brasil é um país com dimensões continentais e por esta razão uma diversidade no âmbito socioeconômico e da saúde pode ser identificada nas diferentes regiões e Estados. Neste contexto, as divergências também ocorrem conforme a região de residência da população, isto é, se nas zonas urbanas ou rurais. Do ponto de vista da saúde pública, em particular, da saúde

da mulher, o Brasil é carente de acesso aos serviços públicos de promoção, prevenção e recuperação. Nesta conjuntura, a saúde da mulher abrange um vasto universo de questões sociais, educacionais e de políticas públicas (TEIXEIRA *et al.*, 1998; BARATA *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2008).

O carcinoma do colo uterino é o quarto tipo de câncer mais comum, superado pelos cânceres de pele não melanoma e de mama. A doença também desponta como a quarta maior causa de morte em mulheres no Brasil, com uma taxa de mortalidade de cerca de 20 por 100 mil habitantes. As incidências variam de região a região, como está apresentado na Figura 7 (INCA, 2014).



Figura 7. Incidência de câncer cervical no Brasil (por 100 mil habitantes). Fonte: INCA (2014).

Ao longo dos últimos 30 anos, observou-se um aumento progressivo dos casos de lesões malignas em mulheres jovens, tornando o Brasil o país com maior incidência de câncer cervical da América do Sul. As maiores incidências ocorrem nas regiões Sul, Norte, Centro-Oeste e por último, Nordeste e Sudeste (ALVES *et al.*, 2004; BALDEZ DA SILVA *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2009; PINTO; FUZII e QUARESMA, 2011).

Partindo-se da premissa que o HPV possui um importante papel no desenvolvimento de lesões epiteliais de alto grau (HSIL), as quais podem progredir a um carcinoma invasivo, não foram encontrados até a atualidade, no Brasil, dados completos com relação à infecção pelo

vírus, tão pouco sobre a prevalência do HPV nas diferentes regiões geopolíticas. De acordo com Ayres e Silva (2010), embora tenham aumentado significativamente em número desde o ano 2000, a maioria dos estudos sobre o tema está concentrada na região Sudeste, especialmente nas capitais e regiões metropolitanas, revelando a necessidade de investigações mais aprofundadas com o intuito de traçar um perfil mais realista da mulher brasileira.

Os autores também ressaltam o fato que nas investigações realizadas no Brasil, a prevalência do HPV é identificada em um universo de mulheres que buscam serviços de saúde. Além disso, são geralmente empregadas duas metodologias, as quais não são correlacionadas: a primeira descrevendo exclusivamente mulheres com citologia cervical atípica e a segunda, os métodos de detecção do HPV (AYRES e SILVA, 2010). A combinação da citologia com os métodos moleculares de detecção do HPV melhora a qualidade do rastreamento do câncer cervical (PERES *et al.*, 2015).

Em razão disto, os citados autores realizaram uma extensa revisão sistemática sobre a prevalência de HPV, em mulheres com citologia normal, durante um período de 10 anos, visando identificar o perfil da mulher brasileira, particularmente, o grupo com risco em potencial de desenvolver algum tipo de patologia. Os estados do Rio de Janeiro e São Paulo produziram o maior número de material científico sobre o tema e por consequência tornam as áreas em torno das duas maiores metrópoles brasileiras o melhor perfil da população do país. O estudo revelou o HPV-11 como o mais prevalente dentre os classificados como de baixo risco. Outros cinco genótipos foram identificados (HPV-6, 54, 62, 72 e 81). Em mulheres com citologia normal, o HPV-6 foi o mais prevalente.

Com relação os HPVs de alto risco, o tipo 16 foi identificado como o vírus mais prevalente no Brasil. O segundo e terceiro genótipos mais prevalentes foram o HPV-31 e 18, respectivamente. Outros nove genótipos de alto risco foram determinados (HPV-33, 35, 45, 52, 53, 56, 58, 66 e 68). O total de três foi mais prevalente nas mulheres com citologia normal (HPV-16, 53 e 33), outros três nas LSIL (HPV-16, 45 e 52) e um (HPV-16) em todas HSIL (AYRES e SILVA, 2010). O HPV-16 configura o genótipo mais importante nas infecções por HPV no Brasil, tanto em mulheres com citologia cervical normal, como nas que apresentam algum tipo de lesão. Entretanto, diferentes estudos revelaram percentuais diferentes sobre sua prevalência.

Carvalho *et al.* (2005) avaliaram durante três anos amostras de 788 mulheres, com idade média de 29.6 anos, coletadas de um laboratório particular na cidade do Rio de Janeiro, identificando uma elevada prevalência de infecção por HPV de 50.1%. Deste total, 25% foram

determinados em mulheres com citologia normal e 100% nas diagnosticadas com HSIL. Os resultados também revelaram que 58.3% das infecções foram provocadas por HPV de alto risco, expondo um sério problema de saúde pública.

Alguns estudos avaliaram a prevalência das infecções por HPV em mulheres infectadas pelo HIV e surpreendentemente o HPV-16 não foi o tipo mais prevalente. Levi *et al.* (2002) observaram uma exacerbada prevalência de HPV em 208 mulheres infectadas com HIV (98%) e os genótipos mais prevalentes foram os seguintes: HPV-6 (39.2%), HPV-51 (31.9%), HPV-11 (26%), HPV-18 (24%) e HPV-16 (22.5%). Do total geral, 10.5% das mulheres infectadas por HPV apresentaram citologia cervical normal, enquanto 13.4% desenvolveram LSIL ou HSIL.

Grinsztejn *et al.* (2009) investigaram e determinaram a prevalência de infecção por HPV de 48% em 634 mulheres infectadas por HIV. Do total de infectadas, 94% relacionavam-se a genótipos de alto risco. Os cinco genótipos mais prevalentes desta classe foram os HPV-68, 58, 39, 16 e 31, seguidos por mais quatorze variedades. Ressalta-se que esta pesquisa também apresentou o perfil de mulheres mais susceptíveis às infecções por HPV de alto risco: menos de 30 anos, da cor da pele parda ou preta, casadas, sem filhos, de baixa renda e escolaridade, tabagistas, com início da vida sexual aos 17 anos ou menos, com mais de cinco parceiros, os quais usaram preservativos e com histórico anterior de infecções por HPV e outras DST.

O perfil socioeconômico como fator de risco de infecções por HPV também foi discutido em mulheres não infectadas por HIV. Silva *et al.* (2009) comparou 250 mulheres de classes média e baixa e verificou que o segundo grupo, composto por mulheres negras com menos de 30 anos e diferentes parceiros sexuais, foi o mais susceptível, registrando 31,1% dos casos de infecção. Já as mulheres jovens de classe média, o maior risco foi identificado nas que faziam uso de álcool, 10.7%. Os HPV-16 e 18 foram os genótipos prevalentes tanto na classe baixa (10 e 4.7%, respectivamente), como na classe média (5.3 e 1.3%, respectivamente).

Pinto *et al.* (2011) estudaram 444 mulheres residentes na zona rural e urbana na Amazônia e verificaram percentuais similares nas infecções por HPV em ambas as áreas, 14.2 e 15%, respectivamente. O estudo revelou o início precoce da atividade sexual, o número de parceiros e histórico de DST como fatores de risco para adquirir o vírus. Os autores ressaltaram a importância da realização de estudos em áreas rurais pouco comuns no Brasil, os quais podem subsidiar estratégias mais concisas, voltadas para políticas públicas, uma vez que a idade e a região da residência são os fatores sociais mais significativamente determinantes em saúde.

O citado estudo também observou dois picos da infecção por HPV. O primeiro em adolescentes e o segundo nas mulheres acima de 45 anos, refletindo uma coitarca prematura e a rotatividade de parceiros nas mais jovens e sugerindo as alterações promovidas da menopausa e vida sexual ativa nas maduras.

Finalmente, um recente estudo alertou para a identificação de pontos de mutação nas regiões L1, E6 e E7 do genoma do HPV-53 em mulheres da cidade do Rio de Janeiro e que tal variedade se espalhou mais rapidamente que outras, uma vez que mulheres de diferentes regiões da cidade apresentaram o vírus (OLIVEIRA *et al.*, 2012). Este estudo representa um exemplo da tendência das investigações atuais em todo o mundo, nas quais enfatizam novas variedades de HPV de alto risco e ressaltam outras anteriormente negligenciadas.

2.5.1 A situação no Nordeste do Brasil

Poucos estudos têm sido realizados nos estados do Nordeste brasileiro e o perfil da mulher nordestina praticamente é desconhecido com relação às infecções por HPV. De acordo com Fernandes *et al.* (2009), a região Nordeste foi preterida pelo programa *Latin America Screening Study*, pelo qual avaliou apenas populações das regiões Sul e Sudeste.

Um estudo realizado com 250 mulheres em Natal-RN verificou uma prevalência de 48% de infecções por HPV, valor semelhante ao observado na região Sudeste. O genótipo 16 foi o HPV mais prevalente em 82 casos de LSIL e 58 de HSIL. Os principais fatores de risco identificados foram: idade, número de parceiros, início precoce da vida sexual e tabagismo, responsável também pelo aumento do risco das HSIL (FERNANDES *et al.*, 2009). Os principais tipos de HPV identificados no citado estudo, nos casos de infecção individual ou simultânea, isto é, quando a infecção está associada a dois tipos de HPV estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Papilomavírus humano (HPV) mais prevalentes em mulheres da cidade de Natal-RN.

Resultado do exame citológico	Tipos de HPV	
	Infecção simples	Infecção simultânea
Normal	16, 18 e 58	16/18
LSIL	16, 58 e 18	56/58
HSIL	16	16/58

Fonte: Fernandes *et al.* (2009).

LSIL – lesão intraepitelial de baixo grau; HSIL – lesão intraepitelial de alto grau.

Em Pernambuco, Lorenzato *et al.* (2000) em seu estudo investigativo com 479 mulheres da cidade de Recife, com idade média de 36.5 anos, verificaram uma prevalência de 42.2% de infecções por HPV de alto risco, observados em mulheres com citologia normal, casos de cervicite, condiloma, LSIL e HSIL. Do total obtido, 72.8% das ocorrências estavam relacionadas à NIC. Os HPVs 16 e 18 foram os mais prevalentes. O primeiro foi responsável por 80% dos casos de neoplasia cervical e 68% dos casos de HSIL, enquanto que o HPV-18 foi mais prevalente nas lesões de baixo grau.

Barreto *et al.* (2013) avaliaram a detecção de HPV em biópsias do colo uterino e a associação com a resposta clínica e sobrevida das pacientes com câncer cervical. Foram utilizadas amostras de biópsias de 183 pacientes com câncer cervical invasivo, sendo possível a identificação de 78 casos contendo o DNA viral. Neste estudo foi observado que a detecção do HPV não apresentou efeito estatisticamente significativo na sobrevida das pacientes com câncer cervical.

Baldez da Silva *et al.* (2009) avaliaram a incidência de diferentes tipos de HPV em Recife, utilizando amostras randômicas de 617 mulheres com idade média de 23 anos, onde foi possível identificar DNA viral em um total de 288 amostras. Neste estudo, foi observada uma prevalência maior dos genótipos 16, 31, 33 e 18, nas formas de infecção simples ou conjunta, isto é, com dois e até três tipos virais envolvidos. O HPV-16 também apresentou maior incidência em LSIL (30.3%) do que para HSIL (16.9%). O HPV-31 foi também identificado em um estudo realizado com mulheres atendidas no Departamento de Ginecologia do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP) em Recife, onde os oncogenes *E6* e *E7* desta variedade de vírus foram caracterizados em amostras do epitélio cervical normal ou apresentando lesões (CHAGAS *et al.*, 2011).

Considerando que Recife possui uma população superior a 3.000.000 de habitantes, os registros de câncer cervical ocorrem durante o rastreamento e/ou quando existe algum tipo de queixa de sintoma ginecológico. Entretanto, muitos casos poderiam ser evitados se não existissem preconceitos ou desconhecimento dos programas de rastreamento de câncer cervical por parte das pacientes. Quando se trata de infecções por HPV de alto risco, há um aumento de 36 e 50 vezes do risco de desenvolver HSIL e câncer do colo uterino, respectivamente. Estes valores foram estimados a partir das observações de Lorenzato *et al.* (2000). Segundo dados do IBGE (tabela 2) o grupo mais susceptível às infecções por HPV em Pernambuco, são as mulheres com idade entre 25 e 35 anos.

Tabela 2. Características da população de mulheres com idade entre 25 e 35 anos no Estado de Pernambuco.

Cor da pele ou raça	nº total de mulheres	nº de mulheres com 25 a 35 anos	% de mulheres com 25 a 35 anos	% com relação ao total de mulheres (por cor ou raça)	Percentual de analfabetas
Parda	2.495.942	830.597	55,5%	33,3%	13,8%
Branca	1.720.871	534.681	35,7%	31,1%	9,1%
Preta	274.407	106.888	7,1%	38,9%	13,8%
Amarela	47.213	16.201	1,1%	34,3%	13,9%
Indígena	27.307	8.318	0,6%	30,5%	17,7%
Total	4.565.740	1.496.685	100%	..	..

Fonte: IBGE (2010)

Os estudos realizados em Pernambuco mostraram elevada prevalência do HPV, sendo relacionada aos baixos níveis educacional e econômico das mulheres, bem como a certos tabus e medos que trazem da vida doméstica, por exemplo, o HPV ser apenas transmitido por homens, principalmente quando não se usa preservativo, bem como a possibilidade de contaminação durante o exame ginecológico de prevenção (SOUZA *et al.*, 2008).

2.6 Diagnóstico

2.6.1 Métodos citológicos e histológicos

Enquanto o diagnóstico histológico é empregado para a definição de NIC, o teste de Papanicolaou ainda é considerado o método citológico mais comum na detecção de displasias causadas por HPV. Esta técnica envolve a coleta por esfoliação das células da cérvix, com posterior coloração e observação microscópica, a mesma foi desenvolvida no final dos anos 1920. Nos países cujos programas de rastreamento e controle de câncer cervical são organizados, tem sido um sucesso. Além disso, a metodologia contribuiu para a redução da incidência e da taxa de mortalidade, porém apresenta certas limitações relevantes, as quais incluem a dependência de amostras com riqueza de células, a subjetividade da leitura e a elevada possibilidade de erro dada as exaustivas interpretações da rotina (BURD, 2007; ALMONTE *et al.*, 2011).

Por conseguinte, a citologia em base líquida (LBC) foi introduzida como forma de otimizar o teste. As amostras são coletadas utilizando-se uma escova própria para coleta cervical, sendo posteriormente transferidas para um meio líquido de preservação, até que a lâmina seja confeccionada no laboratório. A leitura e interpretação são fáceis, em função da formação de uma camada uniforme e livre de muco, proteínas, células sanguíneas, protozoários, bactérias e fungos. A comparação de performances da LBC com os métodos tradicionais revela aumento estatisticamente significativo na sensibilidade do diagnóstico. A técnica permite o aumento da detecção de 4 a 117% de atipias celulares. No entanto, sua maior limitação é o custo (SPITZER, 1998; ARBYN *et al.*, 2008; ALMONTE *et al.*, 2011).

2.6.2 Métodos moleculares

A captura híbrida foi a primeira técnica aprovada pelo FDA para a detecção do DNA viral em amostras cervicais. A segunda geração do ensaio, conhecida por captura híbrida II (CH2) está atualmente disponível e baseia-se na hibridação do DNA, empregando sondas ou *primers* específicos contra determinados genótipos de HPV, em particular de alto risco, por exemplo, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68 (BURD, 2007).

As amostras são transportadas em frascos específicos contendo meio líquido de preservação. As células são lisadas e o DNA liberado em um meio alcalino aquecido é

desnaturado e misturado a um *pool* de sondas de RNA em solução tamponada, resultando complexos híbridos DNA-RNA, os quais se ligam a anticorpos anti-DNA-RNA. O complexo formado reage com um segundo anticorpo anti-DNA-RNA, conjugado à fosfatase alcalina, posteriormente detectado pela adição de uma substância quimioluminescente. A luz emitida é então medida e comparada a um valor de *cut-off*. Apesar de ser bem aceita, a CH2 se mostra menos sensível, quando comparada à PCR. Resultados falso-negativos podem ocorrer em função de baixos níveis de infecção, erros de amostragem ou presença de interferentes, tais como cremes ginecológicos e contraceptivos em gel (BURD, 2007; RODRIGUES *et al.*, 2009).

O reconhecimento da estreita relação entre a persistência de HPV de alto risco em infecções do trato genital como fator de risco mais significativo da maioria das lesões pré-cancerosas e do câncer cervical, resultou no desenvolvimento de um amplo número de testes de identificação de DNA viral. As técnicas moleculares são consideradas potencialmente úteis e quatro aplicações clínicas justificam seu emprego: 1- na identificação primária e combinada ao teste de Papanicolaou; 2- na triagem de mulheres portadoras de lesões menores; 3- na continuidade da investigação em mulheres com lesões significativas e 4- nos exames de manutenção de mulheres tratadas das lesões malignas, por medicamentos ou excisão (CUZICK *et al.*, 2008; NISHINO *et al.*, 2011).

O Centro para o Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (CDC) sugere que tais testes sejam disponibilizados apenas para mulheres com idade maior que 30 anos, não sendo recomendado para mulheres com menos de 20 anos, homens ou como um teste geral para IST. Os kits detectam DNA viral ou proteínas do capsídeo e duas marcas com apresentações distintas de testes foram aprovadas em território americano: Quiagen®, para HPV de alto risco e para de baixo risco e Hologics®, para HPV-16/18 e para o teste geral de HPV de alto risco (CDC, 2010).

Uma grande variedade de técnicas moleculares vem sendo empregada em diferentes estudos na literatura, destacando-se a captura híbrida, *Southern* e *Northern Blot*, hibridação *in situ*, além de diferentes tipos métodos baseados na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), tais como a Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição (PCR-RFPL). Estas técnicas apresentam sensibilidade e especificidade variadas, entretanto, a captura híbrida e PCR consistem nas metodologias mais empregadas na atualidade (DEMATHE *et al.* 2010).

Em contrapartida, as grandes vantagens da técnica de PCR consistem em sua reconhecida eficácia, acurácia, simplicidade e pelo ganho de tempo. São utilizadas em uma única corrida, sondas específicas para um amplo espectro de tipos de HPV, de forma que

diferentes genótipos sejam detectados simultaneamente. As mais empregadas incluem MY09/11 e seus derivados, PGMY09/11, GP5+/GP6+ e SPF10, bem como os *primers* KP-F/1 a KP-F-16. Tais sondas reconhecem regiões conservadas do genoma, em particular, a região L1. A técnica é conduzida utilizando amostras coletadas em meio líquido de preservação, podendo ser tanto de origem cervical como podem se estender às amostras ectocervicais. No entanto, o método não permite a quantificação do DNA viral (BURD, 2007; TAKÁCS *et al.*, 2008; SCHMITZ *et al.*, 2009).

Segundo Yamamoto *et al.* (2004), estratégias de rastreamento do câncer cervical, tais como citologia + teste de DNA viral, em mulheres apresentando atipia na citologia cervical têm sido propostas. O gerenciamento dos testes em mulheres portadoras de HPV de alto risco e com citologia normal configura a chave do esquema proposto e apresentado na Figura 8.

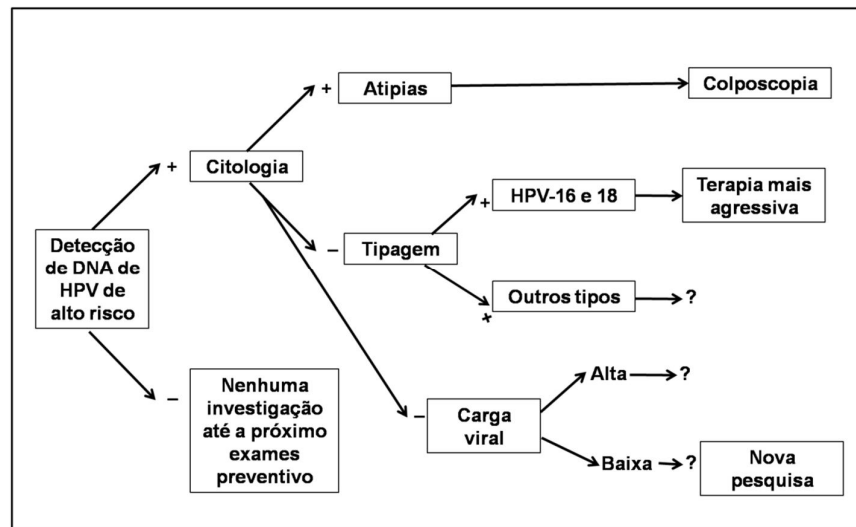


Figura 8. Esquema proposto de rastreamento combinado de câncer cervical. Fonte: Lorenzato *et al.* (2000).

Os princípios básicos do rastreamento sugerem que o uso mais apropriado da forma combinada de diagnóstico permite a maior sensibilidade e apoia mais especificidade na triagem das mulheres inicialmente diagnosticadas com HPV. Entretanto, a inclusão de outros genótipos de importância epidemiológica deve ser considerada. A eficácia do rastreamento para o diagnóstico de neoplasia cervical, medida pela sensibilidade e especificidade das técnicas empregadas, de forma simples ou combinada, está apresentada na Tabela 3.

Tabela 3. Eficácia das metodologias de rastreamento de câncer cervical.

Método	Resultado	Sensibilidade	Especificidade
Citologia	CIN + Câncer	71,5%	85,2%
	Câncer	80,6%	87,0%
Genotipagem de HPV	CIN + Câncer	81,2%	81,5%
	Câncer	89,8%	84,7%
Citologia e genotipagem, combinados	CIN + Câncer	87,3%	71,1%
	Câncer	96,8%	74,9%

Fonte: Lorenzato *et al.* (2000). CIN – Neoplasia Intracervical. HPV – Papilomavírus Humano.

Os dados revelados na Tabela 3 evidenciam notadamente as vantagens da associação de metodologias, as quais combinam citologia tradicional e genotipagem do HPV. Nestes casos, altos índices de sensibilidade podem ser detectados nos testes, provando que a combinação de metodologias se torna um meio mais eficaz no diagnóstico, bem como das intervenções conduzidas a partir dele.

Devido à baixa prevalência de lesões cervicais pré-cancerosas de alto grau no rastreamento de rotina na população, há um número substancial de casos citológicos Papanicolau achados morfológicos equívocos ou sem significância determinada, nos quais o grau de neoplasia intraepitelial não pode ser confirmado nas amostras histológicas coletadas (WRIGHT *et al.*, 2001; SCHIFFMAN *et al.*, 2007).

Uma vez que a maioria dos cânceres cervicais é induzida pela infecção persistente por tipos de HPV de alto risco, testar para a presença de HPV foi incorporada ao gerenciamento de resultados citológicos Papanicolau categorizados como ASC-US (*atypical squamous cells of undetermined significance* – células escamosas atípicas de significância indeterminada) em vários países. Embora o rastreamento dos tipos de HPV em amostras histológicas apresente uma maior sensibilidade e reprodutividade do que as repetições da citologia Papanicolau, o teste rotineiro dos tipos de HPV tem suas limitações, principalmente no que diz respeito à especificidade. A vasta maioria dos casos ASC-US positivos para HPV de alto risco não apresenta anormalidade de alto grau. Além disso, devido à alta prevalência de infecções por HPV, especialmente em grupos jovens, a eficiência de triagem de casos ASC-US com teste de HPV é variável, dependendo da idade da paciente e de outras questões socioeconômicas (SOLOMON *et al.*, 2001; ALTS Study Group, 2003).

Vários marcadores moleculares têm sido propostos como potenciais candidatos para uma triagem eficiente de resultados citológicos do Papanicolau indeterminados e moderadamente anormais. O marcador deve atuar como método diagnóstico complementar ao teste de HPV, permitindo uma detecção mais significativa e específica de neoplasias intraepiteliais cervicais, para achados citológicos ASC-US e LSIL.

Estes marcadores histológicos têm sido utilizados para averiguar a progressão bem como o nível de malignidade de diversos tipos de neoplasias, incluindo o câncer cervical (KALOF *et al.*, 2006; SONG *et al.*, 2007; WALTZ *et al.*, 2009).

Um dos marcadores mais intensamente estudados é a proteína celular p16^{INK4a} (p16), um inibidor de quinase dependente de ciclina (Figura 9), que foi demonstrado em diversos estudos sendo fortemente superexpresso em quase todas as lesões precursoras de alto grau e em cânceres invasivos da cérvix uterina (WENTZENSEN & von KNEBEL, 2007; TSOUMPOU *et al.* 2009).

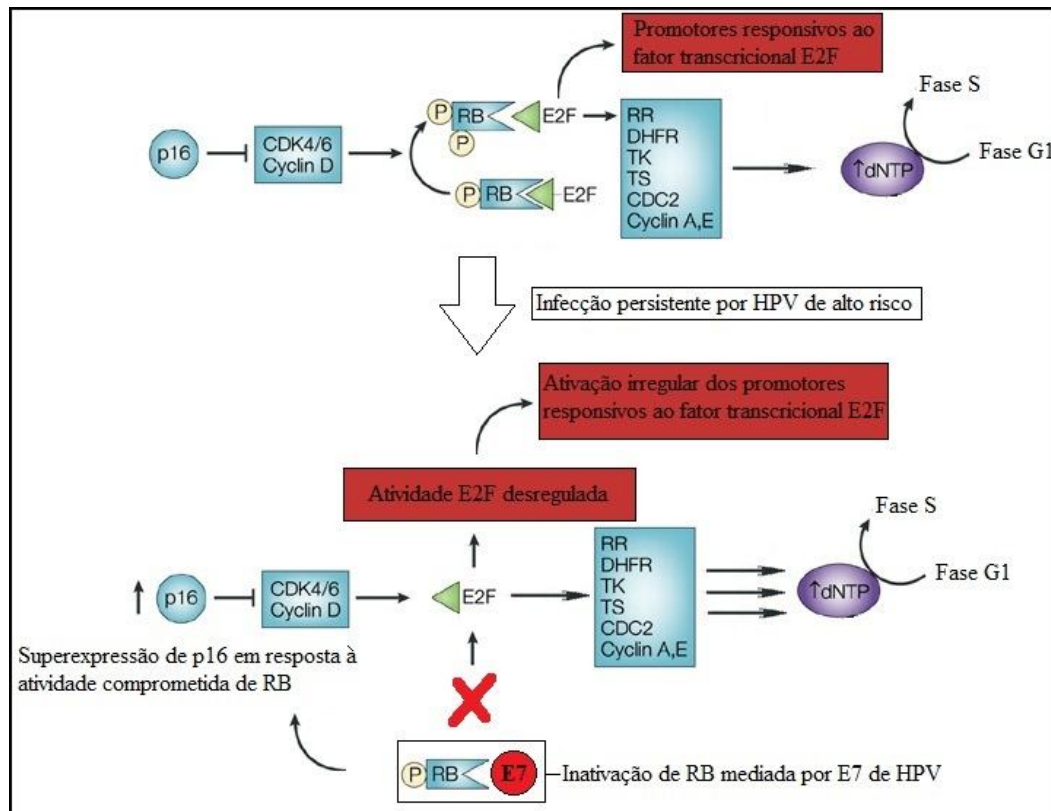


Figura 9. Base molecular da superexpressão de p16^{INK4A} em células transformadas por HPV.

A expressão dessa proteína reguladora do ciclo celular está diretamente relacionada com a atividade transformante da oncoproteína viral E7 de HPV de alto risco a nível molecular. Reconhecendo-se que a inativação prolongada da proteína supressora tumoral, pRb, pela oncoproteína E7 é necessária para a manutenção do fenótipo maligno associado ao HPV em células cancerosas, a detecção da superexpressão de p16^{INK4A} pode ser útil como um marcador substituto altamente sensível e específico para a inativação de pRb em células epiteliais transformadas por HPV. Vários estudos têm avaliado a função de p16^{INK4A} como marcador diagnóstico de progressão de lesão cervical (KEATING, 2001; KLAES *et al.*, 2001; AGOFF, 2003; WANG, 2004; KALOF *et al.*, 2005; LORENZATO, 2005; BENEVOLO, 2006; OZAKI, 2011). Além disso, p16^{INK4A} é uma proteína supressora tumoral responsável pelo bloqueio do ciclo celular na fase G1 quando há anomalias no DNA, aparecendo de forma superexpressa nas displasias de alto grau e nos carcinomas cervicais (KLAES *et al.*, 2001; ALBERTS *et al.*, 2004).

Outro marcador, a proteína Ki-67, vem sendo considerado como um dos principais marcadores histológicos de proliferação, onde a avaliação de células positivas para Ki-67 no epitélio cervical pode ser utilizada para diferenciar graus de lesões cervicais. É considerada ferramenta complementar ao diagnóstico histopatológico (KRUSE *et al.*, 2001; KEATING *et al.*, 2001; MIDDLETOON *et al.*, 2003; BUBAN *et al.*, 2009). A proteína Ki-67 está presente nas células durante todas as fases do ciclo celular (G1, S, G2 e mitose), sendo expressa no núcleo. Portanto, nas anomalias citológicas, como na infecção por HPV, auxilia na investigação e prognóstico da doença (BROWN & GATTER, 2002; SILVA-FILHO *et al.*, 2005).

2.7 Prevenção e Tratamento

O câncer cervical figura como umas das doenças preveníveis, com maior ocorrência no mundo. Por quase um século, o rastreamento desta condição vem sendo conduzido pelo exame de Papanicolaou e colposcopia. Em verdade, os programas de prevenção provaram ser eficazes e milhões de mulheres continuam sendo diagnosticadas com a doença a cada ano. Após o reconhecimento da infecção persistente com genótipos oncogênicos de HPV, novos modelos de testes preventivos foram criados, os quais incluem teste de DNA viral em mulheres maduras e imunização para as mais jovens. A prevenção de infecções por HPV é presumidamente o meio mais eficiente para evitar o câncer cervical. A abstinência sexual e o uso de preservativo podem reduzir o risco da infecção, entretanto, a vacinação é considerada o meio mais importante de prevenção na atualidade (TINDLE, 2002; LEGGATT e FRAZER, 2007).

Alternativas de tratamento das complicações originadas a partir da infecção e não sobre diretamente o vírus foram descritas na literatura mundial. Abu *et al.* (2005) estudaram uma terapia denominada “quimiopreventiva”, empregando retinóides, baseados em resultados pioneiros e promissores obtidos com ácido-trans-retinóico no início dos anos 1980 (SURWIT *et al.*, 1982; MEYSKENS *et al.*, 1983). Fisiologicamente, os retinóides regulam importantes funções celulares no organismo, uma vez que receptores específicos podem ser encontrados em diversos tipos de células, como no caso do tecido epitelial. Neste contexto, tais moléculas podem inibir a carcinogênese através de diferentes vias, as quais promovem apoptose, inibição do crescimento e diferenciação de células pré-cancerosas. Além disso, na cérvix, os retinóides mostram interação com proteínas E6 e E7 e desta forma, participam da restauração dos papéis de supressores tumorais das proteínas pRb e p53 (DURST *et al.*, 1992).

Com relação às infecções subclínicas, isto é, quando não há desenvolvimento de neoplasia intraepitelial cervical, os dados da literatura obtidos a partir de uma extensa revisão sistemática revelam que a eficácia do tratamento não é satisfatória. Entretanto, algumas terapias como, vaporização a laser de CO₂, nitrogênio líquido, α e β interferon, betacaroteno, 5-fluoruracil e ácido tricloacético são propostas embora potencialmente agressivas ou de alto custo (RUSSOMANO *et al.*, 2000).

O HPV possui um excelente sistema de proteção contra o sistema imune da célula hospedeira. O fenômeno de imortalização e as ausências de um processo inflamatório e viremia, constituem as maiores razões para a pouca ou nenhuma resposta do sistema de defesa, seja inata ou adaptativa. Assim, o desenvolvimento da vacina contra o HPV foi um marco na história da imunização uma vez que as vacinas contra as infecções por HPV protegem contra o risco subsequente do desenvolvimento de câncer cervical (FRAZER, 2007).

Os principais requisitos para uma vacina contra câncer cervical são: 1- atingir células dendríticas específicas; 2- induzir grande número de células T efectoras (CD4 e CD8); 3- aumentar o trânsito de células T; 4- exceder a imunossupressão; e 5- gerar inflamação local aguda na área do tumor (LEGGATT & FRAZER, 2007).

A preparação destes insumos é baseada na confecção de partículas semelhantes a vírus, produzidas pela expressão das proteínas do capsídeo do vírus, particularmente L1, com e sem L2, empregado tecnologia de DNA recombinante (LEGGATT & FRAZER, 2007).

Duas vacinas baseadas na produção de proteínas L1 recombinante foram desenvolvidas e estão disponíveis no mercado. A primeira, quadrivalente, inclui partículas semelhantes aos genótipos do HPV 6, 11, 16 e 18. Neste contexto, auxilia na prevenção de aproximadamente 70

e 90% dos casos de câncer cervical e de verrugas genitais, respectivamente. Ela aumenta em 40 vezes os títulos de anticorpos anti-HPV, se comparado ao nível fisiológico encontrado na infecção natural pelo vírus. Ressalta-se que os títulos de anticorpos contra HPV-16 e 18 podem aumentar até onze vezes mais, nas mesmas condições, mesmo após cinco anos e meio da imunização (SOUAYAH *et al.*, 2011).

Entretanto, a vacina quadrivalente apresenta uma sequela neurológica importante: a síndrome de Guillain-Barré, doença demielinizante autoimune, caracterizada por inflamação aguda com perda de mielina. Esta doença atinge de 2 a 4 pessoas para cada 100.000 habitantes em todo o mundo. Dados consistentes da literatura afirmam que após a imunização este número pode aumentar 200%, tornando o risco da doença uma preocupação de grande interesse, do ponto de vista da saúde pública (TELLERIA-DIAZ & CALZADA-SIERRA, 2002; SOUAYA *et al.*, 2009).

A segunda vacina, bivalente, contém partículas semelhantes a os genótipos oncogênicos, HPV-16 e 18 (EKLUND *et al.*, 2012). Na Tabela 4 estão apresentadas as especificações técnicas das duas vacinas disponíveis e aprovadas para uso na atualidade.

Tabela 4. Especificações técnicas das vacinas contra HPV disponíveis no mercado.

Parâmetros técnicos	Vacinas	
	Gardasil®	Cervarix®
Fabricante	Merk & Co.	GlaxoSmithKline
Ano de aprovação pelo FDA	2006	2009
Espectro de ação	Quadrivalente (HPV-6, 11, 16 e 18)	Bivalente (HPV-16 e 18)
Biotechnology empregada na produção	Células leveduriformes.	Células do inseto <i>Trichoplusia ni</i> , tendo Baculovírus como vetor
Indicações	Prevenção de cânceres: cervical (75%), vaginal (70%) e vulvar (50%).	Prevenção de HSIL e adenocarcinoma <i>in situ</i>
População imunizada	Crianças e mulheres de 9 a 26 anos.	Crianças, mulheres e homens de 9 a 25 anos.
Esquema de imunização	3 doses durante 6 meses.	3 doses durante 6 meses.
Efeitos colaterais	Dor, edema, rubor, febre, cefaleia, náusea, vômitos e desmaios.	Dor, rubor, edema, fadiga, cefaleia, mialgia, sintomas gastrointestinais e artralgia.

Recomendações especiais

Não informadas pelo
fabricante.

Gravidez e
imunocomprometimento.

* Baseadas nas informações fornecidas pelos fabricantes. FDA – *Food and Drug Administration*; HPV – Papilomavírus Humano; HSIL – Lesões intraepiteliais de alto grau.

Contudo, as atuais vacinas disponíveis no mercado não cobrem outros tipos oncogênicos, tais como HPVs 31, 33, 45, 51, 52, 56, 58 e 66. Para isso, recentemente foi aprovada pela FDA (*Food and Drug Administration*) a vacina nonavalente HPV V503 (Merk Sharp and Dohme), a qual é composta por VLPs dos HPVs 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 e 58. Tal vacina pretende proteger 97% dos casos de câncer cervical, vagina e vulva. (MERCK, 2014).

As vacinas disponíveis são tipo-específicas, protegendo apenas contra até quatro genótipos. Entretanto, as similaridades entre certos tipos do vírus, sugerem uma possível proteção cruzada. Uma análise na Figura 10 pode revelar que certo grau de proteção cruzada das vacinas é possível (Bonanni *et al.*, 2009).

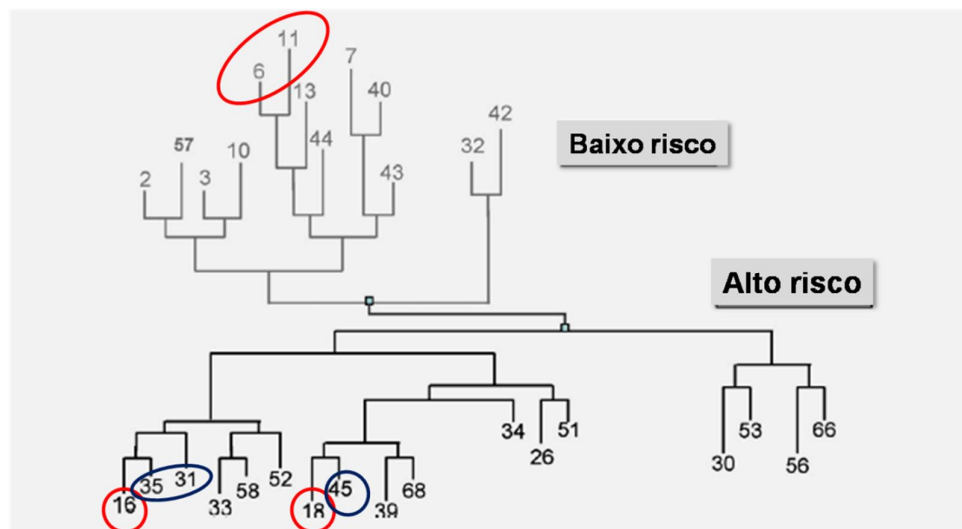


Figura 10. Árvore filogenética do Papilomavírus Humano destacando os genótipos cobertos pelas vacinas (vermelho) e sugerindo possível proteção cruzada para outros tipos de HPV (azul). Fonte: adaptado de Bonanni *et al.* (2009).

A hipótese da proteção cruzada foi postulada e sugerida a partir de observações em estudos prévios, dada a alta homologia entre alguns tipos virais de alto risco, com os envolvidos na vacina, isto é, HPV-35 e 31 relacionados ao HPV-16 e HPV-45, relacionado ao tipo 18 (PAAVONEN *et al.*, 2007; SMITH *et al.*, 2007; JENKINS, 2008). A proteção cruzada significa que a imunização contra certos tipos de HPV promove proteção clínica e estatisticamente significativa contra infecções ou doenças causadas por outros tipos de HPV (BONANNI *et al.*, 2009).

Finalmente, de uma lista de aconselhamentos do CDC sobre tratamento e prevenção das infecções por HPV alguns merecem destaque: 1- os tipos de HPV que provocam verrugas genitais são diferentes dos que provocam o câncer anogenital; 2- o diagnóstico de infecção por HPV em um dos parceiros não implica infidelidade; 3- os tratamentos existem para as condições provocadas pelo vírus e não para o HPV em si; 4- a infecção pelo vírus não torna a mulher infértil; 5- o uso de preservativo é importante como meio de prevenção, apesar do vírus poder atingir áreas desprotegidas pelo invólucro; 6- a diminuição do número de parceiros é uma atitude saudável sob vários pontos de vista; e 7- as verrugas não são uma ameaça à vida (CDC, 2010).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Detectar e genotipar os tipos de HPV bem como realizar um estudo de associação da expressão de biomarcadores p16^{ink4a} e Ki-67 com as lesões cervicais de mulheres do interior de Pernambuco (Região Agreste) portadoras de lesões intraepiteliais e cervicais invasivas.

3.2 Específicos

- Determinar a frequência dos genótipos de HPV de alto e baixo risco oncogênico presente em NIC 1, NIC 2, NIC 3 e no câncer de colo uterino;
- Determinar a frequência de mono, dupla, tripla, e quádruplas infecções por HPV em mulheres da Região Agreste de Pernambuco;
- Realizar um estudo de associação da expressão dos biomarcadores p16^{INK4A} e Ki-67 com as lesões cervicais associados ao HPV.

4. METODOLOGIA

4.1 Desenho do Estudo

Foi realizado um estudo do tipo descritivo com amostras de conveniência a partir de dados do arquivo do Laboratório de Análises Clínicas.

4.2 População de Estudo

Foram incluídas na pesquisa 211 amostras cervicais de mulheres com idade variando entre 19 e 72 anos, que apresentaram alterações citológicas quando da realização dos exames preventivos no período do estudo.

4.3 Local do Estudo

Laboratório de Análises Clínicas de uma rede privada da cidade de Garanhuns, Região Agreste do Estado de Pernambuco, no período de 2009 a 2010.

4.4 Categorização das Amostras

Sexo: Definida pelo gênero apresentado pelo paciente, sendo categorizada como variável nominal dicotômica (masculino / feminino).

Idade: Definida como o intervalo de tempo entre a data do nascimento e a data de realização da coleta, sendo categorizada como variável quantitativa discreta.

LSIL: Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau.

HSIL: Lesão intraepitelial escamosa de alto grau.

NIC 1: Neoplasia Intraepitelial cervical grau 1 – displasia média. A NIC 1 também pode ser classificada citologicamente como lesão intraepitelial escamosa de baixo grau.

NIC 2: Neoplasia Intraepitelial cervical grau 2 – displasia moderada. A NIC 2 também pode ser classificada citologicamente como lesão intraepitelial escamosa de alto grau.

NIC 3: Neoplasia Intraepitelial cervical grau 3 – displasia severa. A NIC 3 também pode ser classificada citologicamente como lesão intraepitelial escamosa de alto grau.

4.5 Técnicas utilizadas

4.5.1 Extração do DNA

A extração de DNA foi realizada a partir das amostras positivas na citologia (LSIL e HSIL) e histologia (NIC 1, NIC 2, NIC 3). Para isso, o meio líquido preservante celular foi posteriormente centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos (Fanem 206MP). O sobrenadante foi descartado e ao *pellet* celular foi adicionada a solução de extração com a seguinte composição: NaCl, 0,1 Mol/L; EDTA 10 mMol/L; Tris 10 mMol/L, pH 7.5, contendo SDS 0.5% e proteinase K 0,5 g/L. Em seguida, os sistemas foram levados à estufa (Nova Ética 411D) e incubados à 56°C por 30 minutos.

Após a extração, o DNA foi purificado empregando-se o método padrão Fenol/Clorofórmio 1:1 (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), seguido da precipitação com álcool isopropílico (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) à -20°C por 20 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi removido por inversão e deixado em repouso, por um período apropriado até a secagem do material à temperatura ambiente. Após este tempo, o DNA foi purificado e diluído novamente em solução Tris para posterior amplificação por PCR.

4.5.2 PCR-RFLP

A identificação biomolecular dos genótipos de HPV foi baseada na técnica do PCR-RFLP como descrita por Nobre *et al.* (2008).

A amplificação do trecho hipervariável do gene L1 para genotipagem foi realizada empregando: MgCl₂ 1,5 mMol/L, 200 mMol/L de cada dNTP, uma unidade de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, São Paulo, Brasil) e 12.5 pMol/L de cada *primer*, MY09 (5'-CGTCCMARRGGAWACTGATC-3') e MY11 (5'-CMCAGGGWCATAAYAATGG-3'). As reações de amplificação foram realizadas em termociclador (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems) nas seguintes condições: ciclo inicial de desnaturação à 95°C por 4 minutos, seguidos de 35 ciclos intermediários de desnaturação à 94°C por 30 segundos, anelamento à 56°C por 30 segundos, extensão à 72°C por 30 segundos e ciclo de extensão final à 72°C por 8 minutos. Como controle da eficiência da extração do DNA e da reação de PCR foi amplificado um fragmento de 501 pb do gene da betaglobina, utilizando os *primers* Beta1

(5'-TCAACCCTACAGTCACCCAT-3') e Beta2 (5-CTAACAATTACGAACAGCAATGAG-3'), sob as mesmas condições de PCR.

Cada solução com o produto de PCR foi submetida à digestão enzimática com as enzimas de restrição *Dde* I, *Hae* III, *Rsa* I, *Pst* I por 1 hora a 37°C de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen, São Paulo, Brasil). Os fragmentos de DNA foram identificados por eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, marcado com SYBR *Safe* e posteriormente purificados, empregando o kit *UltraClean PCR Clean-up* (MOBio, Carlsbad, EUA). A pureza dos produtos de PCR foi determinada por densidade ótica em espectrofotômetro (ND-1000 UV-Vis, Thermo Scientific).

4.5.3 Genotipagem

As amostras contendo o DNA foram sequenciadas utilizando o ABI 3730 DNA Analyser, *Applied Biosystems* e empregando-se os programas *Sequencing Analysis*®, versão 5.3.1 e *Chromas Lite*®, versão 2.01. As sequências foram então comparadas às disponíveis no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

4.5.4 Imunohistoquímica para p16^{INK4A} e Ki-67

A imunohistoquímica para as proteínas p16^{INK4A} e Ki-67 foi realizada a partir de amostras colhidas para biopsias e parafinadas das lesões. Foram realizados cortes de 4µm de espessura de blocos parafinados e foi utilizado o método avidina-biotina peroxidase. Os anticorpos utilizados foram monoclonais de rato contra a proteína anti-p16^{INK4A} (DAKO Cytomation, K5334, clone E6H4, diluição 1:25) e Ki-67 (Dako, code: N1633, Denmark; diluição 1:50). A recuperação antigênica foi realizada a 100°C por micro-ondas. As lâminas sofreram resfriamento à temperatura ambiente e a peroxidase endógena foi bloqueada por 7,5 minutos na solução bloqueadora desta. As lâminas foram incubadas com solução cromógena de diaminobenzidina (DAB), lavadas em água, contra-coradas em hematoxilina, desidratadas e montadas. A análise da imunoreatividade foi realizada através da detecção da proteína p16^{INK4A} no núcleo e citoplasma das células epiteliais e descritas utilizando os seguintes escores: Positiva quando a reatividade é moderada a forte em mais de 10% das células epiteliais), Negativa quando a reatividade moderada ou forte reatividade ocorre em menos de 10% de células epiteliais.

4.6 Análises estatísticas

O tratamento estatístico realizado nos resultados compreendeu a análise separadamente dos mais prevalentes tipos de HPV (HPVs 16, 18, 31, 33 e 35). A *odds ratio* (OR) de NIC 2, NIC 3 e câncer, com infecções simples ou múltiplos de HPV foram calculadas em comparação com o grupo NIC 1. A *odds ratio* (OR) e intervalos de confiança de 95% (IC) são relatadas através do texto e nas tabelas. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o Medical® versão 14.10.2 <http://www.medcalc.org/index.php>.

4.7 Aspectos éticos da pesquisa

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Pernambuco sob o número do CAE: 0285.0.172.00-11.

5. RESULTADOS

5.1 Perfil genotípico da infecção por Papilomavírus Humano em mulheres do Agreste de Pernambuco com diagnóstico histopatológico de lesão cervical de baixo e alto grau

Introdução

O carcinoma cervical uterino é o quarto tipo de câncer mais comum, sendo considerado como a segunda maior causa de morte em mulheres em todo o mundo, particularmente nos países em desenvolvimento (Gargiulo *et al.*, 2007; Nakagawa *et al.*, 2010; Siegel *et al.*, 2016).

Estudos clínicos e epidemiológicos consideram a infecção pelo HPV como uma condição necessária para o desenvolvimento do câncer cervical. No entanto, só pequena parcela das mulheres infectadas pelo vírus desenvolve o câncer, o que demonstra que apenas a presença do HPV parece não ser suficiente para o desenvolvimento da doença (Bosch *et al.*, 2002; Veldhuijzen *et al.* 2010; Almonte *et al.*, 2011).

São conhecidos mais de 200 genótipos de HPV dos quais cerca de 40 são responsáveis pela infecção do trato genital, incluindo os tipos 16, 18, 31, 52 e 58, considerados como genótipos de alto risco oncogênico e agentes etiológicos do câncer cervical. Em contrapartida, os tipos HPV-6 e HPV-11 são considerados como tipos de baixo risco e responsáveis pelo surgimento de verrugas genitais, caracterizadas como uma condição benigna (Ayres & Silva, 2010; Farid *et al.*, 2011).

Múltiplas infecções por HPV são comumente encontradas em estudos epidemiológicos moleculares (Nielsen *et al.*, 2008; Mejlhede *et al.*, 2009; Dickson *et al.*, 2013; Dickson *et al.*, 2014). No entanto, a importância clínica destes múltiplos genótipos de HPV na modulação do risco de lesões intraepiteliais escamosas (SIL) permanece controverso. Alguns estudos têm demonstrado uma associação entre lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL) ou lesão intraepitelial escamosa de alto grau (HSIL) em mulheres infectadas com vários tipos de HPV (Cuschieri *et al.*, 2004; Chaturvedi *et al.*, 2011; Dickson *et al.*, 2013; Dickson *et al.*, 2014).

No Brasil, estudos têm mostrado que o HPV-16 é o mais prevalente, embora exista variações regionais com relação aos diversos genótipos. Desta forma, os dados de um local não podem ser generalizados para todo o país (Eluf-Neto *et al.*, 1994; Cavalcanti *et al.*, 1994; Noronha *et al.*, 1999; Lorenzato *et al.*, 2000; Rabelo-Santos *et al.*, 2003; Chaturvedi *et al.*, 2004; Baldez da Silva *et al.*, 2009; Freitas *et al.*, 2012; Pirog *et al.*, 2014).

O conhecimento da distribuição de genótipos de HPV pode orientar na introdução de vacinas profiláticas e na determinação da epidemiologia local de genótipos circulantes do HPV de alto risco. Este estudo tem como objetivo determinar o perfil genotípico da infecção por HPV em mulheres da Região Agreste e sua associação com a progressão da lesão e câncer cervical.

Metodologia

População investigada

O estudo compreendeu a análise de 211 casos de mulheres, com idade variando entre 19 e 72 anos (média de 42.5 anos), residentes na Região Agreste do Estado de Pernambuco.

Os dados foram obtidos do arquivo de um laboratório privado localizado na cidade de Garanhuns. Os casos, nos quais, as mulheres foram submetidas à vacina contra HPV foram excluídos.

Genotipagem para o HPV

A identificação biomolecular dos genótipos de HPV foi baseada na técnica do PCR-RFLP como descrita por Nobre *et al.* (2008). As amostras biológicas foram coletadas em meio líquido com o auxílio de escova cervical estéril (Kolplast Ci Ltda, São Paulo, Brasil), posteriormente centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos (Fanem 206MP). O sobrenadante foi descartado e ao *pellet* celular foi adicionada a solução de extração com a seguinte composição: NaCl, 0,1 Mol/L; EDTA 10 mMol/L; Tris 10 mMol/L, pH 7.5, contendo SDS 0.5% e proteinase K 0,5 g/L. Em seguida, os sistemas foram levados à estufa (Nova Ética 411D) e incubados à 56°C por 30 minutos. Após a extração, o DNA foi purificado empregando-se o método padrão Fenol/Clorofórmio 1:1 (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), seguido da precipitação com álcool isopropílico (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) à -20°C por 20 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi removido por inversão e deixado em repouso, por um período apropriado até a secagem do material à temperatura ambiente. Após este tempo, o DNA foi purificado e diluído novamente em solução Tris para posterior amplificação por PCR.

A amplificação do trecho hipervariável do gene L1 para genotipagem foi realizada empregando: MgCl₂ 1,5 mMol/L, 200 mMol/L de cada dNTP, uma unidade de *Taq* DNA

polimerase (Invitrogen, São Paulo, Brasil) e 12.5 pMol/L de cada *primer*, MY09 (5'-CGTCCMARRGGAWACTGATC-3') e MY11 (5'-CMCAGGGWCATAAAYAATGG-3'). As reações de amplificação foram realizadas em termociclador (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems) nas seguintes condições: ciclo inicial de desnaturação à 95°C por 4 minutos, seguidos de 35 ciclos intermediários de desnaturação à 94°C por 30 segundos, anelamento à 56°C por 30 segundos, extensão à 72°C por 30 segundos e ciclo de extensão final à 72°C por 8 minutos. Como controle da eficiência da extração do DNA e da reação de PCR foi amplificado um fragmento de 501 pb do gene da betaglobina, utilizando os *primers* Beta1 (5'-TCAACCCTACAGTCACCCAT-3') e Beta2 (5'-CTAACAATTACGAACAGCAATGAG-3'), sob as mesmas condições de PCR.

Cada solução com o produto de PCR foi submetida à digestão enzimática com as enzimas de restrição *Dde* I, *Hae* III, *Rsa* I, *Pst* I por 1 hora a 37°C de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen, São Paulo, Brasil). Os fragmentos de DNA foram identificados por eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, marcado com SYBR *Safe* e posteriormente purificados, empregando o kit *UltraClean PCR Clean-up* (MOBio, Carlsbad, EUA). A pureza dos produtos de PCR foi determinada por densidade ótica em espectrofotômetro (ND-1000 UV-Vis, Thermo Scientific).

Em seguida, o DNA das amostras foi sequenciado (ABI 3730 DNA Analyser, Applied Biosystems) e analisado, empregando os programas *Sequencing Analysis*[®], versão 5.3.1 e *Chromas Lite*[®], versão 2.01. As sequências foram então comparadas às disponíveis no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Análises estatísticas

O tratamento estatístico realizado nos resultados compreendeu a análise separadamente dos mais prevalentes tipos de HPV (HPVs 16, 18, 31, 33 e 35). A *odds ratio* (OR) de NIC 2, NIC 3 e câncer, com infecções simples ou múltiplos de HPV foram calculadas em comparação com o grupo NIC 1. A *odds ratio* (OR) e intervalos de confiança de 95% (IC) são relatadas através do texto e nas tabelas. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o Medical[®] versão 14.10.2 <http://www.medcalc.org/index.php>.

Aspectos éticos da pesquisa

O presente trabalho foi realizado após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Pernambuco (CAE: 0285.0.172.00-11).

Resultados

Um total de 211 amostras cervicais classificadas como NIC 1, NIC 2 e NIC 3 foram genotipadas usando PCR/RFLP. Um total de 42.7% (90/211) das amostras apresentaram uma única infecção por HPV, enquanto que 57,3% (121/211) apresentaram infecções múltiplas. Os genótipos mais comumente detectados foram HPV-16 (24.6% em infecções simples), HPV-18 (7.1% em infecções simples) e HPV-31 (6.6% em infecções simples) (Tabela 1).

Tabela 1. Diversidade de HPV como infecções simples e múltiplas.

Tipos de HPV	n	%
Infecção única (N=90)		
HPV-16	52	24.6
HPV-18	15	7.1
HPV-31	14	6.6
HPV-33	3	1.4
HPV-35	6	2.8
Infecção múltipla (N=121)		
HPV 16/11	13	6.2
HPV 16/18	5	2.4
HPV 16/18/11	4	1.9
HPV 16/18/31/11	1	0.5
HPV 16/18/31/33	2	0.9
HPV 16/18/33/6	1	0.5
HPV 16/18/6	2	0.9
HPV 16/31	4	1.9
HPV 16/31/11	1	0.5
HPV 16/31/35	1	0.5
HPV 16/31/6	5	2.4
HPV 16/31/6/11	1	0.5
HPV 16/33	1	0.5
HPV 16/33/35/11	1	0.5
HPV 16/33/6	2	0.9
HPV 16/35	2	0.9

HPV 16/35/11	1	0.5
HPV 16/35/6	2	0.9
HPV 16/6	24	11.4
HPV 16/6/11	1	0.5
HPV 18/11	7	3.5
HPV 18/31	3	1.4
HPV 18/31/35/6	1	0.5
HPV 18/31/6	2	0.9
HPV 18/33	2	0.9
HPV 18/33/11	1	0.5
HPV 18/6	6	2.8
HPV 18/6/11	1	0.5
HPV 31/11	4	1.9
HPV 31/33/11	1	0.5
HPV 31/33/6	3	1.4
HPV 31/35	2	0.9
HPV 31/36	8	3.8
HPV 33/11	4	1.9
HPV 33/6	2	0.9
Total	211	100

Foram também estratificadas as amostras cervicais de acordo com os achados histológicos e distribuição do tipo de HPV (Tabela 2).

Tabela 2. Distribuição dos tipos de HPV entre NIC 1, NIC 2, NIC 3 e câncer considerando infecções simples e múltiplas.

Tipos de HPV	n	%
NIC 1 e infecção única (N=27)		
HPV-16	13	48.1
HPV-18	3	11.1
HPV-31	6	22.2
HPV-33	1	3.7
HPV-35	4	14.8
NIC 1 e infecção múltipla (N=29)		
HPV 16/11	4	13.8
HPV 16/6	4	13.8
HPV 18/6	3	10.3
Dois tipos de HPV	10	34.4
Três tipos de HPV	7	24.1

Quatro tipos de HPV	1	3.4
NIC 2 e infecção única (N=12)		
HPV-16	6	50
HPV-18	3	25
HPV-31	2	16.7
HPV-33	1	8.3
NIC 2 e infecção múltipla (N=24)		
HPV 16/11	4	16.7
HPV 16/31	3	12.5
HPV 16/6	6	25
Dois tipos de HPV	7	29.2
Três tipos de HPV	2	8.3
Quatro tipos de HPV	2	8.3
NIC 3 e infecção única (N=37)		
HPV-16	24	64.9
HPV-18	8	21.6
HPV-31	3	8.1
HPV-33	1	2.7
HPV-35	1	2.7
NIC 3 e infecção múltipla (N=45)		
HPV 16/11	4	8.8
HPV 16/18	3	6.6
HPV 16/6	11	24.4
HPV 31/6	5	11.1
Dois tipos de HPV	7	15.5
Três tipos de HPV	12	26.6
Quatro tipos de HPV	3	6.6
Câncer e infecção única (N=14)		
HPV-16	9	64.2
HPV-18	1	7.1
HPV-31	3	21.4
HPV-35	1	7.1
Câncer e infecção múltipla (N=23)		
HPV 16/6	4	17.4
HPV 18/11	3	13
Dois tipos de HPV	10	43.5
Três tipos de HPV	6	26

Um total de 26.5% (56/211) das mulheres apresentaram NIC 1, em que HPV-16, HPV-31, HPV-35 e HPV-18 foram os quatro tipos mais frequentes em infecções simples, enquanto que HPV16/11, HPV16/6 e HPV18/6 foram mais frequentes em coinfeções.

HPV-16 e HPV-18 foram os dois genótipos mais frequentes encontrados em NIC 2 com infecção única por HPV, enquanto HPV16/6, HPV 16/11 e HPV 16/31 foram os genótipos mais prevalentes em NIC 2 com coinfeções.

Em relação a mulheres com diagnóstico de NIC 3, HPV-16, HPV-18, HPV-31 foram mais comumente detectados em infecção única pelo HPV, enquanto HPV 16/6, HPV 16/11 e HPV 16/18 foram as coinfeções mais frequentemente observadas neste grupo.

Um total de 17.5% (37/211) das mulheres apresentaram diagnóstico de câncer, em que HPV-16 e HPV-31 foram os dois genótipos mais frequentes em infecções simples, enquanto que HPV16/6 e HPV18/11 foram mais frequentes em coinfeções.

A infecção múltipla com HPV-16 apresenta 2.7 vezes maior risco de NIC 3 (OR=2.7; IC 95%: 1.04-7.16; $p=0.04$), embora isto não tenha sido observado nas mulheres com NIC 2 e câncer (Tabela 3). Múltiplas infecções por HPV com HPV-16 e excluindo os tipos HPV18/31 foram associados com NIC 3 (OR=3.64; IC 95%: 1.33-9.92; $p=0.01$) (Tabela 3).

Tabela 3. Distribuição das infecções simples e múltiplas por HPV em amostra cervicais NIC 1, NIC 2, NIC 3 e câncer. IU: Infecção única por HPV. IM: Infecção Múltipla por HPV. (*) *P*-value e ORs em comparação com NIC 1. (-) DNA de HPV não detectado. Negrito – estatisticamente significativo ($p < 0.05$).

	NIC 1	NIC 2	OR (95% CI) * <i>P</i> -value	NIC 3	OR (95% CI) * <i>P</i> -value	Câncer	OR (95% CI) * <i>P</i> -value
HPV-16 (IU)	13	6	1.08 (0.27 – 4.19) 0.91	24	1.99 (0.72 – 5.47) 0.18	9	1.93 (0.51 – 7.31) 0.32
HPV-16 (IM)	13	17	2.98 (0.95 – 9.39) 0.06	31	2.72 (1.04 – 7.16) 0.04	13	1.60 (0.53 – 4.81) 0.40
HPV-18 (IU)	3	3	2.22 (0.37 – 13.22) 0.38	8	1.90 (0.44 – 8.08) 0.38	1	0.51 (0.04 – 5.47) 0.58
HPV-18 (IM)	8	5	0.69 (0.19 – 2.47) 0.57	14	1.18 (0.42 – 3.32) 0.74	10	2.01 (0.63 – 6.43) 0.23
HPV-31 (IU)	6	2	0.57 (0.09 – 3.36) 0.53	3	0.25 (0.05 – 1.15) 0.07	3	0.77 (0.15 – 3.75) 0.74
HPV-31 (IM)	10	8	0.95 (0.30 – 2.97) 0.93	13	0.79 (0.29 – 2.17) 0.66	7	0.83 (0.25 – 2.68) 0.74
HPV-33 (IU)	1	1	2.70 (0.16 – 2.97) 0.93	1	1.75 (0.10 – 29.52) 0.69	-	-
HPV-35 (IU)	4	-	-	1	0.15 (0.01 – 1.51) 0.11	1	0.44 (0.04 – 4.38) 0.48
HPV-16 (IM) excluindo HPV18/31	9	10	1.98 (0.65 – 6.03) 0.22	21	3.64 (1.33 – 9.92) 0.01	8	0.83 (0.14 – 8.84) 0.22
HPV-31 (IM) excluindo HPV16/18	6	2	0.46 (0.08 – 2.56) 0.88	7	0.78 (0.23 – 2.62) 0.69	3	0.59 (0.13 – 2.67) 0.49
HPV-33 (IM) excluindo HPV16/31	3	3	1.04 (0.08 – 2.56) 0.88	2	1.04 (0.08 – 2.56) 0.88	1	0.43 (0.04 – 4.55) 0.88
HPV-33 (IM) excluindo HPV18/31	3	2	0.74 (0.12 – 5.14) 0.88	3	0.65 (0.12 – 3.52) 0.62	2	0.83 (0.12 – 5.47) 0.84

Na população estudada, também foram evidenciadas amostras portadoras de até quatro genótipos de HPV, nas quais em todas se identificou algum tipo viral oncogênico frequentemente associado a neoplasias de alto grau e carcinoma. O perfil de infecções pelo HPV em nossa população demonstra casos de infecções únicas e múltiplas não contempladas pelas vacinas atualmente disponíveis. A Figura 1 sumariza esse perfil de infecções com tipos virais cobertos e não cobertos pelas vacinas preventivas anti-HPV.

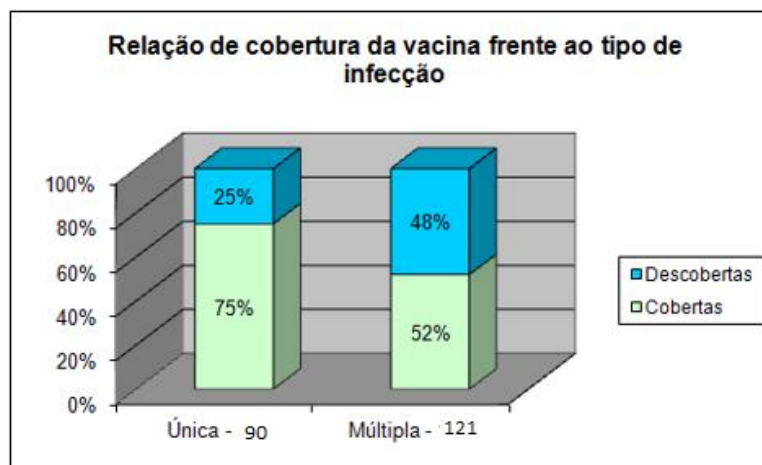


Figura 1. Quantidades relativas de tipos virais contemplados e não-contemplados pela vacinação preventiva anti-HPV em infecções únicas e múltiplas na população.

Discussão

Considerando a associação entre o câncer cervical e a infecção por HPV, o genótipo HPV-16 é o mais frequente em escala global, seguido pelo HPV-18, com raras exceções. O Brasil, com suas dimensões continentais e diversos fluxos populacionais, faz parte dessas exceções, onde o padrão de frequências de HPV de alto risco implicados em lesões cervicais de alto grau e carcinoma pode variar. Nosso estudo concentrou-se em mulheres residentes na Região Agreste do Estado de Pernambuco, a partir do qual obtivemos uma concordância com as estatísticas globais de maior prevalência para o HPV-16 (Fernandes *et al.*, 2008; Baldez da Silva *et al.*, 2009; Castro *et al.*, 2011; Veríssimo *et al.*, 2011; Baldez da Silva *et al.*, 2012; Gurgel *et al.*, 2013). No entanto, obedecendo ao perfil já descrito para a região metropolitana do Recife, o segundo genótipo mais prevalente foi o HPV-31, seguido pelo HPV-18.

O HPV pertence a um grupo heterogêneo de vírus de DNA, capazes de infectar pele e mucosa em diversas regiões do corpo humano (Castro *et al.*, 2009). Dentre os graus de lesão cervical nos quais o HPV pode ser implicado, a detecção do genótipo HPV-16 é largamente associada a achados citológicos condizentes com HSIL e carcinoma *in situ* (Broomall *et al.*, 2010). Nosso estudo concorda com a literatura anterior e refina o perfil de prevalência do HPV em cada atipia e em diferentes estágios de neoplasias intraepiteliais. Semelhantemente ao perfil de prevalência média mundial, em qualquer tipo de lesão cervical considerada, o HPV-16 foi

apontado como o mais encontrado em neoplasias cervicais de baixo e alto grau e carcinoma, independentemente se em infecção única ou múltipla.

É importante considerar que o advento de infecções múltiplas tem consequências significativas para o perfil de infecções por HPV que podem ser associadas aos diferentes graus de lesões cervicais. A ocorrência de infecções múltiplas parece ser muito mais comum do que o esperado. Pacientes com lesões genitais podem ser simultaneamente infectados por diversos tipos de HPV. Os genótipos HPV-6 e 11 raramente são associados a carcinoma invasivo de células escamosas (Gontijo *et al.*, 2007), de modo que sua detecção em NICs 1, 2 e 3 e carcinoma, em nossos dados, é majoritariamente atribuída a coinfeção com HPV de alto risco. Estudos anteriores apresentaram uma maior prevalência de coinfeções, envolvendo tipos de alto risco, para os tipos HPV-16 e 31 e HPV-16 e 33 (Baldez da Silva *et al.*, 2009), ou HPV-16 e 18 (Rousseau *et al.*, 2001). Embora nossos dados não forneçam uma prevalência significativamente específica para uma combinação de tipos em infecções múltiplas, um percentual significativo de infecções duplas (40,8%) e triplas (13,7%) suscita atenção quanto aos perfis de infecção por HPV associados ao risco câncer cervical numa população sob programas de vacinação HPV-específicos. Até o momento, não há um consenso se múltiplos tipos de HPV ocorrem ao acaso ou por meio de uma relação competitiva ou cooperativa. Vários estudos têm demonstrado que a infecção por múltiplos tipos de HPV ocorre mais frequentemente do que o previsto por acaso (Chaturvedi *et al.*, 2011; Dickson *et al.*, 2013; Dickson *et al.*, 2014). No presente trabalho, coinfeções com o HPV-16 apresentaram maior risco para abrigar lesões cervicais em relação a infecção única, onde múltipla infecção com este tipo viral apresentou maior risco de NIC 3.

As evidências mais atuais de testes de vacinação preventiva anti-HPV não indicam um evento claro de substituição de genótipos prevalentes e nem apresentam qualquer indício de proteção cruzada para os diversos genótipos de HPV filogeneticamente relacionados (Paavonen *et al.*, 2007; Paavonen *et al.*, 2009; Brown *et al.*, 2009; Herrero, 2009). Ainda, poucos estudos avaliaram interações sinérgicas entre tipos de HPV coinfectantes sobre o risco de doença cervical (Herrero *et al.*, 2005; Trottier *et al.*, 2006; Wentzensen *et al.*, 2009). Devido ao grande número de genótipos de HPV implicados em doença genital, o estudo epidemiológico de coinfeções por HPV e suas consequências exigem muito mais pesquisa. Estudos atuais já indicam que, em mulheres jovens, apesar de uma significativa maior frequência de múltiplos tipos de HPV, as combinações de genótipos coinfectantes é aleatória e, embora associada com

um risco aumentado de doença cervical, genótipos coinfectantes levam à doença cervical de modo independente (Chaturvedi *et al.*, 2011).

Nossos dados revelam ainda que cerca de 25% das infecções nas quais se isolou apenas um genótipo de HPV por amostra são atribuídas a tipos virais não contemplados na proteção elicitada pelas vacinas atualmente disponíveis. Esse percentual quase duplica (48%) se considerados os casos em que ocorrem infecções múltiplas na população-alvo deste estudo. Considerar a prevalência dos tipos de HPV a nível regional, tanto quanto em grupos de risco (idade, número de parceiros) pode ter grande influência em políticas de saúde pública e medidas de prevenção, incluindo vacinação em massa (Mendez *et al.*, 2005). Desse modo, a vacina preventiva anti-HPV quadrivalente, que cobre os tipos 6, 11, 16 e 18, pode apresentar impacto variável na prevenção do câncer cervical, a depender da população considerada.

Nossos achados devem ser interpretados no contexto do desenho do estudo. Apesar do foco de nossa pesquisa ser a prevalência do HPV, delineando um perfil específico de população, há muitas limitações. Primeiro, nosso grupo amostral pode não representar a população completa, uma vez que os pacientes estudados foram retirados de uma demanda para o diagnóstico de HPV antes de serem encaminhados ao nosso laboratório. Portanto, a tendência de seleção é possível já que as pacientes podem representar uma população de alto risco (e.g: previamente tratados para HPV, lesões genitais visíveis ou parceiros já diagnosticados com HPV). Ainda, nosso grupo amostral foi composto por um subconjunto da população brasileira com amplo acesso ao cuidado médico. Todas as pacientes eram atendidas pela rede privada de saúde. Finalmente, em nosso estudo, não foi possível delinear a epidemiologia da doença, incluindo aspectos de transmissão e potencial influência do contexto social e hábitos sexuais em relação à infecção por HPV, pela ausência de dados de acompanhamento de cada paciente.

Em conclusão, foi demonstrado que o genótipo mais comumente detectado nos casos de NIC 1, NIC 2 e NIC 3 e câncer cervical foi o HPV-16, em concordância com Freitas *et al.* (2012) e Pirog *et al.* (2014). Além disso, coinfeções com o HPV-16 apresentaram maior risco para abrigar lesões cervicais com maior risco de NIC 3. Estudos envolvendo os genótipos de HPV e o risco de desenvolvimento de câncer cervical devem ser levados em consideração quando da elaboração de programas de vacinação contra o HPV.

Referências

Almonte M, Sasieni P, Cuzick J. Incorporating human papillomavirus testing into cytological screening in the era of prophylactic vaccines. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. Amsterdam. v. 25, n. 5, p. 617-629, 2011.

Ayres ARG, Silva GA. Cervical HPV infection in Brazil: systematic review. *Rev Saúde Pub*. São Paulo. v. 44, n. 5, p. 1-11, 2010.

Baldez da Silva MF, Chagas BS, Guimarães V, Katz LMC, Felix PM, Miranda PM, Lima AA, Arraes LC, Martins DBG, Lima Filho JL, et al. HPV31 and HPV33 incidence in cervical samples from women in Recife, Brazil. *Genet Mol Res*. v. 8, p. 1437-1443, 2009.

Baldez da Silva MFPT, Guimarães V, Silva MAR, Amaral CMM, Beçak W, Stocco RC, Freitas AC, Crovella S. Frequency of human papillomavirus types 16, 18, 31, and 33 and sites of cervical lesions in gynecological patients from Recife, Brazil. *Genetics and Molecular Research*, v. 11. n. 1, p. 462-466, 2012.

Bernard HU. Gene expression of genital human papillomavirus and considerations on potential antiviral approaches. *Ant Ther*. v. 7, p. 219-237, 2002.

Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJ and Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol*. v. 55, p. 244-265, 2002.

Broomall EM, Reynolds SM, Jacobson RM. Epidemiology, Clinical Manifestations, and Recent Advances in Vaccination against Human Papillomavirus. *Clinical Features*. v. 122, n. 2, p. 121-129, 2010.

Brown DR, Kjaer SK, Sigurdsson K, Iversen OE, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, Perez G, Koutsky LA, Tay EH, et al. The impact of quadrivalent human papillomavirus (HPV; types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine on infection and disease due to oncogenic nonvaccine HPV types in generally HPV-naïve women aged 16-26 years. *J Infect Dis*. v. 1, n. 199, p. 926-35, 2009.

Castro MM, Farias IP, Borborema-Santos CM, Correia G, Astolfi-Filho S. Prevalence of human papillomavirus (HPV) type 16 variants and rare HPV types in the central Amazon region. *Genet Mol Res.* v. 10, p. 186-196, 2011.

Castro TMPPG, Filho IB, Nascimento VX, Xavier SD. HPV detection in the oral and genital mucosa of women with positive histopathological exam for genital HPV, by means of the PCR. *Braz J Otorhinolaryngol.* v. 75, n. 2, p. 167-71, 2009.

Cavalcanti SM, Frugulhetti IC, Passos MR, Fonseca MF and Oliveira LH. Prevalence of human papillomavirus DNA in female cervical lesions from Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz,* v. 89, p. 575-580, 1994.

Chaturvedi AK, Brinkman JA, Gaffga AM, Dumestre J, Clark RA, Braly PS, Dunlap K, Kissinger PJ and Hagensee ME. Distribution of human papillomavirus type 16 variants in human immunodeficiency virus type 1 -positive and -negative women. *J. Gen. Virol.* v. 85, p. 1237-1241, 2004.

Chaturvedi AK, Katki HA, Hildesheim A, Rodriguez AC, Quint W, Schiffman M, Van Doorn L-J, Porras C, Wacholder S, Gonzalez P, Sherman ME, Herrero R. Human Papillomavirus Infection with Multiple Types: Pattern of Coinfection and Risk of Cervical Disease. *Journal of Infectious Diseases,* v. 910, p. 203, 2011.

Dickson EL, Vogel RI, Bliss RL, Downs LS. Multiple-Type Human Papillomavirus (HPV) Infections: A Cross-Sectional Analysis of the Prevalence of Specific Types in 309,000 Women Referred for HPV Testing at the Time of Cervical Cytology. *Int. J. Gynecol. Cancer.* v. 23, p. 1295-1302, 2013.

Dickson EL, Vogel RI, Geller MA, Downs Jr. LS. Cervical cytology and multiple type HPV infection: A study of 8182 women ages 31–65. *Gynecol. Oncol.* v. 133, p. 405-408, 2014.

Eluf-Neto J, Booth M, Muñoz N, Bosch FX, Meijer CJLM and Walbooners JMM. Human papillomavirus and invasive cervical cancer in Brazil. *Brit. J. Cancer.* v. 69, p. 114-119, 1994.

Farid R, Zahra A, Khan K, Idrees M. Oncogenic potential of human papillomavirus (HPV) and its relation with cervical cancer. *Virology J. London*. v. 8, n. 1, p. 269-276, 2011.

Fernandes TAA, Meissner R, Bezerra LF, Azevedo PRM, Fernandes JV. Human papillomavirus infection in women attended at a cervical cancer screening service in Natal, Brazil. *Braz J Microbiol*. v. 39, p. 573-578, 2008.

Freitas AC, Gurgel APAD, Chagas BS, Coimbra EC, Amaral CMM. Susceptibility to cervical cancer: An overview. *Gynecol Oncol*. v. 126, p. 304-311, 2012.

Gargiulo F, de Francesco MA, Schreiber C, Ciravolo G, Salinaro F, Valloncini B, Manca N. Prevalence and distribution of single and multiple HPV infections in cytologically abnormal cervical samples from Italian women. *Virus Res. Amsterdam*. v. 125, n. 2, p. 176-182, 2007.

Gontijo RC, Derchain SFM, Roteli-Martins C, Bragança JF, Sarian LO, Morais SS, Maeda mys, Longatto-Filho A, Syrjänen KJ. 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. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, v. 133, n. 2, p. 239-246, 2007.

Gurgel APAD, Chagas BS, do Amaral CMM, Albuquerque EMB, Serra IGSS, Silva Neto J da C, et al. Prevalence and genetic variability in capsid L1 gene of rare human papillomaviruses (HPV) found in cervical lesions of women from North-East Brazil. *BioMed Res. Int*. v. 2013, p. 546354, 2013.

Herrero R. Human papillomavirus (HPV) vaccines: limited cross-protection against additional HPV types. *J. Infect. Dis*. v. 1; n. 199, p. 919-22, 2009.

Herrero R, Castle PE, Schiffman M, Bratti MC, Hildesheim A, Morales J, Alfaro M, Sherman ME, Wacholder S, Chen S, Rodriguez AC, Burk RD. Epidemiologic profile of type-specific human papillomavirus infection and cervical neoplasia in Guanacaste, Costa Rica. *J. Infect. Dis*. v. 191, n.11, p. 1796-807, 2005.

Lorenzato F, Ho L, Terry G, Singers A, Santos LC, de Lucena Batista R and Lubambo T. The use of human papillomavirus typing in detection of cervical neoplasia in Recife (Brazil). *Int J Gynecol Cancer*, v. 10, p. 143-150, 2000.

Mejlhede N, Bonde J, Fomsgaard A. High frequency of multiple HPV types in cervical specimens from Danish women. *APMIS*, v. 117, p. 108–114, 2009.

Mendez F, Muñoz N, Posso H, Molano M, Moreno V, Van Den Brule AJC, Ronderos M, Meijer C. Cervical Coinfection with Human Papillomavirus (HPV) Types and Possible Implications for the Prevention of Cervical Cancer by HPV Vaccines. *J Infect Dis*. v. 192, n. 7, p. 1158-1165, 2005.

Nakagawa JTT, Schirmer J, Barbieri M. Vírus HPV e câncer do colo do útero. *Rev Bras Enferm. Brasília*. v. 63, n. 2, p. 307-311, 2010.

Nielsen A, Kjaer SK, Munk C, Iftner T. Type-Specific HPV Infection and Multiple HPV Types: Prevalence and Risk Factor Profile in Nearly 12,000 Younger and Older Danish Women: *Sex. Transm. Dis*. v. 35, p. 276-282, 2008.

Noronha V, Mello W, Villa LL, Macedo R, Bisi F, Mota R, Sassamoto K, Monteiro T and Linhares A. Human papillomavirus associated with cervix lesions. *Rev. Soc. Bra. Med. Trop*. v. 32, p. 235-240, 1999.

Paavonen J, Jenkins D, Bosch FX, Naud P, Salmerón J, Wheeler CM, Chow SN, Apter DL, Kitchener HC, et al. Efficacy of a prophylactic adjuvanted bivalent L1 virus-like particle vaccine against infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: an interim analysis of a phase III double-blind, randomized trial. *The Lancet. London*. v. 369, n. 9580, p. 2161-2170, 2007.

Paavonen J, Naud P, Salmerón J, Wheeler CM, Chow SN, Apter D, Kitchener H, Castellsague X, Teixeira JC, Skinner SR, et al. Efficacy of human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by oncogenic HPV types

(PATRICIA): final analysis of a double-blind, randomised study in young women. *Lancet*. v. 374, n. 9686, p. 301-14. 2009.

Pirog EC, Lloveras B, Molijn A, et al. on behalf of the RIS HPV TT study group. HPV prevalence and genotypes in different histological subtypes of cervical adenocarcinoma, a worldwide analysis of 760 cases. *Mod. Pathol*. v. 55, 2014.

Rousseau MC, Pereira JS, Prado JCM, Villa LL, Rohan TE, Franco EL. Cervical Coinfection with Human Papillomavirus (HPV) Types as a Predictor of Acquisition and Persistence of HPV Infection. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 184, n. 12, p. 1508-1517, 2001.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2016. *CA Cancer J Clin*. v. 16, n.66, p. 7-30, 2016.

Trottier H, Mahmud S, Costa MC, Sobrinho JP, Duarte-Franco E, Rohan TE, Ferenczy A, Villa LL, Franco EL. Human papillomavirus infections with multiple types and risk of cervical neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. v. 15, n. 7, p. 1274-1280, 2006.

Veldhuijzen N, Snijders PJF, Reiss P, Meijer JLM, Van Wijgert JHHM. Factors affecting transmission of mucosal human papillomavirus. *The Lancet*. London. v. 10, n. 12, p. 862-874, 2010.

Veríssimo Fernandes J, de Vasconcellos Meissner R, Goretti Freire Carvalho M, Araújo de Medeiros Fernandes TA, Medeiros Azevedo PR, Weber Veríssimo de Azevedo J, et al. Human papillomavirus prevalence in women with normal cytology and with cervical cancer in Natal, Brazil. *Mol Med Rep*. 2011;4: 1321–1326.

Wentzensen N, Zuna RE, Sherman ME, Gold MA, Schiffman M, Dunn ST, Jeronimo J, Zhang R, Walker J, Wang SS. Accuracy of cervical specimens obtained for biomarker studies in women with CIN3. *Gynecol Oncol*. v. 115, n. 3, p. 493-6, 2009.

5.2 Estudo de associação entre a expressão das proteínas p16^{INK4a} e Ki-67 e o diagnóstico histopatológico em mulheres infectadas pelo Papilomavírus humano na Região Agreste de Pernambuco

Introdução

Estudos epidemiológicos relatam que a infecção cervical com Papilomavírus Humano (HPV) de alto risco é necessária, mas não suficiente para causar o desenvolvimento de câncer cervical, o qual é tido como o quarto tipo de câncer mais comum e a segunda maior causa de morte em mulheres por todo o mundo (Gargiulo *et al.*, 2007; Zur Hausen *et al.*, 2009; Arbyn *et al.*, 2011; Siegel *et al.*, 2016).

O câncer do colo do útero é uma doença de progressão lenta, sendo precedido por lesões precursoras denominadas neoplasias intraepiteliais cervicais (NICs). Tais lesões são classificadas como NIC 1, NIC 2 e NIC 3 de acordo com o grau de comprometimento epitelial e são caracterizadas pela perda gradual do controle da divisão celular (Steenbergen *et al.*, 2005).

O processo infeccioso tem início na penetração do HPV nas células em diferenciação, na camada basal do tecido epitelial da pele e mucosas, geralmente por via de microferimentos. Em seguida, uma sequência de eventos relacionados às funções vegetativas virais se instala, sendo promovida por determinados genes, localizados em regiões consideradas precoces e tardias, de acordo com o padrão de expressão dos genes virais (Brentjens *et al.*, 2002; Abu *et al.*, 2005).

O processo que leva ao desenvolvimento de uma lesão escamosa invasora parece estar relacionado à ação do HPV no genoma da célula através de uma permissividade do sistema imunológico (Sano *et al.*, 1998). Marcadores como o p16^{INK4a} e Ki-67 têm sido estudados com o intuito de identificar lesões com risco de evolução, uma vez que muitas lesões, em especial as de baixo risco, regredirão (Sano *et al.*, 1998; Virmani *et al.*, 2001; Giarre *et al.*, 2001).

A proteína celular p16^{INK4a}, um inibidor de quinase dependente de ciclina, foi demonstrada em diversos estudos como sendo fortemente superexpressa em quase todas as lesões precursoras de alto grau e em cânceres invasivos da cérvix uterina (Wentzensen & von Knebel, 2007 e Tsoumpou *et al.* 2009). A expressão dessa proteína reguladora do ciclo celular está diretamente relacionada com a atividade transformante da oncoproteína viral E7 de HPV de alto risco a nível molecular. Reconhecendo-se que a inativação prolongada da proteína supressora tumoral, pRb, pela oncoproteína E7 é necessária para a manutenção do fenótipo

maligno associado ao HPV em células cancerosas, a detecção da superexpressão de p16^{INK4A} pode ser útil como um marcador substituto altamente sensível e específico para a inativação de pRb em células epiteliais transformadas por HPV. Vários estudos têm avaliado a função de p16^{INK4A} como marcador diagnóstico de progressão de lesão cervical (Keating, 2001; Klaes *et al.*, 2001; Agoff, 2003; Wang, 2004; Kalof *et al.*, 2005; Lorenzato, 2005; Benevolo, 2006; Ozaki, 2011). Além disso, p16^{INK4A} é uma proteína supressora tumoral responsável pelo bloqueio do ciclo celular na fase G1 quando há anomalias no DNA, aparecendo de forma superexpressa nas displasias de alto grau e nos carcinomas cervicais (Klaes *et al.*, 2001).

Atualmente tem sido largamente empregado o uso de marcadores histológicos de proliferação para se averiguar a progressão bem como o nível de malignidade de diversos tipos de neoplasias, incluindo o câncer cervical (Kalof *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2007; Walts *et al.*, 2009). A proteína Ki-67 vem sendo considerada como um dos principais marcadores histológicos de proliferação, onde a avaliação de células positivas para Ki-67 no epitélio cervical pode ser utilizada para diferenciar graus de lesões cervicais, sendo considerada como ferramenta complementar ao diagnóstico histopatológico (Kruse *et al.*, 2001; Keating *et al.*, 2001; Middleton *et al.*, 2003; Buban *et al.*, 2009). A proteína Ki-67 está presente nas células durante todas as fases do ciclo celular (G1, S, G2 e mitose), sendo expressa no núcleo. Portanto, nas anomalias citológicas, como na infecção por HPV, pode ser utilizada como biomarcador auxiliando na investigação e prognóstico da doença (Brown & Gatter, 2002; Silva-Filho *et al.*, 2005).

Este estudo tem como objetivo realizar um estudo de associação entre os biomarcadores p16^{INK4A} e Ki-67 com diagnóstico histológico de NIC 1, NIC 2, NIC 3 e câncer em amostras cervicais de colo uterino positivas para HPV.

Metodologia

População investigada

O estudo compreendeu a análise de 211 casos de mulheres, com idade variando entre 19 e 72 anos (média de 42.5 anos), residentes na Região Agreste do Estado de Pernambuco, cujo diagnóstico para exames citológicos foi positivo para LSIL, HSIL ou carcinoma invasivo, sendo posteriormente submetidas à confirmação histológica (NIC-I, II, III, Carcinoma Escamoso e Adenocarcinoma), entre os anos de 2009 a 2010.

Os dados foram obtidos do arquivo de um laboratório privado localizado na cidade de Garanhuns. Os casos, nos quais, as mulheres conheciam ou foram submetidas à vacina contra HPV foram excluídos.

Aspectos éticos da pesquisa

O presente trabalho foi realizado após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Pernambuco (CAE: 0285.0.172.00-11).

Imunohistoquímica para p16^{INK4A} e Ki-67

A imunohistoquímica para as proteínas p16^{INK4A} e Ki-67 foi realizada através de amostras colhidas para biopsias e parafinadas contendo porções representativas do tumor. Foram realizados cortes de 4µm de espessura de blocos parafinados e foi utilizado o método avidina-biotina peroxidase. Os anticorpos utilizados foram monoclonais de rato contra a proteína anti-p16^{INK4A} (DAKO Cytomation, K5334, clone E6H4, diluição 1:25) e Ki-67 (Dako, code: N1633, Denmark; diluição 1:50). A recuperação antigênica foi realizada a 100°C por micro-ondas. As lâminas sofreram resfriamento a temperatura ambiente e a peroxidase endógena foi bloqueada por 7,5 minutos na solução bloqueadora de peroxidase. As lâminas foram incubadas com solução cromógena de diaminobenzidina (DAB), lavadas em água, contra-coradas em hematoxilina, desidratadas e montadas. A análise da imunoreatividade foi realizada através da detecção da proteína p16^{INK4A} no núcleo e citoplasma das células epiteliais e descritas utilizando os seguintes escores: Positivo (reatividade moderada a forte em mais de 10% das células epiteliais), Negativo (moderada ou forte reatividade em menos de 10% de células epiteliais).

Resultados

Um total de 211 amostras cervicais HPV positivas (56 amostras de NIC 1, 36 amostras de NIC 2, 82 amostras de NIC 3 e 37 amostras de câncer) foi analisado quanto a imunoreatividade dos marcadores p16 e Ki67. Nas tabelas 1 e 2 está apresentada a porcentagem de amostras apresentando forte expressão de p16 e Ki67 e o grau da neoplasia cervical, respectivamente.

Tabela 1. Expressão imunohistoquímica de p16^{INK4A} em 211 amostras (HPV positivas) de colo uterino.

Diagnóstico histopatológico	p16 positivo N (%)	p16 negativo N (%)
NIC 1*	31 (55.4%)	25 (44.6%)
NIC 2**	30 (83.3%)	6 (16.7%)
NIC 3***	80 (97.6%)	2 (2.44%)
Câncer	37 (100%)	-

*NIC 1: Neoplasia Intraepitelial Cervical 1.

**NIC 2: Neoplasia Intraepitelial Cervical 2.

***NIC 3: Neoplasia Intraepitelial Cervical 3.

Tabela 2. Expressão imunohistoquímica de Ki-67 em 211 amostras (HPV positivas) de colo uterino.

Diagnóstico histopatológico	Ki67 positivo N (%)	Ki67 negativo N (%)
NIC 1*	39 (69.6%)	17 (30.4%)
NIC 2**	30 (83.3%)	6 (16.7%)
NIC 3***	81 (98.8%)	1 (1.20%)
Câncer	37 (100%)	-

*NIC 1: Neoplasia Intraepitelial Cervical 1.

**NIC 2: Neoplasia Intraepitelial Cervical 2.

***NIC 3: Neoplasia Intraepitelial Cervical 3.

A expressão de p16 foi observada em todos os 37 casos de câncer (100%), em 80 dos 82 casos de NIC 3 (97.6%), em 30 dos 36 casos de NIC 2 (83.3%), bem como em 31 dos 56 casos de NIC 1 (55.4%) (Tabela 1). Já a expressão de Ki67 foi observada em todos os 37 casos de câncer (100%), em 81 dos 82 casos de NIC 3 (98.8%), em 30 dos 36 casos de NIC 2 (83.3%), bem como em 39 dos 56 casos de NIC 1 (69.6%) (Tabela 2).

Discussão

A expressão de p16^{INK4A} (p16 positivo) é altamente correlacionada à infecção pelo HPV, não apenas em lesões cervicais, mas também em carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço (Stephen *et al.*, 2013). Estudos vem apontando a subjetividade dos exames

morfológicos, questionando a histopatologia como padrão ouro, e isto pode levar a diagnóstico falso-positivo ou negativo (Klaes *et al.*, 2002). A proteína p16^{INK4A} constitui o marcador mais estudado para progressão da NIC e a determinação de sua expressão já foi utilizada para marcar pacientes de risco com biopsia negativa. Além disso, já foi demonstrado um aumento da expressão de p16^{INK4A} em lesões de alto grau tais como NIC 2 e NIC 3 (Klaes *et al.*, 2001). A triagem de resultados de testes de rastreamento negativos para o Papanicolau/ positivo para HPV com citologia baseada no biomarcador p16^{INK4A} pode identificar mulheres com alta probabilidade de apresentar neoplasia intraepitelial de alto grau e pode eficientemente complementar os programas de rastreamento baseados na pesquisa por infecção por HPV para prevenir o câncer cervical (Petry *et al.*, 2011). No presente estudo foi observado, de forma coerente com achados de outros estudos (Guimarães *et al.*, 2005; Branca *et al.*, 2004; Klaes *et al.*, 2002, Keating *et al.*, 2001), que a grande maioria dos casos de NIC 2, NIC 3 e câncer marcaram para p16, 83.3%, 97.6% e 100%, respectivamente. Com relação aos casos de NIC 1, nossos dados mostraram que 55.4% das amostras apresentaram positividade para p16^{INK4A}. Segundo Kalof *et al.* (2006), a expressão de p16 em amostras de NIC 1 pode estar relacionada à persistência da infecção pelo HPV. Condizente com a maior frequência de tipos de HPV oncogênicos implicados em neoplasias intraepiteliais de alto grau, a positividade para a expressão de p16^{INK4A} somente ocorreu em lesões nas quais se detectou HPV-16, 18, 31, 33 ou 35, seja em condições de infecção única ou múltipla.

Em relação à expressão de Ki-67, estudos apontam que a avaliação do número de células positivas para Ki-67 no epitélio representa uma ferramenta auxiliar para o diagnóstico das lesões cervicais, que pode ser utilizada para diferenciar as neoplasias cervicais de lesões cervicais benignas, além de distinguir os diferentes graus das lesões (Kruse *et al.*, 2001; Song *et al.*, 2007). Diversos estudos evidenciam que a expressão de Ki-67 está associada ao grau da gravidade das lesões cervicais (Kruse *et al.*, 2001; Lorenzato *et al.*, 2005; Walts *et al.*, 2009). No presente estudo foi verificado, de forma coerente com achados de outros estudos (Kruse *et al.*, 2001; Lorenzato *et al.*, 2005; Walts *et al.*, 2009), que a grande maioria dos casos de NIC 2, NIC 3 e câncer foi positivo para Ki-67.

Em conclusão, os resultados observados no presente trabalho confirmam a importância do uso dos marcadores p16^{INK4A} e Ki-67 na confirmação de diagnóstico de lesões intraepiteliais escamosas de alto grau (NIC 2 e NIC 3) e também na possível identificação de lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau (NIC 1) em associação com risco de progressão.

Referências

Abu J, Batuwangala M, Herbert K, Symonds P. Retinoic acid and retinoid receptors: potential chemopreventive and therapeutic role in cervical cancer. *The Lancet. London.* v. 6, n. 9, p. 712-720, 2005.

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.* v. 16, n. 7, p. 665-673, 2003.

Arbyn M, Castellsagué X, de Sanjosé S, Bruni L, Saraiya M, Bray F, et al. Worldwide burden of cervical cancer in 2008. *Ann Oncol.* 2011.

Benevolo M, Mottolese M, Marandino F, Vocaturo G, Sindico R, Piperno G, Mariani L, Sperduti I, Canalini P, Donnorso RP, Vocaturo A. Immunohistochemical expression of p16 (INK4a) is predictive of HR-HPV infection in cervical low-grade lesions. *Mod. Pathol.* v. 19, n. 3, p. 384-91, 2006.

Branca M, Ciotti M, Santini D, Di Bonito L, Giorgi C, Benedetto A, Paba P, Favalli C, Costa S, Agarossi A, Alderisio M, Syrjänen K. 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.* v. 23, n. 4, p. 354-365, 2004.

Brentjens MH, Yeung-yue KA, Lee PC, Tying SK Human papillomavirus: a review. *Dermatol Clin. Amsterdam.* v. 20, n. 2, p. 315-331, 2002.

Brown DC, Gatter KC. Ki67 protein: the immaculate deception? *Histopathology.* v. 40, n. 1, p. 2-11, 2002.

Bubán T, Tóth L, Tanyi M, Kappelmayer J, Antal-Szalmás P. Ki-67 - new faces of an old player. *Orv Hetil.* v. 150, n. 23, p.1059-1070, 2009.

Gargiulo F, de Francesco MA, Schreiber C, Ciravolo G, Salinaro F, Valloncini B, Manca N. Prevalence and distribution of single and multiple HPV infections in cytologically abnormal cervical samples from Italian women. *Virus Res. Amsterdam.* v. 125, n. 2, p. 176-182, 2007.

Giarre M, Caldiera S, Malanchi I, et al. Induction of pRb degradation by the Human papillomavirus type 16 E7 protein is essential to efficiently overcome p16INK4a - imposed G1 cell cycle arrest. *J. Virol.* v. 75, p. 4705-4712, 2001.

Guimarães MC, Gonçalves MA, Soares CP, Bettini JS, Duarte RA, Soares EG. Immunohistochemical expression of p16INK4a and bcl-2 according to HPV type and to the progression of cervical squamous intraepithelial lesions. *J. Histochem. Cytochem.* v. 53, n. 4, p. 509-516, 2005.

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.* v. 29, n. 5, p. 674-679. 2005.

Kalof AN, Cooper K. p16INK4a immunoexpression: surrogate marker of high-risk HPV and high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Adv. Anat. Pathol.* v. 13, n. 4, p. 190-194, 2006.

Keating JT, Cviko A, Riethdorf S, Riethdorf L, Quade BJ, Sun D, et al. Ki67, Cyclin E and p16^{INK4a} are complementary biomarkers for human papilloma virus – related cervical neoplasia. *Am. J. Pathol.* v. 25, p. 884-891, 2001.

Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U, Dallenbach-Hellweg G, Schmidt D, Von Knebel Doeberitz M. Overexpression of p16^(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int. J. Cancer. Bathesda.* v. 92, n. 1, p. 276-284, 2001.

Klaes R, Benner A, Friedrich T, Ridder R, Herrington S, Jenkins D, Kurman RJ, Schmidt D, Stoler M, von Knebel Doeberitz M. p16INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol.* v. 26, n. 11, p. 1389-99, 2002.

Kruse AJ, Baak JP, de Bruin PC, Jiwa M, Snijders WP, Boodt PJ, Fons G, Houben PW, The HS. Ki-67 immunoquantitation in cervical intraepithelial neoplasia (CIN): a sensitive marker for grading. *J. Pathol.* v. 193, n. 1, p. 48-54, 2001.

Lorenzato M, Caudroy S, Bronner C, Evrard G, Simon M, Durlach A, Birembaut P, Clavel C. Cell cycle and/or proliferation markers: what is the best method to discriminate cervical high-grade lesions? *Hum. Pathol.* v. 36, n. 10, p. 1101-1107, 2005.

Middleton K, Peh W, Southern S, Griffin H, Sotlar K, Nakahara T, El-Sherif A, Morris L, Seth R, Hibma M, Jenkins D, Lambert P, Coleman N, Doorbar J. Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers. *J. Virol.* v. 77, n. 19, p. 10186-10201, 2003.

Ozaki S, Zen Y, Inoue M. Biomarker expression in cervical intraepithelial neoplasia: potential progression predictive factors for low-grade lesions. *Hum. Pathol.* v. 42, n. 7, p. 1007-1012, 2011.

Petry KU, Schmidt D, Scherbring S, Luyten A, Reinecke-Lüthge A, Bergeron C, Kommos F, Löning T, Ordi J, Regauer S, Ridder R. Triaging Pap cytology negative, HPV positive cervical cancer screening results with p16/Ki-67 Dual-stained cytology. *Gynecol. Oncol.* v. 121, n. 3, p. 505-509, 2011.

Sano T, Oyama T, Kashiwabara K et al. Expression status of p16 protein is associated with Human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. *Am. J. Pathol.* v. 153, p. 1741-1747, 1998.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2016. *CA Cancer J Clin.* v. 16, n.66, p. 7-30, 2016.

Silva-Filho AL, Bruno BN, Silva LB, Traiman P, Silva JGC, Triginelli S A. Associação entre a expressão das proteínas p53 e Ki-67 e os achados clínicos-patológicos em pacientes com carcinoma invasor de colo uterino. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia.* v. 27, n. 5, p. 243-247, 2005.

Song SH, Park HM, Eom DW, Lee JK, Lee NW, Kim AR, Hur JY, Lee KW, Park YK, Saw HS. The expression of p16 (INK4a) and Ki-67 in relation to high-risk human papilloma viral load and residual disease after conization with positive margins. *Int. J. Gynecol. Cancer.* v. 17, n. 4, p. 858-867, 2007.

Steenbergen RDM, Wilde J, Wilting SM, Brink AATP, Snijders PJF and Meijer CJLM HPV-mediated transformation of the anogenital tract. *J. Clin. Virol.* v. 32, p. 25-33, 2005.

Stephen JK, Divine G, Chen KM, Chitale D, Havard S, Worsham MJ. Significance of p16 in Site-specific HPV Positive and HPV Negative Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Clin. Oncol.* v. 2, n. 1, p. 51-61, 2013.

Tsoumpou I, Arbyn M, Kyrgiou M, et al. p16INK4a immunostaining in cytological and histological specimens from the uterine cervix: a systematic review and metaanalysis. *Cancer Treatment. Rev.* v. 35, p. 210-220, 2009.

Virmani AK, Muller C, Rath A et al. Aberrant methylation during cervical carcinogenesis. *Clin. Cancer Res.* v. 7, p. 584-589, 2001.

Walters AE, Bose S. p16, Ki-67, and BD ProExC immunostaining: a practical approach for diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Hum. Pathol.* v. 40, n. 7, p. 957-964, 2009.

Wang JL, Zheng BY, Li XD, Angström T, Lindström MS, Wallin KL. Predictive significance of the alterations of p16INK4A, p14ARF, p53, and proliferating cell nuclear antigen expression in the progression of cervical cancer. *Clin. Cancer Res.* v. 10, n. 7, p. 2407-2414, 2004.

Wentzensen N, Von Knebel Doeberitz M. Biomarkers in cervical cancer screening. *Dis. Markers.* v. 23, p. 315-330, 2007.

Zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. *Virology.* v. 384, p. 260-265, 2009.

6. CONCLUSÃO

- O genótipo mais detectado nos casos de NIC 1, NIC 2, NIC 3 e câncer foi o HPV-16.
- Um total de 42.7% das amostras apresentou uma única infecção por HPV, enquanto que 57.3% foram infectadas com mais de um tipo de HPV. Os genótipos mais comumente detectados foram HPV-16, HPV-18 e HPV-31.
- Os casos que apresentaram os genótipos de baixo risco (HPV-6 e 11) estavam relacionados a infecções múltiplas.
- Os casos de NIC 1, NIC 2, NIC 3 e câncer nas infecções múltiplas, mostraram prevalência do genótipo HPV-16.
- As coinfeções com o HPV-16 apresentaram maior risco para abrigar lesões cervicais com maior risco de NIC 3.
- No presente estudo, a expressão de p16^{INK4A} apresentou forte correlação com a infecção pelo HPV mostrando-se importante marcador da progressão da neoplasia intraepitelial cervical com aumento significativo da expressão desta proteína em lesões de alto grau.
- Na grande maioria dos casos de NIC 2, NIC 3 e câncer, foi observada além da expressão da proteína p16^{INK4A} e os genótipos HPV-16, 18, 31, 33 ou 35.
- A expressão da Ki-67 foi observada na grande maioria dos casos de lesões de alto grau (NIC 2, NIC 3 e câncer).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU, J.; BATUWANGALA, M.; HERBERT, K.; SYMONDS, P. Retinoic acid and retinoid receptors: potential chemopreventive and therapeutic role in cervical cancer. *The Lancet*. London. v. 6, n. 9, p. 712-720, 2005.

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 Jul; 16(7):665-73.

Albets B, Johnson A, Walter P, et al. *Biologia Molecular da Célula*. 4a ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

ALMONTE, M.; SASIENI, P.; CUZICK, J. Incorporating human papillomavirus testing into cytological screening in the era of prophylactic vaccines. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. Amsterdam. v. 25, n. 5, p. 617-629, 2011.

ALTS Study Group. Results of a randomized trial on the management of cytology interpretations of atypical squamous cells of undetermined significance. *Am J Obstet Gynecol*. v. 188, p. 1383-1392, 2003.

ANDERSON, S.; WANGSA, D.; FLORES-STAINO, C.; SAFARI, H.; MINTS, M.; HJERPE, A.; HAGMAR, B.; JOHANSSON, B. Expression of p16^{INK4a} in relation to histopathology and viral load of “high-risk” HPV types in cervical neoplastic lesions. *Eur J Cancer*. Montrouge. v. 42, n. 16, p. 2815-2820, 2006.

ARBYN, M.; BERGERON, C.; KLINKHAMER, P.; MARTIN-HIRSCH, P.; SIEBERS, A. G.; BULTEN, J. Liquid compared with conventional cervical cytology: a systematic review and meta-analysis. *Obstet Gynecol*. New York. v. 111, n. 1, p. 167-177, 2008.

AYRES, A. R. G.; SILVA, G. A. Cervical HPV infection in Brazil: systematic review. *Rev Saúde Pub*. São Paulo. v. 44, n. 5, p. 1-11, 2010.

BAETEN, J. M.; DONNELL, D.; KAPIGA, S. H.; RONALD, A.; JOHN-STEWART, G.; INAMBAO, M.; MANONGI, R.; VWALIKA, B.; CELUM, C.; PARTNERS IN HSV/HIV TRANSMISSION STUDY TEAM. Male circumcision and risk male-to-female HIV-1 transmission: a multinational prospective study in Africa HIV-1-serodiscordant couples. *AIDS*. London. v. 24, n. 5, p. 737-744, 2010.

BALDEZ DA SILVA, M. F.; CHAGAS, B. S.; GUIMARÃES, V.; KATZ, L. M.; FELIZ, P. M.; MIRANDA, P. M.; LIMA, A. A.; ARRAES, L. C.; MARTINS, D. B.; LIMA FILHO, J. L.; STOCCO, R. C.; CROVELLA, S.; FREITAS, A. C.; BEÇAK, W. HPV31 and HPV33 incidence in cervical samples from women in Recife, Brazil. *Genet Mol Res*. Ribeirão Preto. v. 8, n. 4, p. 1437-1443, 2009.

BALDEZ DA SILVA MFPT, GUIMARÃES V, SILVA MAR, AMARAL CMM, BEÇAK W, STOCCO RC, FREITAS AC, CROVELLA S. Frequency of human papillomavirus types 16, 18, 31, and 33 and sites of lesions in gynecological patients from Recife, Brazil. *Genetics and Molecular Research*. v. 11, n. 1, p. 462-466, 2012.

BARATA, R. B. Scielo Saúde Pública: o desempenho dos cadernos de saúde pública e da revista de saúde pública. *Cad Saúde Pub*. Rio de Janeiro. v. 23, n. 12, p. 3031-3040, 2007.

BARRETO, C.L., MARTINS, D.B., DE LIMA FILHO, J.L., MAGALHÃES, V. Detection of Human Papillomavirus in biopsies of patients with cervical câncer, and its association with prognosis. *Arch Gynecol Obstet*. v. 288, n. 3, p. 643-648, 2013.

BENEVOLO M, MOTTOLESE M, MARANDINO F, VOCATURO G, SINDICO R, PIPERNO G, MARIANI L, SPERDUTI I, CANALINI P, DONNORSO RP, VOCATURO A. Immunohistochemical expression of p16(INK4a) is predictive of HR-HPV infection in cervical low-grade lesions. *Mod Pathol*. v. 19, n. 3, p. 384-391, 2006.

BONANNI, P.; BOCCALINI, S.; BECHINI, A. Efficacy, duration of immunity and cross protection after HPV vaccination: a review of evidence. *Vaccine*. Amsterdam. v. 27, n. 1, p. 46-53, 2009.

BRANCA M, CIOTTI M, SANTINI D, DI BONITO L, GIORGI C, BENEDETTO A, PABA P, FAVALLI C, COSTA S, AGAROSSO A, ALDERISIO M, SYRJÄNEN K. 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.* v. 23, n. 4, p. 354-365, 2004.

BRENTJENS, M.H.; YEUNG-YUE, K.A.; LEE, P.C.; TYRING, S.K. Human papillomavirus: a review. *Dermatol Clin. Amsterdam.* v. 20, n. 2, p. 315-331, 2002.

BROOMALL EM, REYNOLDS SM, JACOBSON RM. Epidemiology, Clinical Manifestations, and Recent Advances in Vaccination against Human Papillomavirus. *Clinical Features.* v. 122, n. 2, p. 121-129, 2010.

BROWN, D. R.; SHEW, M. L.; QADADRI, B.; NEPTUNE, N.; VARGAS, M.; TU, W.; JULIAR, B. E.; BREEN, T. E.; FORTEBERRY, J. D. A longitudinal study of genital human papillomavirus infection in a cohort of closely followed adolescent women. *J Infect Dis.* Chicago. v. 191, n. 2, p. 182-192, 2005.

BROWN DC, Gatter KC. Ki67 protein: the immaculate deception? *Histopathology.* v. 40, n. 1, p. 2-11, 2002.

BROWN DR, KJAER SK, SIGURDSSON K, IVERSEN OE, HERNANDEZ-AVILA M, WHEELER CM, PEREZ G, KOUTSKY LA, TAY EH, GARCIA P, AULT KA, GARLAND SM, LEODOLTER S, OLSSON SE, TANG GW, FERRIS DG, PAAVONEN J, STEBEN M, BOSCH FX, DILLNER J, JOURA EA, KURMAN RJ, MAJEWSKI S, MUÑOZ N, MYERS ER, VILLA LL, TADDEO FJ, ROBERTS C, TADESSE A, BRYAN J, LUPINACCI LC, GIACOLETTI KE, SINGS HL, JAMES M, HESLEY TM, BARR E. The impact of quadrivalent human papillomavirus (HPV; types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine on infection and disease due to oncogenic nonvaccine HPV types in generally HPV-naïve women aged 16-26 years. *J Infect Dis.* v. 199, n. 7, p. 926-935, 2009.

BUBAN T, TÓTH L, TANYI M, KAPPELMAYER J, ANTAL-SZALMÁS P. Ki-67 - new faces of an old player. *Orv Hetil.* v. 150, n. 23, p. 1059-1070, 2009.

BURCHELL, A. N.; WINNER, R. L.; DE SANJOSÉ, S.; FRANCO, E. L. Chapter 6: epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection. *Vaccine*. v. 24, n. 3, p. 52-61, 2006b.

BURD, E. M. Human papillomavirus detection and utility of testing. *Clin Microbiol Newsl*. Boston. v. 29, n. 21, p. 159-167, 2007.

BURKI, T. Is oral sex safe? *The Lancet*. v. 12, n. 3, p. 223, 2011.

CDC- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Sexually Transmitted Diseases treatment guidelines, 2010. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. Atlanta. v. 59, n. RR-12, p. 69-7, 2010.

CASTLE, P. E. How does tobacco smoke contribute to cervical carcinogenesis? *J Virol*. Washington. v. 82, n. 12, p. 6084-6086, 2008.

CASTLE, P. E.; JERONIMO, J.; SCHIFFMAN, M.; HERRERO, R.; RODRÍGUEZ, A. C.; BRATTI, M. C.; HILDESCHEIM, A.; WACHOLDER, S.; LONG, L. R.; NEVE, L.; PFEIFFER, R.; BURK, R. D. Age-related changes of the cervix influence human papillomavirus type distribution. *Cancer Res*. Baltimore. v. 66, n. 2, p. 1218-1224, 2006.

CASTLE, P. E.; SHIELDS, T.; KIMBAUER, R.; MANOS, M. M.; BURK, R. D.; GLASS, A. G.; SCOTT, D. R.; SHERMAN, D. E.; SCHIFFMAN, M. Sexual behavior, human papillomavirus type 16 (HPV 16) infection and HPV 16 seropositivity. *Sex Transm Dis*. Philadelphia. v. 29, n. 3, p. 182-187, 2002.

CASTRO MM, FARIAS IP, BORBOREMA-SANTOS CM, CORREIA G, ASTOLFI-FILHO S. Prevalence of human papillomavirus (HPV) type 16 variants and rare HPV types in the central Amazon region. *Genet Mol Res*. v. 10, p. 186-196, 2011.

CARVALHO, M.O.O.; CARESTIATO, F.N.; PERDIGÃO, P.H.; XAVIER, M.P.P.T.; SILVA, K.C.; BOTELHO, M.O.; OLIVEIRA, L.H.S.; CAVALCANTI, S.M.B. Human papillomavirus

infection in Rio de Janeiro, Brazil: a retrospective study. *Braz J Infect Dis*. Salvador. v. 5, p. 398-404, 2005.

CASTRO TMPPG, FILHO IB, NASCIMENTO VX, XAVIER SD. HPV detection in the oral and genital mucosa of women with positive histopathological exam for genital HPV, by means of the PCR. *Braz J Otorhinolaryngol*. v.75, n. 2, p. 167-171, 2009.

CHAGAS, B. S.; BATISTA, M. V. A.; GUIMARÃES, V.; BALBINO, V. Q.; CROVELLA, S.; FREITAS, M. C. New variants of E6 and E7 oncogenes of human papillomavirus type 31 indentified in northeastern Brazil. *Gynecol Oncol*. v. 123, n. 2, p. 284-288, 2011.

CHAGAS BS, COMAR M, GURGEL AP, PAIVA S, SERACENI S, DE FREITAS AC, CROVELLA S. Association Study between Cervical Lesions and Single or Multiple Vaccine-Target and Non-Vaccine Target Human Papillomavirus (HPV) Types in Women from Northeastern Brazil. *PLoS One*. v. 10, n. 7, p. e0132570, 2015.

CHATURVEDI AK, KATKI HA, HILDESHEIM A, RODRIGUEZ AC, QUINT W, SCHIFFMAN M, VAN DOORN L-J, PORRAS C, WACHOLDER S, GONZALEZ P, SHERMAN ME, HERRERO R. Human Papillomavirus Infection with Multiple Types: Pattern of Coinfection and Risk of Cervical Disease. *Journal of Infectious Diseases*. v. 910, p. 203, 2011.

CHEN, X. S.; GARCEA, R. L.; GOLDBERG, I.; CASINI, G.; HARRISON, S. C. Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16. *Mol Cell*. v. 5, n. 3, p. 557-567, 2000.

CLIFFORD, G.; FRANCESCHI, S.; DIAZ, M.; MUÑOZ, N.; VILLA, L. L. Chapter 3: HPV type-distribution in women with and without cervical neoplastic diseases. *Vaccine*. v. 24, n. 3, p. 26-34, 2006.

COGLIANO, V.; BAAN, R.; STRAIF, K.; GROSSE, Y.; SECRETAN, B.; EL GHISSASSI, F.; WHO INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Carcinogenicity of human papillomaviruses. *Lancet Oncol*. v. 6, n. 4, p. 204, 2005.

CORTEZZI, S. S.; PROVAZZI, R. J.; SOBRINHO, J. S.; MANN-PRADO, J. C.; REIS, P. M.; DE FREITAS, S. E.; FILHO, J. F.; FUKUYAMA, E. E.; CORDEIRO, J. A.; CURY, P. M.; MANIGLIA, J. V.; VILLA, L. L.; TAJARA, E. H.; RAHAL, P. Analysis of human papillomavirus prevalence and TP53 polymorphism in head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Genet Cygenet.* v. 150, n. 1, p. 44-49, 2004.

CUZICK, J.; ARBYN, M.; SANKARANARAYANAN, R.; TSU, V.; RONCO, G.; MAYRAND, M-H.; DILLNER, J.; MEIJER, C.J.L.M. Overview of human papillomavirus-based and other novel options for cervical cancer screening in developed and developing countries. *Vaccine.* v. 26, n. 10, p. 29-41, 2008.

DEMATHE, A.; BERNABÉ, D. G.; GARCIA, J. F.; NUNES, C. M.; MIYAHARA, G. I. Comparação entre dois métodos de detecção de DNA de papilomavírus humano em carcinoma epidermoide de lábio. *J Bras Patol Med Lab.* v. 46, n. 2, p. 85-90, 2010.

DE SANJOSE, S.; DIAZ, M.; CASTELLSAGUE, X.; CLIFFORD, G.; BRUNI, L.; MUÑOZ, N.; BOSCH, F. X. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* v. 7, n. 7, p. 453-459, 2007.

De VILLER, E-M.; FAUQUET, C.; BROKER, T. R.; BERNARD, H-U.; ZUR HAUSEN, H. Classification of papillomaviruses. *Virology.* v. 324, n. 1, p. 17-27, 2004.

DE VUYST, H.; CLIFFORD, G. M.; NASCIMENTO, M. C.; MADALENA, M. M.; FRANCESCHI, S. Prevalence and type distribution of human papillomavirus in carcinoma and intraepithelial neoplasia of the vulva, vagina and anus: a meta-analysis. *Int J Cancer.* v. 124, n. 7, p. 1626-1636, 2009.

DE VUYST, H.; LILLO, F.; BROUNET, N.; SMITH, J. S. HIV human papillomavirus, and cervical neoplasia and cancer in the era of highly active antiretroviral therapy. *Eur J Cancer Prev.* v. 17, n. 6, p. 545-554, 2008.

DICKSON EL, VOGEL RI, BLISS RL, DOWNS LS. Multiple-Type Human Papillomavirus (HPV) Infections: A Cross-Sectional Analysis of the Prevalence of Specific Types in 309,000 Women Referred for HPV Testing at the Time of Cervical Cytology. *Int J Gynecol Cancer*. v. 23, p. 1295-1302, 2013.

DICKSON EL, VOGEL RI, GELLER MA, DOWNS JR. LS. Cervical cytology and multiple type HPV infection: A study of 8182 women ages 31–65. *Gynecol Oncol*. v. 133, p. 405-408, 2014.

DOORBAR, J. The papillomaviruses life cycle. *J Clin Virol*. v. 32, n. 1, p. 7-15, 2005.

DUNE, E. F.; NIELSON, C. M.; STONE, K. M.; MARKOWITZ, L. E.; GIULIANO, A. R. Prevalence of HPV infection among men: a systemayic review of the literature. *J Infect Dis*. v. 194, n. 8, p. 1044-1057, 2006.

EKLUND, C.; UNGER, E. R.; NARDELLI-HAEFLIGER, D.; ZHOU, T.; DILLNER, J. International collaborative proficiency study of human papillomavirus type 16 serology. *Vaccine*. v. 30, n. 2, p. 294-299, 2012.

FARID, R.; ZAHRA, A.; KHAN, K.; IDREES, M. Oncogenic potential of human papillomonavirus (HPV) and its relation with cervical cancer. *Virology J*. v. 8, n. 1, p. 269-276, 2011.

FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MARILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L. A. (Ed.). VIIIth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. 1st. ed. San Diego: Academic Press, 2005, 1162p.

FERNANDES, J. V.; MEISSNER, R. V.; CARVALHO, M. G. F.; FERNANDES, T. A. A. M.; AZEVEDO, P. R. M.; VILLA, L. L. Prevalence of HPV infection by cervical cytologic status in Brazil. *Int J Gynaecol Obstet*. v. 105, n. 1, p. 21-24, 2009.

FERNANDES TAA DE M, MEISSNER R DE V, BEZERRA LF, AZEVEDO PRM DE, FERNANDES JV. Human papillomavirus infection in women attended at a cervical cancer screening service in Natal, Brazil. *Braz J Microbiol.* v. 39, p. 573-578, 2008.

FUKUCHI, E.; SAWAYA, G. F.; CHIRENJE, M.; MAQUIRE, T.; TUVESON, J.; MA, Y.; SHIBOSKI, S.; DA COSTA, M.; PALEFSKY, J.; MOSCICKI, A. B.; MAKUNIKE-MUTASA, R.; CHIPATO, T.; SMITH-McCUNE, K. K. Cervical human papillomavirus incidence and persistence in a cohort of HIV-negative women in Zimbabwe. *Sex Transm Dis.* v. 36, n. 5, p. 305-311, 2009.

GARGIULIO, F.; DE FRANCESCO, M. A.; SCHREIBER, C.; CIRAVOLO, G.; SALINARO, F.; VALLONCINI, B.; MANCA, N. Prevalence and distribution of single and multiple HPV infections in cytologically abnormal cervical samples from Italian women. *Virus Res.* v. 125, n. 2, p. 176-182, 2007.

GIARRE, M.; CALDEIRA, S.; MALANCHI, I.; CICCOLINNI, F.; LEÃO, M. J.; TOMMASINO, M. Induction of pRb degradation by the human papillomavirus type 16 E7 protein is essential to efficiently overcome p16INK4a-imposed G1 cell cycle arrest. *J Virol.* v. 75, n. 10, p. 4705-4712, 2001.

GILLISON, M. L.; KOCH, W. M.; CAPONE, R. B.; SPAFFORD, M.; WESTRA, W. H.; WU, L.; ZAHURAK, M. L.; DANIEL, R. W.; VIGLIONE, M.; SYMER, D. E.; SHAH, K. V.; SIDRANSKY, D. Evidence for a casual association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst.* v. 92, n. 9, p. 709-720, 2000.

GIOVANELLI, L.; LAMA, A.; CAPRA, G.; GIORDANO, V.; ARICÒ, P.; AMMATUNA, P. Detection of human papillomavirus DNA in cervical samples: analysis of the new PGMY-PCR compared to the hybrid capture II and MY-PCR assays and a two-step nested PCR assay. *J Clin Microbiol.* v. 42, n. 8, p. 861-864, 2004.

GONTIJO RC, DERCHAIN SFM ROTELI-MARTINS C, BRAGANÇA JF, SARIAN LO, MORAIS SS, MAEDA MYS, LONGATTO-FILHO A, SYRJÄNEN KJ. 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. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*; v. 133, n. 2, p. 239-246, 2007.

GUIMARÃES MC, GONÇALVES MA, SOARES CP, BETTINI JS, DUARTE RA, SOARES EG. Immunohistochemical expression of p16INK4a and bcl-2 according to HPV type and to the progression of cervical squamous intraepithelial lesions. *J Histochem Cytochem*. v. 53, n. 4, p. 509-516, 2005.

GRINSZTEJN, B.; VELOSO, V. G.; LEVI, J. E.; VELASQUE, L.; LUZ, P. M.; FRIEDMAN, R. K.; ANDRADE, A. C.; MOREIRA, R. I.; RUSSOMANO, F.; PILOTTO, J. H.; BASTOS, F. I.; PALEFSKY, J. Factors associated with increased prevalence of human papillomavirus infection in a cohort of HIV-infected Brazilian women. *Int J Infect Dis*. v. 13, n. 1, p. 72-80, 2009.

GURGEL APAD, CHAGAS BS, DO AMARAL CMM, ALBUQUERQUE EMB, SERRA IGSS, SILVA NETO J DA C, et al. Prevalence and genetic variability in capsid L1 gene of rare human papillomaviruses (HPV) found in cervical lesions of women from North-East Brazil. *BioMed Res Int*. v. 2013, p. 546354, 2013.

HARPER, D. M.; FRANCO, E. L.; WHEELER, C. M.; MOSCICKI, A. B.; ROMANOWSKI, B.; ROTELI-MARTINS, C. M.; JENKINS, D.; SCHUIND, A. COSTA CLEMENS, S. A.; DUBIN, G. Sustained efficacy up to 4-5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomized control. *The Lancet*. v. 367, n. 9518, p. 1247-1255, 2006.

HEIDERMAN, D. A. M.; WATERBOER, T.; PAWLITA, M.; VAN DIEMEN, P. D.; INDI, I.; LEIJTE, J. A.; Human papillomavirus-16 is the predominant type etiopathologically involved in penile squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol*. v. 25, n. 29, p. 4550-4555, 2007.

HERRERO R. Human papillomavirus (HPV) vaccines: limited cross-protection against additional HPV types. *J Infect Dis*. v. 199, n. 7, p. 919-922, 2009.

HERRERO R, CASTLE PE, SCHIFFMAN M, BRATTI MC, HILDESHEIM A, MORALES J, ALFARO M, SHERMAN ME, WACHOLDER S, CHEN S, RODRIGUEZ AC, BURK RD.

Epidemiologic profile of type-specific human papillomavirus infection and cervical neoplasia in Guanacaste, Costa Rica. *J Infect Dis.* v. 191, n. 11, p. 1796-807, 2005.

HIBBITTS, S.; RIECK, G. C.; HART, K.; POWELL, N. G.; BEUKENHOLDT, R.; DALLIMORE, N.; McREA, J.; HAUKE, A.; TRISTRAM, A.; FIANDER, A. N. Human papillomavirus infection: an anonymous prevalence study in South Wales, UK. *Br J Cancer.* v. 95, n. 2, p. 226-232, 2006.

HILDESCHEIM, A.; WANG, S. S. Host and viral genetics and risk of cervical cancer: a review. *Virus Res.* v. 89, n. 2, p. 229-240, 2002.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pernambuco. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=pe&tema=resultuniverso_censode2010>. acesso em 08 jun 2015.

INCA- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Disponível em <<http://www.inca.gov.br>>. Acesso em 05 jul 2015.

JEMAL A, BRAY F, CENTER MM, FERLAY J, WARD E, FORMAN D. Global cancer statistics. *CA Cancer Journalfor Clinicians.* v. 61, n. 2, p. 69-90, 2011.

JENKINS, D. A review of cross-protection against oncogenic HPV by an HPV-16/18 AS04-adjuvanted cervical cancer vaccine: importance of virological and clinical endpoints and implications for mass vaccination in cervical cancer prevention. *Ginecol Oncol.* v. 110, n. 3, p. 18-25, 2008.

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.* v. 29, n. 5, p. 674-679, 2005.

KALOF AN, COOPER K. p16INK4a immunoexpression: surrogate marker of high-risk HPV and high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Adv Anat Pathol.* v. 13, n. 4, p. 190-194, 2006.

KEATING JT, CVIKO A, RIETHDORF S, RIETHDORF L, QUADE BJ, SUN D, et al. Ki67, Cyclin E and p16^{INK4a} are complementary biomarkers for human papilloma virus – related cervical neoplasia. *Am J Pathol.* v. 25, n. 884-891, 2001.

KLAES, R.; FRIEDRICH, T.; SPITKOVSKY, D.; RIDDER, R.; RUDY, W.; PETRY, U.; DALLENBACH-HELLWEG, G.; SCHMIDT, D.; VON KNEBEL DOEBERITZ, M. Overexpression of p16^(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer.* v. 92, n. 1, p. 276-284, 2001.

KLAES R, BENNER A, FRIEDRICH T, RIDDER R, HERRINGTON S, JENKINS D, KURMAN RJ, SCHMIDT D, STOLER M, VON KNEBEL DOEBERITZ M. p16INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol.* v. 26, n. 11, p. 1389-1399, 2002.

KOSHIOL, J.; LINDSAY, L.; PIMENTA, J. M.; POOLE, C.; JENKINS, D.; SMITH, J. S. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia: a systematic review and meta-analysis. *Am J Epidemiol.* v. 168, n. 2, p. 123-137, 2008.

KRUSE AJ, BAAK JP, DE BRUIN PC, JIWA M, SNIJDERS WP, BOODT PJ, FONS G, HOUBEN PW, THE HS. Ki-67 immunoquantitation in cervical intraepithelial neoplasia (CIN): a sensitive marker for grading. *J Pathol.* v. 193, n. 1, p. 48-54, 2001.

LEGGATT, G. R.; FRAZER, I. H. HPV vaccines: the beginning of the end for cervical cancer. *Curr Opin Immunol.* v. 19, n. 2, p. 232-238, 2007.

LEVI, J. E.; KLETER, B.; QUINT, W. G. V.; FINK, M. C. S.; CANTO, C. L. M.; MATSUBARA, R.; LINHARES, I.; SEGURADO, A.; VANDERBORGHT, B.; ELUF NETO, J.; VAN DOORN, L-J. High prevalence of human papillomavirus (HPV) infections and high frequency of multiple HPV genotypes in human immunodeficiency virus-infected women in Brazil. *J Clin Microbiol.* V. 40, n. 9, p. 3341-3345, 2002.

LETO, M.G.P.; SANTOS JUNIOR, G.F.; PORRO, A.M.; TOMIMORI, J. Human papillomavirus infection: etiopathogenesis, molecular biology and clinical manifestations. *An Bras Dermatol.* v. 86, n. 2, p. 306-317, 2011.

LIE. A. K.; KRISTENSEN, G. Human papillomavirus E6/E7 mRNA testing as a predictive marker for cervical carcinoma. *Expert Rev Mol Diagn.* v. 8, n. 4, p. 405-415, 2008.

LIZANO, M.; BERUMEN, J.; GARCÍA-CARRANCÁ, A. HPV-related carcinogenesis: basic concepts, viral types and variants. *Arch Med Res.* v. 40, n. 6, p. 428-434, 2009.

LORENZATO, F.; HO, L.; TERRY, G.; SINGER, A.; SANTOS, L. C.; DE LUCENA BATISTA, R. LUBAMBO, T. The use of human papillomavirus typing in detection of cervical neoplasia in Recife (Brazil). *Int J Gynecol Cancer.* v. 10, n. 2, p. 143-150, 2000.

LORENZATO M, CAUDROY S, BRONNER C, EVRARD G, SIMON M, DURLACH A, BIREMBAUT P, CLAVEL C. Cell cycle and/or proliferation markers: what is the best method to discriminate cervical high-grade lesions? *Hum Pathol.* v. 36, n. 10, p. 1101-1107, 2005.

MARTINS, L.F.L.; THULER, L.C.S.; VALENTE, J.G. Cobertura do exame de Papanicolaou no Brasil e seus fatores determinantes: uma revisão sistemática da literatura. *Rev Bras Ginecol Obstet.* v. 27, n. 8, p.485-492, 2005.

MARKS, M.; GRAVITT, P. E.; GUPTA, S. B.; LIAW, K. L.; TADESSE, A.; KIM, E.; PHONGNARISORN, C.; WOOTIPOOM, V.; YUENYAO, P.; VIPUPINYO, C.; SRIPLIENCHAN, S.; CELENTANO, D. D. Combined oral contraceptive use increases HPV persistence but not new HPV detection in a cohort of women in Thailand. *J Infect Dis.* v. 204, n. 10, p. 1505-1513, 2011.

MENDEZ, F.; MUÑOZ, N.; POSSO, H.; MOLANO, M.; MORENO, V.; VAN DEN BRULE, A.J.C.; RONDEROS, M.; MEIJER, C. Cervical Coinfection with Human Papillomavirus (HPV) Types and Possible Implications for the Prevention of Cervical Cancer by HPV Vaccines. *J Infect Dis.* v. 192, n. 7, p. 1158-1165, 2005.

MEYSKENS Jr, F. L.; GRAHAM, V.; CHVAPIL, M. outros. A phase I Trial of beta-all-trans-retinoic acid delivered via a collagen sponge and a cervical cap for mild or moderate intraepithelial cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst.* v. 71, n. 5, p. 921-925, 1983.

MIDDLETON, K.; PEH, W.; SOUTHERN, S.; GRIFFIN, H.; SOTLAR, K.; NAKAHARA, T.; EL-SHERIF, A.; MORRIS, L.; SETH, R.; HIBMA, M.; JENKINS, D.; LAMBERT, P.; COLEMAN, N.; DOORBAR, J. Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers. *J Virol.* v. 77, n. 19, p. 10186-10201, 2003.

MOSCICKI, A-B. HPV-associated cancers: it's not all about the cervix. *Prev Med.* v. 53, n. 1, p. 3-4, 2011.

MUÑOZ, N.; BOSCH, F.X.; DE SANJOSÉ, S.; HERRERO, R., CASTELLSAGUÉ, X.; SHAH, K.V. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* v. 348, n. 6, p. 518-527, 2003.

MUÑOZ, N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J Clin Virol.* v. 19, n. 1-2, p. 1-5, 2000.

MYERS, E. R.; McCrory, D. C.; NANDA, K.; BASTIAN, L.; MATCHAR, D. B. Mathematical model for the natural history of human papillomavirus infection and cervical carcinogenesis. *Am J Epidemiol.* v. 151, n. 12, p. 1158-1171, 2000.

NAGPAL, J. K.; PATNAIK, S.; DAS, B. R. Prevalence of high-risk human papilloma virus types and its association with p53 codon 72 polymorphism in tobacco addicted oral squamous cell carcinoma (OCSS) patients of Eastern Indian. *Int J Cancer.* v. 97, n. 5, p. 649-653, 2002.

NAKAGAWA, J. T. T.; SCHIRMER, J.; BARBIERI, M. Vírus HPV e cancer do colo do útero. *Rev Bras Enferm.* v. 63, n. 2, p. 307-311, 2010.

NISHINO, H. T.; TAMBOURET, R. H.; WILBUR, D. C. Testing for human papillomavirus in cervical cancer screening. *Cancer Cytology.* v. 119, n. 4, p. 219-227, 2011.

NOAD, R.; ROY, P. Virus-like particles as immunogens. *Trends Microbiol.* v. 11, n. 9, p. 438-444, 2003.

NOBRE, R. J.; ALMEIDA, L. P.; MARTINS, T. C. Complete genotyping of mucosal human papillomavirus using a restriction fragment length polymorphism analysis and an original typing algorithm. *J Clin Virol.* v. 42, n. 1, p. 13-21, 2008.

NONNENMACHERA, B.; BREITENBACHA, V.; VILLAB, L. L.; PROLLAC, J. C.; BOZZETTIC, M. C. Identificação do papilomavírus humano por biologia molecular em mulheres assintomáticas. *Rev Saúde Pub.* v. 36, n. 1, p. 95-100, 2002.

OLIVEIRA, L. H. S.; SANTOS, L. S.; AUGUSTO, E. F.; NEVES, F. P. G. Identification of human papillomavirus type 53 L1, E6 and E7 variants in isolates from Brazilian women. *Infect Genet Evol.* v. 12, n. 1, p. 71-76, 2012.

OLIVEIRA, M. C.; SOARES, R. C.; PINTO, L. P.; COSTA, A. L. L. HPV e carcinogênese oral: revisão bibliográfica. *Rev Bras Otorrinolaringol.* v. 69, n. 4, p. 553-559, 2003.

ONON, T.S. History of human papillomavirus, warts and cancer: what do we know today? *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* Amsterdam. v. 25, n. 5, p. 565-574, 2011.

Ordi J, Garcia S, del Pino M, Landolfi S. p16 INK4a immunostaining identifies occult CIN lesions in HPV-positive women. *J Gynecol Pathol.* v. 28, n. 1, p. 90-97, 2009.

OZAKI S, ZEN Y, INOUE M. Biomarker expression in cervical intraepithelial neoplasia: potential progression predictive factors for low-grade lesions. *Hum Pathol.* v. 42, n. 7, p. 1007-1012, 2011.

PAAVONEN, J.; JENKINS, D.; BOSCH, F. X.; NAUD, P.; SALMERÓN, J.; WHEELER, C. M.; CHOW, S. N.; APTER, D. L.; KITCHENER, H. C.; CASTELLSAQUE, X.; DE CARVALHO, N. S.; SKINNER, S. R.; HARPER, D. M.; HEDRICK, J. A.; JAISAMRARN, U.; LIMSON, G. A.; DIONNE, M.; QUINT, W.; SPIESSENS, B.; PEETERS, P.; STRUYF, F.; WIETING, S. L.; LEHTINEN, M. O.; DUBIN, G.; HPV PATRICIA STUDY GROUP. Efficacy of a prophylactic adjuvanted bivalent L1 virus-like particle vaccine against infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: an interim analysis of a phase III double-blind, randomized trial. *The Lancet.* v. 369, n. 9580, p. 2161-2170, 2007.

PAAVONEN J, NAUD P, SALMERÓN J, WHEELER CM, CHOW SN, APTER D, KITCHENER H, CASTELLSAGUE X, TEIXEIRA JC, SKINNER SR, HEDRICK J, JAISAMRARN U, LIMSON G, GARLAND S, SZAREWSKI A, ROMANOWSKI B, AOKI FY, SCHWARZ TF, POPPE WA, BOSCH FX, JENKINS D, HARDT K, ZAHAF T, DESCAMPS D, STRUYF F, LEHTINEN M, DUBIN G; HPV PATRICIA STUDY GROUP. Efficacy of human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by oncogenic HPV types (PATRICIA): final analysis of a double-blind, randomised study in young women. *Lancet*. v. 374, n. 9686, p. 301-314, 2009.

Peres, A.L., Camarotti, J.R., Cartaxo, M., Alencar, N., Stocco, R.C., Beçak, W., Pontes-Filho, N.T., Araújo, R.F., Lima-Filho, J.L., Martins, D.B. Molecular analysis and conventional cytology: association between HPV and bacterial vaginosis in the cervical abnormalities of a Brazilian population. *Genet Mol Res*. v. 14, n. 3, p. 9497-9505, 2015.

PETRY KU, SCHMIDT D, SCHERBRING S, LUYTEN A, REINECKE-LÜTHGE A, BERGERON C, KOMMOSS F, LÖNING T, ORDI J, REGAUER S, RIDDER R. Triaging Pap cytology negative, HPV positive cervical cancer screening results with p16/Ki-67 Dual-stained cytology. *Gynecol Oncol*. v. 121, n. 3, p. 505-509, 2011.

PINTO, A. P.; TÚLIO, S.; CRUZ, O. R. Co-fatores do HPV na oncogênese cervical. *Rev Assoc Med Bras*. v. 48, n. 1, p. 73-78, 2002.

PINTO, D. S.; FUZII, H. T.; QUARESMA, J. A. S. Prevalência de infecção genital pelo HPV em populações urbana e rural da Amazônia oriental brasileira. *Cad Saúde Pub*. v. 27, n. 4, p. 769-778, 2011.

PRADO, J. C.; CALLEJA-MACIAS, I. E.; BERNARD, H.-U.; KAANTARI, M.; MACAY, S. A.; ALLAN, B.; WILLIAMSON, A.-L.; CHUNG, L.-P.; COLLINS, R. J.; ZUNA, R. E.; DUNN, T.; ORTIZ-LOPES, R.; BARRERA-SALDAÑA, H. A.; CUBIE, H. A.; CUSCHIERI, K.; VON KNEBEL-DOEBERITZ, M.; SANCHÉZ, G. I.; BOSCH, F. X.; VILLA, L. L. Worldwide genomic diversity of the human papillomavirus-53, 56, and 66, a group of high-risk HPVs unrelated to HPV-16 and HPV-18. *Virology*. v. 340, n. 1, p. 95-104, 2005.

RAMA, C. H.; ROTELI-MARTINS, C. M.; DERCHAIN, S. F. M.; DE OLIVEIRA, E. Z.; ALDRIGHI, J. M. Detecção sorológica de anti-HPV 16 e 18 e sua associação com os achados do Papanicolaou em adolescentes e mulheres jovens. *Rev Assoc Med Bras.* v. 52, n. 1, p. 43-47, 2006.

RAMA, C. H.; ROTELI-MARTINS, C. M.; DERCHAIN, S. F. M.; LONGATTO-FILHO, A.; GONTIJO, R. C.; SARIAN, L. O. Z.; SYRJÄNEN, K.; ALDRIGHI, J. M. Prevalência do HPV em mulheres rastreadas para câncer cervical. *Rev Saúde Pub.* v. 42, n. 1, p. 123-130, 2008.

RODRIGUES, A. D.; CANTARELLI, V. V.; FRANTZ, M. A.; PILGER, D. A.; PEREIRA, F. S. Comparação das técnicas de captura de híbridos e para a detecção de HPV em amostras clínicas. *J Bras Patol Med Lab.* v. 45, n. 6, p. 457-462, 2009.

ROUSSEAU M-C, PEREIRA JS, PRADO JCM, VILLA LL, ROHAN TE, FRANCO EL. Cervical Coinfection with Human Papillomavirus (HPV) Types as a Predictor of Acquisition and Persistence of HPV Infection. *The Journal of Infectious Diseases.* v. 184, n. 12, p. 1508-1517, 2001.

RUSSOMANO, F.; REIS, A.; CAMARGO, M. J.; DUTRA, M. V. P.; FONSECA, S. C.; ANDERSON, J. Efficacy in treatment of subclinical cervical HPV infection without intraepithelial neoplasia: systematic review. *Rev Paul Med.* v. 118, n. 4, p. 109-115, 2000.

SCARINCI, I. C.; GARCIA, F. A.; KOBETZ, E.; PARTRIDGE, E. E.; BRANDT, H. M.; BELL, M. C.; DIGMAN, M.; MA, G. X.; DAYE, J. L.; CASTLE, P. E. Cervical cancer prevention: new tools and old barriers. *Cancer.* v. 116, n. 11, p. 2531-2542, 2010.

SCHELECHT, N. F.; PLATT, R. W.; DUARTE-FRANCO, E.; COSTA, M. C.; SOBRINHO, J. P.; PRADO, J. C. M.; FERENCZY, A.; ROHAN, T. E.; VILLA, L. L.; FRANCO, E. L. Human papillomavirus infection and the time to progression and regression of cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst.* v. 95, n. 17, p. 1336-1343, 2003.

SCHFFNER, M.; HUIBREGTSE, J. M.; VIERSTRA, R. D.; HOWLEY, P. M. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell.* v. 75, n. 3, p. 495-505, 1993.

SCHIFFMAN M, CASTLE PE, JERONIMO J, *et al.* Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet*. v. 370, p. 890-907, 2007.

SCHMITZ, M.; SCHEUNGRABER, C.; HERRMANN, J.; TELLER, K.; GAJDA, M.; RUNNEBAUM, I. B.; DÜRST, M. Quantitative multiplex PCR assay for the detection of the seven clinically most relevant high-risk HPV types. *J Clin Virol*. v. 44, n. 4, p. 302-307, 2009.

SIEGEL RL, MILLER KD, JEMAL A. Cancer Statistics, 2016. *CA Cancer J Clin*. v. 16, n.66, p. 7-30, 2016.

SILVA-FILHO AL,BRUNO BN, SILVA LB,TRAIMAN P, SILVA JGC,TRIGINELLI S A. Associação entre a expressão das proteínas p53 e Ki-67 e os achados clínicos-patológicos em pacientes com carcinoma invasor de colo uterino. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*. v. 27, n.5, p. 243-247, 2005.

SMITH, J. F.; BROWNLOW, M.; BROWN, M.; KOWALSKI, R.; ESSER, M. T.; RUIZ, W.; BARR, E.; BROWN, D. R.; BRYAN, J. T. Antibodies from women immunized with Gardasil cross-neutralize HPV 45 pseudovirus. *Hum Vaccin*. v. 3, n. 4, p. 109-115, 2007.

SILVA, K. C.; ROSA, M. L. G.; MOYES, N.; AFONSO, L. A.; OLIVEIRA, L. H. S.; CAVALCANTI, S. M. B. Risk factors associated with human papillomavirus infection in two populations from Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. v. 104, n. 6, p. 885-891, 2009.

SINHA, P.; LOGAN; H. L.; MENDENHALL, W. M. Human papillomavirus, smoking, and head and neck cancer. *Am J Otorinol*. v. 33, n. 1, p. 130-136, 2012.

SMITH, J. S.; GILBERT, P. A.; MELENDY, A.; RANA, R. K.; PIMENTA, J. M. Age-specific prevalence of human papillomavirus infection in males: a global review. *J Adolesc Health*. v. 48, n. 6, p. 540-552, 2011.

SMITH, J. S.; MELENDY, A.; RANA, R. K.; PIMENTA, J. M. Age-specific prevalence of infection with papillomavirus in females: a global review. *J Adolesc Health*. v. 43, n. 4, p. 5-25, 2008

SOLOMON D, SCHIFFMAN M, TARONE R. Comparison of three management strategies for patients with atypical squamous cells of undetermined significance: baseline results from a randomized trial. *J Natl Cancer Inst*. v. 93, p.293-299, 2001.

SONG SH, PARK HM, EOM DW, LEE JK, LEE NW, KIM AR, HUR JY, LEE KW, PARK YK, SAW HS. The expression of p16 (INK4a) and Ki-67 in relation to high-risk human papilloma viral load and residual disease after conization with positive margins. *Int J Gynecol Cancer*. v. 17, n. 4, p. 858-867, 2007.

SOUAYA, N.; MICHAS-MARTIN, P. A.; NASAR, A.; KRIVITSKAYA, N.; YACOUN, H. A.; KHAN, H.; QURESHI, A. I. Guillain-Barré syndrome after Gardasil vaccination: data from vaccine adverse event reporting system 2006-2009. *Vaccine*. v. 29, n. 5, p. 886-889, 2011.

SOUAYA, N.; NASAR, A.; SURI, M. F.; QURESHI, A. I. Guillain-Barré syndrome after vaccination in United States: data from the Centers for Disease Control and Prevention/ Food and Drug Administration vaccine adverse event reporting system. *J Clin Neuromuscul Dis*. v. 11, n. 1, p. 1-6, 2009.

SOUZA, P. S. A.; VILLA, L. L. Genetic susceptibility to infection with human papillomavirus and development of cervical cancer in Brazil. *Mutat Res*. v. 544, n. 2-3, p. 375-383, 2003.

SOUZA, L. B.; PINHEIRO, A. K. B.; BARROSO, G. T. Ser mulher portadora de HPV: uma abordagem cultural. *Rev Esc Enferm USP*. São Paulo. v. 42, n. 4, p. 737-743, 2008.

SPITZER, M. Cervical screening adjuncts: recent advances. *Am J Obstet Gynecol*. v. 179, n. 2, p. 544-556, 1998.

STANLEY, M. Pathology and epidemiology of HPV infection in females. *Gynecol Oncol*. v. 117, n. 2, p. 5-10, 2010.

STEPHEN JK, DIVINE G, CHEN KM, CHITALE D, HAVARD S, WORSHAM MJ. Significance of p16 in Site-specific HPV Positive and HPV Negative Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Clin Oncol*. v. 2, n. 1, p. 51-61, 2013.

SURWIT, E. A.; GRAHAM, V.; DROEGEMUELLER, W.; ALBERTS, D.; CHVAPIL, M.; DORR, R. T.; DAVIS, J. R.; MEYSKENS Jr., F. L. Evaluation of topically applied trans-retinoic acid in the treatment of cervical intraepithelial lesions. *Am J Obstet Gynecol*. v. 143, n. 7, p. 821-823, 1982.

SUZICH, J. A.; GHIM, S. J.; PALMER-HILL, F. J.; WHITE, W. I.; TAMURA, J. K.; BELL, J. A.; NEWSOME, J. A.; JENSON, A. B.; SCHLEGEL, R. Systemic immunization with papillomavirus L1 protein completely prevents the development of viral mucosal papilomas. *Proc Natl Acad Sci USA*. v. 92, n. 25, p. 11553-11557, 1995.

TAKÁCS, T.; JANEY, C.; KOVÁCS, L.; MÓZES, J.; BENCZIK, M.; SEBE, A. Molecular beacon-based real-time PCR method for detection of 15 high-risk and 5 low-risk HPV types. *J Virol Methods*. v. 149, n. 1, p. 153-162, 2008.

TEIXEIRA, M. G.; PENNA, G. O.; RISI, J. B.; PENNA, M. L.; ALVIM, M. F.; MORAES, J. C.; LUNA, E. Seleção das doenças de notificações compulsória: critérios e recomendações para as três esferas de governo. *Inf Epidemiol SUS*. v. 7, n. 1, p. 7-28, 1998.

TELLERIA-DIAZ, A.; CALZADA-SIERRA, D. J. Síndrome de Guillian-Barré. *Acta Neurol Colomb*. v. 18, n. 3, p. 139-153, 2002

TINDLE, R. W. Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Nat Rev Cancer*. v. 2, n. 1, p. 59-65, 2002.

TROTTIER H, MAHMUD S, COSTA MC, SOBRINHO JP, DUARTE-FRANCO E, ROHANTE, FERENCZY A, VILLA LL, FRANCO EL. Human papillomavirus infections with multiple types and risk of cervical neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. v. 15, n. 7, p. 1274-1280, 2006.

TSOUMPOU I, ARBYN M, KYRGIU M, *et al.* p16INK4a immunostaining in cytological and histological specimens from the uterine cervix: a systematic review and metaanalysis. *Cancer Treatment Rev.* v. 35, p. 210-220, 2009.

VELDHUIJZEN, N.; SNIJDERS, P. J. F.; REISS, P.; MEIJER, J. L. M.; VAN WIJGERT, J. H. H. M. Factors affecting transmission of mucosal human papillomavirus. *The Lancet.* v. 10, n. 12, p. 862-874, 2010.

VERÍSSIMO FERNANDES J, DE VASCONCELLOS MEISSNER R, GORETTI FREIRE CARVALHO M, ARAÚJO DE MEDEIROS FERNANDES TA, MEDEIROS AZEVEDO PR, WEBER VERÍSSIMO DE AZEVEDO J, *et al.* Human papillomavirus prevalence in women with normal cytology and with cervical cancer in Natal, Brazil. *Mol Med Rep.* v. 4, p. 1321-1326, 2011.

VEROUX, M.; CORONA, D.; SCALIA, G.; GAROZZO, V.; GAGLIANO, M.; GIUFFRIDA, G.; CONSTANZO, C. M.; GIANQUINTA, A.; PALERMO, I.; ZAPPALÀ, D.; TALLARITA, T.; ZERBO, D.; RUSSO, R.; CAPPELLANI, A.; FRANCHINA, C.; SCRIFFGNANO, V.; VEROUX, P. Surveillance of human papillomavirus infection and cervical cancer in kidney transplant recipients: preliminary data. *Transplant Proc.* v. 41, n. 4, p. 1191-1194, 2009.

WANG JL, ZHENG BY, LI XD, ANGSTRÖM T, LINDSTRÖM MS, WALLIN KL. Predictive significance of the alterations of p16INK4A, p14ARF, p53, and proliferating cell nuclear antigen expression in the progression of cervical cancer. *Clin Cancer Res.* v. 10, n. 7, p. 2407-2414, 2004.

WALTS AE, BOSE S. p16, Ki-67, and BD ProExC immunostaining: a practical approach for diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Hum Pathol.* v. 40, n. 7, p. 957-964, 2009.

WENTZENSEN N, VON KNEBEL DOEBERITZ M. Biomarkers in cervical cancer screening. *Dis Markers.* v. 23, p. 315-330, 2007.

WENTZENSEN N, ZUNA RE, SHERMAN ME, GOLD MA, SCHIFFMAN M, DUNN ST, JERONIMO J, ZHANG R, WALKER J, WANG SS. Accuracy of cervical specimens obtained for biomarker studies in women with CIN3. *Gynecol Oncol*. v. 115, n. 3, p. 493-496, 2009.

WIDDICE, L. E.; MOSCICKI, A-B. Updated guidelines for Papanicolaou tests, colonoscopy, and human papillomavirus testing in adolescents. *J Adolesc Health*. v. 43, n. 4, p. 41-51, 2008.

WINNER, R. L.; HUGHES, J. P.; FENG, Q.; O'RELLY, S.; KIVIAT, N. B.; HOLMES, K. K.; KOUTSKY, L. A. Condom use and the risk of genital human papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med*. v. 354, n. 25, p. 2645-2654, 2006.

WOODMAN, C. B. J.; COLLINS, S. I.; YOUNG, L. S. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer*. v. 7, n. 1, p. 11-22, 2007.

WRIGHT TC, COX JT, MASSAD LS, *et al*. 2001 Consensus guidelines for the management of women with cervical cytological abnormalities. *JAMA*. v. 287, p. 2120-2129, 2002.

YAMAMOTO, L. S. U.; ALVES, V. A. F.; MAEDA, M. Y. S.; LONGATTO-FILHO, A.; UTAGAWA, M. L.; ELUF NETO, J. A morphological protocol and guide-list on uterine cervix cytology associated to papillomavirus infection. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. v. 46, n. 4, p. 189-193, 2004.

YANG, J.; WANG, Y-L.; SI, L-S. Predicting the nuclear localization signals of 107 types of HPV L1 proteins by bioinformatic analysis. *Genomics Proteonomics Bioinformatic*. v. 4, n. 1, p. 34-41, 2006.

XIAO, J.; XIN, X.; LUAN, X.; WEI, D.; YANG, S. A modified simple RFLP-PCR method for single nucleotide polymorphism (SNP) typing. *Genet Molec Biol*. v. 29, n. 3, p. 562-565, 2006.

ZHAO, Q.; GUO, H. H.; WANG, Y.; WASHABAUH, M. W.; SITIRIN, R. D. Visualization of discrete L1 oligomers in human papillomavirus 16 virus-like particles by gel electrophoresis with Coomassie staining. *J Virol Methods*. v. 127, n. 2, p. 133-140, 2005.

APENDICE A (Artigo submetido a revista: *International Journal of Gynecological Pathology*)

Genotypic profile of infection with Human Papillomavirus in women of Agreste Region of pernambuco with histopathological diagnosis of lower and high grade of cervical lesion

Paulo José Cunha Miranda¹, Jacinto da Costa Silva Neto^{2*}, Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho³

¹Cytological and Molecular Research Laboratory, Department of Histology, Center of Biosciences, Federal University of Pernambuco – Brazil;

²Cytological and Molecular Research Laboratory, Department of Histology and Embriology, Federal University of Pernambuco – Brazil;

³Division of Virology, Laboratório Keizo Asami Laboratory of Immunopathology (LIKA), Federal University of Pernambuco (UFPE) – Brazil;

*** Corresponding Author:** Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho

Department of Virology – LIKA-UFPE

rcoelholika@gmail.com

Abstract

Cervical carcinoma is the fourth most common type of cancer and thought to be the fourth main cause of death among women throughout the world, particularly in developing countries. Clinical and epidemiological studies claim that HPV infection is a necessary condition for the development of cervical cancer. A knowledge of the geographic distribution of HPV genotypes is important to give guidance for the introduction of prophylactic vaccines. In addition, it is important for the determination of the local epidemiology of circulating high-risk types of HPV. The aim of this study is to determine the genotype profiles of HPV infection for a group of women who live in the semi-arid "Agreste" region of the State of Pernambuco in Brazil, and thus be in a better position to define the prevalence of the oncogenic HPV genotypes and their link with the progression of the lesion. The study includes an analysis of 211 cases of women whose diagnosis was confirmed for NIC 1, NIC 2, NIC 3 and cancer. The identification of the HPV genotypes was based on the PCR/RFLP technique. Altogether, 42.7% of the samples showed a single genotype infection, while 57.3% were infected by several genotypes. The most common genotypes detected were HPV-16, HPV-18 and HPV-31. A total of 26.5% of women had NIC 1, among which HPV-16, HPV-31, HPV-35 and HPV-18, were the most frequent in simple infections, and HPV16/11, HPV16/6 and HPV18/6 in co-infections. HPV-16 and HPV-18 were the genotypes that were most often found in NIC 2 with a single genotype infection for HPV, while HPV16/6, HPV 16/11 and HPV 16/31 were the most prevalent in NIC 2 with co-infections. With regard to women diagnosed with NIC 3, the HPV-16, HPV-18, HPV-31 were detected in a single genotype infection, whereas HPV 16/6, HPV 16/11 and HPV 16/18 were the co-infections that were most frequently observed in this group. A total of 17.5% women were diagnosed with cancer, and among this group, HPV-16 and HPV-31 were the two types that most often had simple infections, while HPV16/6 and HPV18/11 were the most frequent with co-infections. Multiple infection with HPV-16 had a 2.7 times greater risk of NIC 3

($p=0.04$). Multiple infections for HPV with HPV16 and excluding the HPV18/31 types, were associated with NIC 3 ($p=0.01$). The results obtained in this study allowed the detection and type-specific genotyping of HPV circulating in the population being studied. These findings must be taken into account when devising vaccination strategies against HPV.

Keywords: Human Papillomavirus, Genotyping protocols, Cervical Carcinoma, Pernambuco.

Introduction

Uterine cervical carcinoma is the fourth most common type of cancer in the world and is regarded as the second main cause of death for women throughout the world, particularly in developing countries (Gargiulo *et al.*, 2007; Nakagawa *et al.*, 2010; SIEGEL *et al.*, 2016).

Clinical and epidemiological studies believe that HPV infection is a necessary condition for the development of cervical cancer. However, only a small proportion of women infected by the virus suffer from cancer which shows that just the presence of HPV does not seem to be enough for the development of the disease (Bosch *et al.*, 2002; Veldhuijzen *et al.* 2010; Almonte *et al.*, 2011).

More than 200 genotypes of HPV are known, about 40 of which are responsible for genital tract infections, including genotypes 16, 18, 31, 52 e 58, which are considered to be oncogenic high-risk genotypes and etiological agents of cervical cancer. In contrast, the HPV-6 and HPV-11 genotypes are considered to be low-risk and responsible for the rise of genital warts which are characterized as benign (AYRES & SILVA, 2010; FARID *et al.*, 2011).

Several studies on the prevalence of HPV genotypes have found that HPV-16 is the most prevalent type in different regions of the world (Freitas *et al.*, 2012; Pirog *et al.*, 2014).

Multiple HPV infections are commonly found in epidemiological and molecular studies (Nielsen *et al.*, 2008; Mejlhede *et al.*, 2009; Dickson *et al.*, 2013; Dickson *et al.*, 2014). However, the clinical importance of these multiple HPV genotypes in the modulation of the risk of squamous intraepithelial lesions (SIL), remains a controversial issue. Some studies have shown that there is a link between low-grade squamous intraepithelial lesions (LSIL) and high-grade squamous intraepithelial lesions (HSIL) in women infected with several types of HPV (Cuschieri *et al.*, 2004; Chaturvedi *et al.*, 2011; Dickson *et al.*, 2013; Dickson *et al.*, 2014).

In Brazil, studies have shown that HPV-16 is the most prevalent kind although there are regional variations with regard to the various genotypes. This means that the data from one particular place cannot be generalized for the whole country. (Eluf-Neto *et al.*, 1994; Cavalcanti *et al.*, 1994; Noronha *et al.*, 1999; Lorenzato *et al.*, 2000; Rabelo-Santos *et al.*, 2003; Chaturvedi *et al.*, 2004; Baldez da Silva *et al.*, 2009).

Knowledge about the distribution of HPV genotypes can give guidance to the introduction of prophylactic vaccines in the determination of the local epidemiology of circulating high-risk HPV genotypes. The aim of this study is to determine the profile for HPV infection in women in the semi-arid Agreste region of the State of Pernambuco in Brazil and its association with the progression of lesions and cervical cancer.

Methodology

The population investigated

The study involved conducting an analysis of 211 cases of women with ages ranging from 19 to 72 (the average age being 42.5), who resided in the Agreste Region of the State of Pernambuco. The data were obtained from the files of a private laboratory located in the town of Garanhuns. The cases of women being submitted to vaccine against HPV were excluded.

Genotyping for HPV

The identification of HPV genotypes was based on the PCR-RFLP technique as described by Nobre *et al.* (2008). The biological samples were collected in liquid medium with the aid of a sterile cervical brush (Kolplast Ci Ltda, São Paulo, Brazil), and subsequently centrifuged at 3000 rpm for 5 minutes (Fanem 206MP). The supernatant was discarded and the extraction solution was added to the cell *pellet* with the following composition: NaCl, 0,1 Mol/L; EDTA 10 mMol/L; Tris 10 mMol/L, pH 7.5, containing SDS (0.5%) and proteinase (K 0.5 g/L). Following this, the systems were placed in the oven (Nova Ética 411D) and incubated at 56°C for 30 minutes. After the extraction, the DNA was purified by means of the Phenol/Chloroform Standard method 1:1 (Vetec, Rio de Janeiro, Brazil), followed by precipitation with isopropyl alcohol (Vetec, Rio de Janeiro, Brazil) at -20°C for 20 minutes. After this, the supernatant was removed by reversal and was left to rest for a suitable period until the drying of the material at room temperature. At the end of this time, the DNA was purified and diluted again in Tris Buffer Solution for subsequent amplification by PCR.

The amplification of the hypervariable region of the L1 gene for genotyping, was carried out with the aid of the following: MgCl₂ 1,5 mMol/L, 200 mMol/L of each dNTP, a single *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, São Paulo, Brazil) and 12.5 pMol/L of each *primer*, MY09 (5'-CGTCCMARRGGAWACTGATC-3') and MY11 (5'-CMCAGGGWCATAAYAATGG-3'). The reactions for the amplification were carried out in a (GeneAmp PCR System 9700 thermal cycler, Applied Biosystems) in the following conditions: first cycle of denaturation at 95°C for 4 minutes, followed by 35 intermediary cycles of denaturation at 94°C for 30 seconds, annealing at 56°C for 30 seconds, extension to 72°C for 30 seconds and final extension cycle at 72°C for 8 minutes. As a control for DNA extraction efficiency and Polymerase Chain Reaction, a fragment of 501 pb of beta-globin was amplified by means of the Beta1 (5'-TCAACCCTACAGTCACCCAT-3') and Beta2 (5'-CTAACAATTACGAACAGCAATGAG-3') primers, under the same conditions as the PCR.

Each solution with the PCR product was submitted to enzymatic digestion with the *Dde* I, *Hae* III, *Rsa* I, *Pst*I restriction enzymes for 1 hour at 37°C, in accordance with the instructions of the manufacturer (Invitrogen, São Paulo, Brazil). The DNA particles were identified by gel electrophoresis in polyacrylamide gel (6%), stained with SYBR *Safe* DNA and subsequently purified with the aid of the *UltraClean PCR Clean-up Kit* (MOBio, Carlsbad, EUA). The purity of the PCR products was determined by optical density measured by the spectrophotometer method (ND-1000 UV-Vis, ThermoScientific).

Following this, the DNA of the samples was sequenced (ABI 3730 DNA Analyser, Applied Biosystems) and analyzed by means of the *Sequencing Analysis*®, version 5.3.1 and *Chromas Lite*®, version 2.01 programs. The sequences were then compared with those available in *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Statistical Analysis

The statistical treatment of the data based on the results included a separate analysis of the most prevalent types of HPV (HPVs 16, 18, 31, 33 and 35). The *Odds Ratio* (OR) of NIC 2, NIC 3 and cancer, with simple or multiple HPV infections, were calculated and a comparison made with the NIC 1 Group. The *Odds Ratio* (OR) and confidence intervals of 95% (IC) are recorded throughout the text and in the Tables. The statistical analysis was conducted by means of the Medical® version 14.10.2 <http://www.medcalc.org/index.php>.

Ethical issues in the research

This study was undertaken with the approval of the Research Ethics Committee of the Federal University of Pernambuco (CAE: 0285.0.172.00-11).

Results

A total number of 211 samples that had been classified as NIC 1, NIC 2 and NIC 3, were genotyped by means of PCR/RFLP. 42.7% (90/211) of these showed a single infection for HPV, whereas 57.3% (121/211) showed multiple infections. The most commonly detected genotypes were HPV-16 (24.6% in simple infections), HPV-18 (7.1% in simple infections) and HPV-31 (6.6% in simple infections) (Table 1).

Table 1. Diversity of HPV as simple and multiple infections.

Genotypes of HPV	n	%
Single infection (N=90)		
HPV-16	52	24.6
HPV-18	15	7.1
HPV-31	14	6.6
HPV-33	3	1.4
HPV-35	6	2.8
Multiple infection (N=121)		
HPV 16/11	13	6.2
HPV 16/18	5	2.4
HPV 16/18/11	4	1.9
HPV 16/18/31/11	1	0.5
HPV 16/18/31/33	2	0.9
HPV 16/18/33/6	1	0.5
HPV 16/18/6	2	0.9
HPV 16/31	4	1.9
HPV 16/31/11	1	0.5
HPV 16/31/35	1	0.5
HPV 16/31/6	5	2.4
HPV 16/31/6/11	1	0.5
HPV 16/33	1	0.5
HPV 16/33/35/11	1	0.5
HPV 16/33/6	2	0.9

HPV 16/35	2	0.9
HPV 16/35/11	1	0.5
HPV 16/35/6	2	0.9
HPV 16/6	24	11.4
HPV 16/6/11	1	0.5
HPV 18/11	7	3.5
HPV 18/31	3	1.4
HPV 18/31/35/6	1	0.5
HPV 18/31/6	2	0.9
HPV 18/33	2	0.9
HPV 18/33/11	1	0.5
HPV 18/6	6	2.8
HPV 18/6/11	1	0.5
HPV 31/11	4	1.9
HPV 31/33/11	1	0.5
HPV 31/33/6	3	1.4
HPV 31/35	2	0.9
HPV 31/36	8	3.8
HPV 33/11	4	1.9
HPV 33/6	2	0.9
Total	211	100

The cervical samples were also categorized in accordance with the histological findings and distribution patterns of types of HPV (Table 2).

Table 2. Distribution pattern of types of HPV between NIC 1, NIC 2, NIC 3 and cancer with regard to simple and multiple infections.

Types of HPV	n	%
NIC 1 and simple infection (N=27)		
HPV-16	13	48.1
HPV-18	3	11.1
HPV-31	6	22.2
HPV-33	1	3.7
HPV-35	4	14.8
NIC 1 and multiple infection (N=29)		
HPV 16/11	4	13.8
HPV 16/6	4	13.8
HPV 18/6	3	10.3
Two types of HPV	10	34.4
Three types of HPV	7	24.1
Four types of HPV	1	3.4
NIC 2 and single infection (N=12)		

HPV-16	6	50
HPV-18	3	25
HPV-31	2	16.7
HPV-33	1	8.3
NIC 2 and multiple infection (N=24)		
HPV 16/11	4	16.7
HPV 16/31	3	12.5
HPV 16/6	6	25
Two types of HPV	7	29.2
Three types of HPV	2	8.3
Four types of HPV	2	8.3
NIC 3 and single infection (N=37)		
HPV-16	24	64.9
HPV-18	8	21.6
HPV-31	3	8.1
HPV-33	1	2.7
HPV-35	1	2.7
NIC 3 and multiple infection (N=45)		
HPV 16/11	4	8.8
HPV 16/18	3	6.6
HPV 16/6	11	24.4
HPV 31/6	5	11.1
Two types of HPV	7	15.5
Three types of HPV	12	26.6
Four types of HPV	3	6.6
Cancer and single infection (N=14)		
HPV-16	9	64.2
HPV-18	1	7.1
HPV-31	3	21.4
HPV-35	1	7.1
Cancer and multiple infection (N=23)		
HPV 16/6	4	17.4
HPV 18/11	3	13
Two types of HPV	10	43.5
Three types of HPV	6	26

A total of 26.5% (56/211) women had NIC 1, among which HPV-16, HPV-31, HPV-35 and HPV-18 were the most common serotypes in simple infections, whereas HPV16/11, HPV16/6 and HPV18/6 were the most frequent in co-infections.

HPV-16 and HPV-18 were the two genotypes most often found in NIC 2 with a single infection for HPV, whereas HPV16/6, HPV 16/11 and HPV 16/31 were the genotypes most prevalent in NIC 2 with co-infections.

With regard to women diagnosed with NIC 3, HPV-16, HPV-18, HPV-31, these were the patients where most single HPV infections was detected, whereas in the case of the group associated with HPV 16/6, HPV 16/11 and HPV 16/18, co-infections were most commonly.

A total of 17.5% (37/211) of women were diagnosed with cancer, where HPV-16 and HPV-31 were the two most frequent genotypes in simple infections whereas HPV16/6 and HPV18/11 were the most frequent in co-infections.

Multiple infection with HPV-16 shows a 2.7 times greater risk of NIC 3 (OR=2.7; IC 95%: 1.04-7.16; $p=0.04$), although this has not been observed in women with NIC 2 and cancer (Table 3). Multiple infections for HPV with HPV-16 and excluding the HPV18/31 types, were associated with NIC 3 (OR=3.64; IC 95%: 1.33-9.92; $p=0.01$) (Table 3).

Table 3. Distribution pattern of simple and multiple infections for HPV in cervical samples of NIC 1, NIC 2, NIC 3 and cancer. SI: Single infection for HPV. MI: Multiple infection for HPV. (*) *P*-value and ORs in comparison with NIC 1. (-) DNA of non-detected HPV. Heavy print – statistically significant ($p < 0.05$).

	NIC 1	NIC 2	OR (95% CI) * <i>P</i> -value	NIC 3	OR (95% CI) * <i>P</i> -value	Câncer	OR (95% CI) * <i>P</i> -value
HPV-16 (UI)	13	6	1.08 (0.27 – 4.19) 0.91	24	1.99 (0.72 – 5.47) 0.18	9	1.93 (0.51 – 7.31) 0.32
HPV-16 (MI)	13	17	2.98 (0.95 – 9.39) 0.06	31	2.72 (1.04 – 7.16) 0.04	13	1.60 (0.53 – 4.81) 0.40
HPV-18 (UI)	3	3	2.22 (0.37 – 13.22) 0.38	8	1.90 (0.44 – 8.08) 0.38	1	0.51 (0.04 – 5.47) 0.58
HPV-18 (MI)	8	5	0.69 (0.19 – 2.47) 0.57	14	1.18 (0.42 – 3.32) 0.74	10	2.01 (0.63 – 6.43) 0.23
HPV-31 (UI)	6	2	0.57 (0.09 – 3.36) 0.53	3	0.25 (0.05 – 1.15) 0.07	3	0.77 (0.15 – 3.75) 0.74
HPV-31 (MI)	10	8	0.95 (0.30 – 2.97) 0.93	13	0.79 (0.29 – 2.17) 0.66	7	0.83 (0.25 – 2.68) 0.74
HPV-33 (UI)	1	1	2.70 (0.16 – 2.97) 0.93	1	1.75 (0.10 – 29.52) 0.69	-	-
HPV-35 (UI)	4	-	-	1	0.15 (0.01 – 1.51) 0.11	1	0.44 (0.04 – 4.38) 0.48
HPV-16 (MI) excluding HPV18/31	9	10	1.98 (0.65 – 6.03) 0.22	21	3.64 (1.33 – 9.92) 0.01	8	0.83 (0.14 – 8.84) 0.22
HPV-31 (MI) excluding HPV16/18	6	2	0.46 (0.08 – 2.56) 0.88	7	0.78 (0.23 – 2.62) 0.69	3	0.59 (0.13 – 2.67) 0.49
HPV-33 (MI) excluding HPV16/31	3	3	1.04 (0.08 – 2.56) 0.88	2	1.04 (0.08 – 2.56) 0.88	1	0.43 (0.04 – 4.55) 0.88
HPV-33 (MI) excluding HPV18/31	3	2	0.74 (0.12 – 5.14) 0.88	3	0.65 (0.12 – 3.52) 0.62	2	0.83 (0.12 – 5.47) 0.84

Signs of carriers of up to four HPV genotypes were found in the samples of the population under study, in all of which some oncogenic viral type was identified that was often associated with high degree neoplasia and carcinoma. The HPV infection profile in our population shows cases of single and multiple infections not covered by currently available vaccines. Figure 1 provides a summary of the infections with viral types that are either covered or not covered by the preventive anti-HPV vaccines.

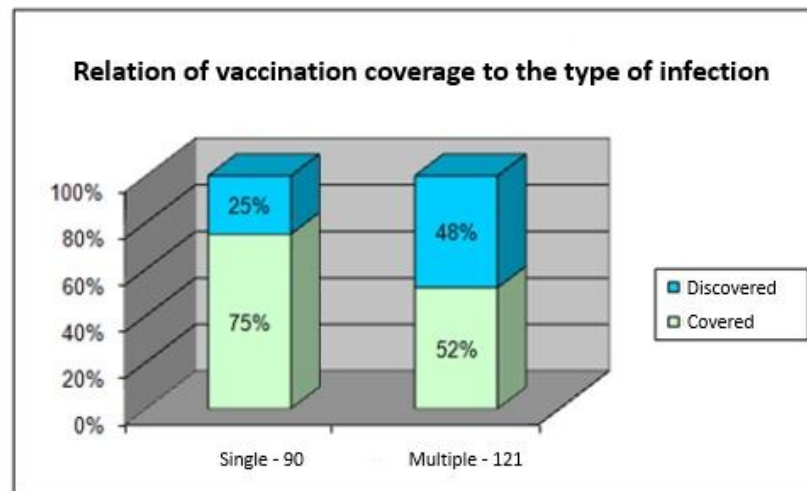


Figure 1. Amounts relative to viral types (included and not included) through the preventive HPV vaccines in single and multiple infections in the population.

Discussion

With regard to the link between cervical cancer and HPV infection, HPV-16 is the most frequent in global terms followed by HPV-18, (with rare exceptions). Brazil with its continental dimensions and widespread population flows, forms a part of these exceptions since the pattern of frequency with regard to high-risk HPV involved in high-grade cervical lesions is subject to variations. Our study is concentrated on women who reside in the Agreste region of the State of Pernambuco, and has provided us with a correlation with global statistics regarding the greater prevalence of HPV-16 (Fernandes *et al.*, 2008; Baldez da Silva *et al.*, 2009; Castro *et al.*, 2011; Veríssimo *et al.*, 2011; Baldez da Silva *et al.*, 2012; Gurgel *et al.*, 2013). However, when sticking closely to the profile already described for the metropolitan region of Recife, the second most prevalent genotype was found to be HPV-31, followed by HPV-18.

HPV belongs to a heterogeneous group of a DNA viruses that is capable of infecting the skin and mucous membrane in various parts of the human body (Castro *et al.*, 2009). Among the grades of cervical lesions in which HPV can be involved, the detection of the HPV-16 genotype is widely associated with the cytological findings consistent with HSIL and *in situ* carcinoma (Broomall *et al.*, 2010). Our study is in agreement with the previous literature and seeks to refine the pattern of the prevalence of HPV in each category of atypia and in different stages of intraepithelial neoplasia. Corresponding with the average worldwide prevalence in any type of cervical lesion under consideration, HPV-16 was singled out as the infection that was most often found in both low and high grade cervical neoplasia and carcinoma, regardless of whether it was a single or multiple infection.

It should be borne in mind that the onset of multiple infections has significant consequences when forming a profile of HPV infections which can be associated with different degrees of cervical lesions. The occurrence of multiple infections seems to be much more common than expected. Patients with genital lesions can be infected by several types of HPV at the same time. The HPV-6 and 11 genotypes are rarely associated with invasive squamous cell carcinoma (Gontijo *et al.*, 2007), to the extent that, according to our data, their detection in NICs 1, 2 and 3 and carcinoma is more likely to be attributed to co-infection with high-risk HPV. Previous studies showed

a greater prevalence of co-infections involving high-risk types for the HPV-16 and 31, and HPV-16 and 33 types (Baldez da Silva *et al.*, 2009), or HPV-16 and 18 (Rousseau *et al.*, 2001). Although our data do not supply evidence of any particularly significant prevalence for a combination of types of multiple infections, a significant percentage of double infections (40.8%) and triple infections (13.7%) have drawn our attention to the HPV infection associated with the risk of cervical cancer among a population undergoing an HPV-specific vaccination program. Until now, there has been no consensus about the question of whether multiple types of HPV occur by chance or by means of a competitive or cooperative relation. Several studies have shown that the infection for multiple types of HPV occurs more frequently than those expected by chance (Chaturvedi *et al.*, 2011; Dickson *et al.*, 2013; Dickson *et al.*, 2014). In this study, co-infections with HPV-16 showed a greater risk of harboring cervical lesions in the case of single infections, whereas multiple infections with this viral type had a greater risk of NIC 3.

The evidence of preventive anti-HPV vaccination tests does not indicate that there has been any clear substitution of prevalent genotypes and do not show any signs of cross-protection for the diverse HPV genotypes that are phylogenetically related (Paavonen *et al.*, 2007; Paavonen *et al.*, 2009; Brown *et al.*, 2009; Herrero, 2009). Nonetheless, there have been few studies that have assessed the synergistic interactions between infecting types of HPV at risk of the cervical disease (Herrero *et al.*, 2005; Trottier *et al.*, 2006; Wentzensen *et al.*, 2009). Owing to the large number of HPV genotypes involved in genital diseases, the epidemiological study of co-infections for HPV and their consequences, requires much more detailed research. Some studies have shown that although there is a significantly greater frequency of multiple types of HPV among young women, the combination of co-infected genotypes occurs at random. Moreover, although associated with an increase of cervical disease, co-infecting genotype lead to a cervical disease in an independent way (Chaturvedi *et al.*, 2011).

In the case of our data, although this revealed that about 25% of infections had only one of the HPV types isolated by the sample, this can be attributed to the fact that several viral strains were not covered by the protection provided by the vaccines currently available. This percentage (48%) almost duplicates the cases of multiple infections that occurred in the target population of this study. If there is an awareness of the prevalence of the HPV types at a regional level, as well as in groups at risk (including factors such as age and number of sexual partners) it can have a considerable influence on public health policies and prevention measures, including mass vaccination (Mendez *et al.*, 2005). In this way, a preventive quadrivalent HPV vaccination, which covers Genotypes 6, 11, 16 and 18, can have a variable effect on the prevention of cervical cancer depending on the kind of population under consideration.

Our findings should be interpreted within the context of the design for this study. Although the prevalence of HPV is the focal point of our research, there are many restrictions to the way an accurate profile can be drawn of the population concerned. In the first place, our sample group was not representative of the entire population, since the patients selected were drawn from people requiring an HPV diagnosis before being sent to our laboratory. Hence, there was a possible bias in the selection because the patients might have represented a high-risk group (e.g. patients already treated for HPV or partners already diagnosed with HPV). Furthermore, our sample group comprised a subset of people with full access to medical care. Finally, owing to the lack of data for tracing the medical history of each patient, it was not possible to delineate the infectious disease epidemiology in our study which included factors related to transmission and the possible influence of the social background and sexual habits with regard to each patient.

In conclusion, it was shown that the most commonly detected genotype in the cases of NIC 1, NIC 2 and NIC 3 and cervical cancer was HPV-16, which is in line with the findings of Freitas *et al.* (2012) and Pirog *et al.* (2014). In addition, co-infections with HPV-16 had a greater risk of sheltering cervical lesions with a high risk of NIC 3. Studies that involve the HPV genotypes and development of cervical cancer should be taken into account when preparing vaccination programs against HPV.

References

Almonte M, Sasieni P, Cuzick J. Incorporating human papillomavirus testing into cytological screening in the era of prophylactic vaccines. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* Amsterdam. v. 25, n. 5, p. 617-629, 2011.

Ayres ARG, Silva GA. Cervical HPV infection in Brazil: systematic review. *Rev Saúde Pub.* São Paulo. v. 44, n. 5, p. 1-11, 2010.

Baldez da Silva MF, Chagas BS, Guimarães V, Katz LMC, Felix PM, Miranda PM, Lima AA, Arraes LC, Martins DBG, Lima Filho JL, et al. HPV31 and HPV33 incidence in cervical samples from women in Recife, Brazil. *Genet Mol Res.* v. 8, p. 1437-1443, 2009.

Baldez da Silva MFPT, Guimarães V, Silva MAR, Amaral CMM, Beçak W, Stocco RC, Freitas AC, Crovella S. Frequency of human papillomavirus types 16, 18, 31, and 33 and sites of cervical lesions in gynecological patients from Recife, Brazil. *Genetics and Molecular Research*, v. 11. n. 1, p. 462-466, 2012.

Bernard HU. Gene expression of genital human papillomavirus and considerations on potential antiviral approaches. *Ant Ther.* v. 7, p. 219-237, 2002.

Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJ and Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol.* v. 55, p. 244-265, 2002.

Broomall EM, Reynolds SM, Jacobson RM. Epidemiology, Clinical Manifestations, and Recent Advances in Vaccination against Human Papillomavirus. *Clinical Features.* v. 122, n. 2, p. 121-129, 2010.

Brown DR, Kjaer SK, Sigurdsson K, Iversen OE, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, Perez G, Koutsky LA, Tay EH, et al. The impact of quadrivalent human papillomavirus (HPV; types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine on infection and disease due to oncogenic nonvaccine HPV types in generally HPV-naïve women aged 16-26 years. *J Infect Dis.* v. 1, n. 199, p. 926-35, 2009.

Castro MM, Farias IP, Borborema-Santos CM, Correia G, Astolfi-Filho S. Prevalence of human papillomavirus (HPV) type 16 variants and rare HPV types in the central Amazon region. *Genet Mol Res.* v. 10, p. 186-196, 2011.

Castro TMPPG, Filho IB, Nascimento VX, Xavier SD. HPV detection in the oral and genital mucosa of women with positive histopathological exam for genital HPV, by means of the PCR. *Braz J Otorhinolaryngol.* v. 75, n. 2, p. 167-71, 2009.

Cavalcanti SM, Frugulhetti IC, Passos MR, Fonseca MF and Oliveira LH. Prevalence of human papillomavirus DNA in female cervical lesions from Rio de Janeiro, Brazil. *MemInst Oswaldo Cruz,* v. 89, p. 575-580, 1994.

Chaturvedi AK, Brinkman JA, Gaffga AM, Dumestre J, Clark RA, Braly PS, Dunlap K, Kissinger PJ and Hagensee ME. Distribution of human papillomavirus type 16 variants in human immunodeficiency virus type 1 -positive and -negative women. *J.Gen. Virol.* v. 85, p. 1237-1241, 2004.

Chaturvedi AK, Katki HA, Hildesheim A, Rodriguez AC, Quint W, Schiffman M, Van Doorn L-J, Porras C, Wacholder S, Gonzalez P, Sherman ME, Herrero R. Human Papillomavirus Infection with Multiple Types: Pattern of Coinfection and Risk of Cervical Disease. *Journal of Infectious Diseases,* v. 910, p. 203, 2011.

Dickson EL, Vogel RI, Bliss RL, Downs LS. Multiple-Type Human Papillomavirus (HPV) Infections: A Cross-Sectional Analysis of the Prevalence of Specific Types in 309,000 Women Referred for HPV Testing at the Time of Cervical Cytology. *Int. J. Gynecol. Cancer.* v. 23, p. 1295-1302, 2013.

Dickson EL, Vogel RI, Geller MA, Downs Jr. LS. Cervical cytology and multiple type HPV infection: A study of 8182 women ages 31–65. *Gynecol. Oncol.* v. 133, p. 405-408, 2014.

Eluf-Neto J, Booth M, Muñoz N, Bosch FX, Meijer CJLM and Walbooners JMM. Human papillomavirus and invasive cervical cancer in Brazil. *Brit. J. Cancer.* v. 69, p. 114-119, 1994.

Farid R, Zahra A, Khan K, Idrees M. Oncogenic potential of human papillomavirus (HPV) and its relation with cervical cancer. *Virology J. London.* v. 8, n. 1, p. 269-276, 2011.

Fernandes TAA, Meissner R, Bezerra LF, Azevedo PRM, Fernandes JV. Human papillomavirus infection in women attended at a cervical cancer screening service in Natal, Brazil. *Braz J Microbiol.* v. 39, p. 573-578, 2008.

Freitas AC, Gurgel APAD, Chagas BS, Coimbra EC, Amaral CMM. Susceptibility to cervical cancer: An overview. *GynecolOncol.* v. 126, p. 304-311, 2012.

Gargiulo F, de Francesco MA, Schreiber C, Ciravolo G, Salinaro F, Valloncini B, Manca N. Prevalence and distribution of single and multiple HPV infections in cytologically abnormal cervical samples from Italian women. *Virus Res. Amsterdam.* v. 125, n. 2, p. 176-182, 2007.

Gontijo RC, Derchain SFM, Roteli-Martins C, Bragança JF, Sarian LO, Morais SS, Maedamys, Longatto-Filho A, Syrjänen KJ. 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. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, v. 133, n. 2, p. 239-246, 2007.

Gurgel APAD, Chagas BS, do Amaral CMM, Albuquerque EMB, Serra IGSS, Silva Neto J da C, et al. Prevalence and genetic variability in capsid L1 gene of rare human papillomaviruses (HPV) found in cervical lesions of women from North-East Brazil. *BioMed Res. Int.* v. 2013, p. 546354, 2013.

Herrero R. Human papillomavirus (HPV) vaccines: limited cross-protection against additional HPV types. *J. Infect. Dis.* v. 1; n. 199, p. 919-22, 2009.

Herrero R, Castle PE, Schiffman M, Bratti MC, Hildesheim A, Morales J, Alfaro M, Sherman ME, Wacholder S, Chen S, Rodriguez AC, Burk RD. Epidemiologic profile of type-specific human papillomavirus infection and cervical neoplasia in Guanacaste, Costa Rica. *J. Infect. Dis.* v. 191, n.11, p. 1796-807, 2005.

Lorenzato F, Ho L, Terry G, Singers A, Santos LC, de Lucena Batista R and Lubambo T. The use of human papillomavirus typing in detection of cervical neoplasia in Recife (Brazil). *Int J Gynecol Cancer*, v. 10, p. 143-150, 2000.

Mejlhede N, Bonde J, Fomsgaard A. High frequency of multiple HPV types in cervical specimens from Danish women. *APMIS*, v. 117, p. 108–114, 2009.

Mendez F, Muñoz N, Posso H, Molano M, Moreno V, Van Den Brule AJC, Ronderos M, Meijer C. Cervical Coinfection with Human Papillomavirus (HPV) Types and Possible Implications for the Prevention of Cervical Cancer by HPV Vaccines. *J InfectDis.* v. 192, n. 7, p. 1158-1165, 2005.

Nakagawa JTT, Schirmer J, Barbieri M. Vírus HPV e câncer do colo do útero. *Rev Bras Enferm. Brasília.* v. 63, n. 2, p. 307-311, 2010.

Nielsen A, Kjaer SK, Munk C, Iftner T. Type-Specific HPV Infection and Multiple HPV Types: Prevalence and Risk Factor Profile in Nearly 12,000 Younger and Older Danish Women: *Sex. Transm. Dis.* v. 35, p. 276-282, 2008.

Noronha V, Mello W, Villa LL, Macedo R, Bisi F, Mota R, Sassamoto K, Monteiro T and Linhares A. Human papillomavirus associated with cervix lesions. *Rev. Soc. Bra. Med. Trop.* v. 32, p. 235-240, 1999.

Paavonen J, Jenkins D, Bosch FX, Naud P, Salmerón J, Wheeler CM, Chow SN, Apter DL, Kitchener HC, et al. Efficacy of a prophylactic adjuvanted bivalent L1 virus-like particle vaccine against infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: an interim analysis of a phase III double-blind, randomized trial. *The Lancet. London.* v. 369, n. 9580, p. 2161-2170, 2007.

Paavonen J, Naud P, Salmerón J, Wheeler CM, Chow SN, Apter D, Kitchener H, Castellsague X, Teixeira JC, Skinner SR, et al. Efficacy of human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by oncogenic HPV types (PATRICIA): final analysis of a double-blind, randomised study in young women. *Lancet*. v. 374, n. 9686, p. 301-14.2009.

PirogEC, Lloveras B, Molijn A, et al. on behalf of the RIS HPV TT study group. HPV prevalence and genotypes in different histological subtypes of cervical adenocarcinoma, a worldwide analysis of 760 cases. *Mod. Pathol*. v. 55, 2014.

Rousseau MC, Pereira JS, Prado JCM, Villa LL, Rohan TE, Franco EL. Cervical Coinfection with Human Papillomavirus (HPV) Types as a Predictor of Acquisition and Persistence of HPV Infection. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 184, n. 12, p. 1508-1517, 2001.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2016. *CA Cancer J Clin*. v. 16, n.66, p. 7-30, 2016.

Trottier H, Mahmud S, Costa MC, Sobrinho JP, Duarte-Franco E, Rohan TE, Ferenczy A, Villa LL, Franco EL. Human papillomavirus infections with multiple types and risk of cervical neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. v. 15, n. 7, p. 1274-1280,2006.

Veldhuijzen N, Snijders PJF, Reiss P, MeijerJLM, Van Wijgert JHHM. Factors affecting transmission of mucosal human papillomavirus. *The Lancet*. London. v. 10, n. 12, p. 862-874, 2010.

Veríssimo Fernandes J, de Vasconcellos Meissner R, Goretti Freire Carvalho M, Araújo de Medeiros Fernandes TA, Medeiros Azevedo PR, Weber Veríssimo de Azevedo J, et al. Human papillomavirus prevalence in women with normal cytology and with cervical cancer in Natal, Brazil. *Mol Med Rep*. 2011;4: 1321–1326.

Wentzensen N, Zuna RE, Sherman ME, Gold MA, Schiffman M, Dunn ST, Jeronimo J, Zhang R, Walker J, Wang SS. Accuracy of cervical specimens obtained for biomarker studies in women with CIN3. *GynecolOncol*. v. 115, n. 3, p. 493-6, 2009.

APENDICE B: (Artigo submetido a revista: *International Journal of Gynecological Cancer*)

Association Study between the expression of p16^{INK4a} and Ki-67 proteins and the histopathologic diagnosis in women infected with human papillomavirus in Agreste region of Pernambuco

Paulo José Cunha Miranda¹, Jacinto da Costa Silva Neto^{2*}, Maria Rosângela Duarte Coêlho³

¹Laboratory of Cytological and Molecular Research, Department of Histology, Bioscience Center, Federal University of Pernambuco – Brazil;

²Laboratory of Cytological and Molecular Research, Department of Histology and Embryology, Federal University of Pernambuco – Brazil;

³Division of Virology, Laboratório Keizo Asami Laboratory of Immunopathology (LIKA), Federal University of Pernambuco (UFPE) – Brazil;

*** Corresponding Author:** Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho

Department of Virology – LIKA-UFPE

rcoelholika@gmail.com

Abstract

Some epidemiological studies have stated that cervical infection with high-risk Human papillomavirus (HPV) is a necessary, but not sufficient, cause of the development of cervical cancer, which is considered to be a disease of slow progression. This is because it is preceded by precursor lesions called cervical intraepithelial neoplasia which are classified here as NIC 1, NIC 2 and NIC 3. Markers such as p16^{INK4a} and Ki-67 have been studied with the aim of identifying lesions with a high risk of evolution. The purpose of this study is to evaluate the expression of the p16^{INK4A} and Ki-67 biomarkers in the histological findings of women who live in the interior of Pernambuco (the Agreste region) and are carriers of cervical and invasive intraepithelial lesions. 211 cases of women diagnosed by cytology were analyzed as carriers of i) low-grade intraepithelial lesions (LGIL), ii) high-grade intraepithelial lesions (HGIL) or iii) invasive carcinoma, and subsequently, the malign lesions were confirmed by histological examination. The immunohistochemical staining for the p16^{INK4A} and Ki-67 proteins was carried out through samples taken from the biopsies and waterproof containers that had representative tissues of the tumor. All the tumors showed signs of the HPV infection. The expression of p16^{INK4A} was observed in 100% of the cases of cancer, 97.6% of the cases of NIC 3, 83.3% of the cases of NIC 2, as well as in 55.4% of the cases of NIC 1. In addition, Ki-67 was observed in 100% of the cases of cancer, 98.8% of the cases of NIC 3, 83.3% of the cases of NIC 2, as well as in 69.6% of the cases of NIC 1. The results obtained in this study make it possible to relate the expression of p16^{INK4A} and Ki-67 to the atypical histological findings found in the samples of cervical patients infected with HPV.

Keywords: Human papillomavirus, cervical carcinoma, Ki-67, p16^{INK4A}.

Introduction

Epidemiological studies have stated that cervical infection with high-risk Human papillomavirus (HPV) is a necessary but not a sufficient reason for the development of cervical cancer, which is believed to be the fourth most common type of cancer and the second main cause of death to women in the world (Gargiulo *et al.*, 2007; Zur Hausen *et al.*, 2009; Arbyn *et al.*, 2011; Siegel *et al.*, 2016).

Uterine cancer tied to colon cancer is a disease of slow progression since it is preceded by precursor lesions called cervical intraepithelial neoplasia. These lesions are classified as NIC 1, NIC 2 and NIC 3 depending on the degree of epithelial damage and are characterized by a gradual loss of control of the cell division. (Steenbergen *et al.*, 2005).

The onset of the infection occurs with the penetration of the differentiation of the cells of the HPV at the basal lamina of the epithelial layer of skin tissue and mucous membrane, usually through tiny scars. Following this, a sequence of occurrences related to vegetative viral functions takes place which are caused by determined genes, located in regions, with mutations regarded as precocious or retarded, depending on the pattern of expression of the viral genes (Brentjens *et al.*, 2002; Abu *et al.*, 2005).

The process which leads to the development of a squamous invasive lesion seems to be related to HPV activity in the cell genome through the permissivity of the immunological system (Sano *et al.*, 1998). Markers such as p16^{INK4a} e Ki-67 have been studied with the aim of identifying lesions with a risk evolution, since many lesions, in particular those of low risk, will regress (Sano *et al.*, 1998; Virmani *et al.*, 2001; Giarre *et al.*, 2001).

The cell protein of p16^{INK4a}, a cyclin-dependent kinase inhibitor, was found to be highly superexpressive in almost all the high-grade precursor lesions and in invasive uterine cancer of the cervix (Wentzensen & von Knebel, 2007 and Tsoumpouet *et al.* 2009). The expression of this cell-cycle regulatory protein is directly related to the transforming activity of E7 viral oncoprotein of high risk HPV at the molecular level. When it is recognized that the prolonged inactivation of the tumor suppressor protein

pRb, through the E7 oncoprotein, is necessary for the maintenance of the malignant phenotype associated with HPV in cancerous cells, the detection of the superexpression of p16^{INK4A} can be useful as a highly sensitive alternative marker, in particular for the inactivation of pRb in epithelial cells transformed by HPV. Several studies have assessed the function of p16^{INK4A} as a diagnostic marker of the progression of cervical lesions (Keating, 2001; Klaes *et al.*, 2001; Agoff, 2003; Wang, 2004; Kalof *et al.*, 2005; Lorenzato, 2005; Benevolo, 2006; Ozaki, 2011). In addition, p16^{INK4A} is a tumor suppressor protein that is responsible for the block events in the G1 phase of the cell cycle when there are DNA anomalies that appear, in a superexpressed way, in high grade dysplasia and cervical carcinomas (Klaes *et al.*, 2001).

Currently, histological proliferation markers are being widely used to keep a check on the progression, as well as the degree of malignity, of several types of neoplasia, including cervical cancer (Kalof *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2007; Walts *et al.*, 2009). The Ki-67 protein is regarded as one of the principal histological proliferation markers, where the evaluation of the number of positive cells for Ki-67 in the cervical epithelium can be applied to differentiate the grades of cervical lesions and is considered to be a supplementary tool for histological diagnosis (Kruse *et al.*, 2001; Keating *et al.*, 2001; Middleton *et al.*, 2003; Buban *et al.*, 2009). The Ki-67 protein is present in the cells during all the phases of the cell cycle (G1, S, G2 and mitosis), since it is expressed in the nucleus. Hence when there are cytological anomalies such as HPV infection, it can be used as a biomarker that can assist in the investigation and prognosis of the disease (Brown & Gatter, 2002; Silva-Filho *et al.*, 2005).

The aim of this study was to perform an association study between p16^{INK4A} and Ki-67 biomarker with histological diagnosis CIN 1, CIN 2, CIN 3 and cancer in cervical samples of uterine cervix positive for HPV.

Methodology

The population investigated

The study involved conducting an analysis of 211 cases of women with cancer, with ages ranging from 19 to 72 (the average age being 42.5) and who reside in the Agreste Region of the State of Pernambuco. Their diagnosis for cytological examinations was positive for LSIL, HSIL or invasive carcinoma, and was subsequently sent for histological confirmation (NIC-I, II, III, Squamous Carcinoma and Adenocarcinoma), in the period 2009 - 2010.

The data were obtained from the file of a private laboratory located in the town of Garanhuns. The case where women either knew about, or had been vaccinated against, HPV were excluded.

Ethical factors in the research

This study was undertaken after being approved by the Research Ethics Committee (REC) of the Federal University of Pernambuco (CAE: 0285.0.172.00-11).

Immunohistochemical Staining p16^{INK4A} and Ki-67

The immunohistochemical staining for the p16^{INK4A} and Ki-67 proteins was carried out through samples collected for the biopsies and waterproof containers which had representative tissues of the tumor. Cuts were made of 4µm thick waterproof blocks and the avidin-biotin-peroxidase technique was employed. The antibodies used were rat monoclones against the following proteins: anti-p16^{INK4A} (DAKO Cytomation, K5334, clone E6H4, dilution 1:25) and Ki-67(Dako, code: N1633, Denmark; dilution 1:50). The antigen retrieval was conducted at 100°C by a micro-wave oven. The laminas underwent cooling at room temperature and the endogenous peroxidase blocking lasted for 7.5 minutes in the peroxidase blocking solution. The laminas were incubated with chromogen diaminobenzene solution, washed in water, counter-colored with hematoxylin, dehydrated and mounted. The analysis of immunoreactivity was conducted through the detection of the p16^{INK4A} protein in the nucleus and cytoplasm of the epithelial cells and described in terms of the following scores: Positive (moderate and strong reactivity in more than 10% of the epithelial cells), Negative (moderate or strong reactivity in less than 10% of the epithelial cells).

Results

A total of 211 positive HPV cervical samples (56 samples of NIC 1, 36 samples of NIC 2, 82 samples of NIC 3 and 37 samples of cancer) were analyzed on the basis of the immunoreactivity of the p16 and Ki67 markers. Tables 1 and 2 show the correlation between the percentage of markers with a strong expression of p16 and Ki67 and the grades of cervical neoplasia, respectively.

Table 1. Immunohistochemical expression of p16^{INK4A} in 211 samples (HPV positive) of uterine cancer.

Histopathological diagnosis D	p16 positive N (%)	p16 negativeN (%)
NIC 1*	31 (55.4%)	25 (44.6%)
NIC 2**	30 (83.3%)	6 (16.7%)
NIC 3***	80 (97.6%)	2 (2.44%)
Câncer	37 (100%)	-

*NIC 1: Cervical Intraepithelial Neoplasia 1.

**NIC 2: Cervical Intraepithelial Neoplasia 2.

***NIC 3: Cervical Intraepithelial Neoplasia 3.

Table 2. Immunohistochemical expression Ki-67 in 211 samples (HPV positive) of uterine cancer.

Histopathological Diagnosis	Ki67 positive N (%)	Ki67 negative N (%)
NIC 1*	39 (69.6%)	17 (30.4%)
NIC 2**	30 (83.3%)	6 (16.7%)
NIC 3***	81 (98.8%)	1 (1.20%)
Câncer	37 (100%)	-

*NIC 1: Cervical Intraepithelial Neoplasia 1.

**NIC 2: Cervical Intraepithelial Neoplasia 2.

***NIC 3: Cervical Intraepithelial Neoplasia 3.

The expression of p16 was observed in all of the 37 cases of cancer (100%), in 80 of the 82 cases of NIC 3 (97.6%), 30 of the 36 cases of NIC 2 (83.3%), as well as in 31 of the 56 cases of NIC 1 (55.4%) (Table 1). At the same time, the expression of Ki67 was observed in all the 37 cases of cancer (100%), in 81 of the 82 cases of NIC 3 (98.8%), 30 of the 36 cases of NIC 2 (83.3%), as well as in 39 of the 56 cases of NIC 1 (69.6%) (Table 2).

Discussion

The expression of p16^{INK4A} (p16 positive) is closely correlated with HPV infection, both in cervical lesions and in the squamous cell carcinomas of the head and neck (Stephen *et al.*, 2013). Some studies have drawn attention to the subjectivity of morphological examinations and questioned whether the histopathology can be viewed as a gold standard; this can lead to false-positive or negative results from the diagnosis (Klaes *et al.*, 2002). The p16^{INK4A} protein constitutes the marker that has been most studied for progression of the NIC and the determination of its expression has already been used to mark at-risk patients with a negative biopsy. In addition, an increase of p16^{INK4A} expression has already been found in high-grade lesions such as NIC 2 and NIC 3 (Klaes *et al.*, 2001). The sorting of the results of the tests (with regard to negative signs of the Papanicolaou/ positive for HPV with cytology based on the p16^{INK4A} biomarker) can identify women with a high probability of having high-grade intraepithelial neoplasia. These tests can be an effective means of supplementing surveillance programs based on research for HPV infection, to prevent cervical cancer. (Petryet *al.*, 2011). In this study, it was found – in a way that corresponded with the findings of other studies (Guimarães *et al.*, 2005; Branca *et al.*, 2004; Klaes *et al.*, 2002, Keating *et al.*, 2001), - that the great majority of cases of NIC 2, NIC 3 and cancer were marked for

p16, 83.3%, 97.6% and 100%, respectively. With regard to the cases of NIC 1, our data show that 55.4% of the samples had positivity for p16^{INK4A}. According to Kalof *et al.* (2006), the expression of p16 in samples of NIC 1 can be related to the persistence of HPV infection. The positivity for the expression of p16^{INK4A} was consistent with the greater frequency of oncogenic types of HPV in high-grade intraepithelial neoplasia, since it only occurred in lesions where HPV-16, 18, 31, 33 or 35, were detected, either in single or multiple conditions.

With regard to the expression of Ki-67, some studies have drawn attention to the assessment of the number of positive cells for Ki-67 in the epithelium. This represents an auxiliary tool for the diagnosis of cervical lesions which can be used to differentiate the cervical neoplasia from benign cervical lesions, as well as to distinguish between the different grades of the lesions (Kruse *et al.*, 2001; Song *et al.*, 2007). Several studies found evidence that the expression of Ki-67 is associated with the degree of gravity of the cervical lesions (Kruse *et al.*, 2001; Lorenzato *et al.*, 2005; Walts *et al.*, 2009). This was confirmed in a way that was consistent with the findings of other studies (Kruse *et al.*, 2001; Lorenzato *et al.*, 2005; Walts *et al.*, 2009), where the great majority of the cases of NIC 2, NIC 3 and cancer were positive for Ki-67.

In conclusion, the results obtained in this study underline the importance of the use of the p16^{INK4A} and Ki-67 markers for the confirmation of the diagnosis of high-grade squamous intraepithelial lesions (NIC 2 and NIC 3), as well as the possible identification of low-grade squamous intraepithelial lesions (NIC 1) in association with the risk of progression.

References

Abu J, Batuwangala M, Herbert K, Symonds P. Retinoic acid and retinoid receptors: potential chemopreventive and therapeutic role in cervical cancer. *The Lancet*. London. v. 6, n. 9, p. 712-720, 2005.

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.* v. 16, n. 7, p. 665-673, 2003.

Arbyn M, Castellsagué X, de Sanjosé S, Bruni L, Saraiya M, Bray F, et al. Worldwide burden of cervical cancer in 2008. *Ann Oncol.* 2011.

Benevolo M, Mottotese M, Marandino F, Vocaturo G, Sindico R, Piperno G, Mariani L, Sperduti I, Canalini P, Donnorso RP, Vocaturo A. Immunohistochemical expression of p16 (INK4a) is predictive of HR-HPV infection in cervical low-grade lesions. *Mod. Pathol.* v. 19, n. 3, p. 384-91, 2006.

Branca M, Ciotti M, Santini D, Di Bonito L, Giorgi C, Benedetto A, Paba P, Favalli C, Costa S, Agarossi A, Alderisio M, Syrjänen K. 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.* v. 23, n. 4, p. 354-365, 2004.

Brentjens MH, Yeung-yue KA, Lee PC, Tyring SK Human papillomavirus: a review. *Dermatol Clin.* Amsterdam. v. 20, n. 2, p. 315-331, 2002.

Brown DC, Gatter KC. Ki67 protein: the immaculate deception? *Histopathology*. v. 40, n. 1, p. 2-11, 2002.

Bubán T, Tóth L, Tanyi M, Kappelmayer J, Antal-Szalmás P. Ki-67 - new faces of an old player. *Orv Hetil*. v. 150, n. 23, p.1059-1070, 2009.

Gargiulo F, de Francesco MA, Schreiber C, Ciravolo G, Salinaro F, Valloncini B, Manca N. Prevalence and distribution of single and multiple HPV infections in cytologically abnormal cervical samples from Italian women. *Virus Res. Amsterdam*. v. 125, n. 2, p. 176-182, 2007.

Giarre M, Caldiera S, Malanchi I, et al. Induction of pRb degradation by the Human papillomavirus type 16 E7 protein is essential to efficiently overcome p16INK4a - imposed G1 cell cycle arrest. *J. Virol*. v. 75, p. 4705-4712, 2001.

Guimarães MC, Gonçalves MA, Soares CP, Bettini JS, Duarte RA, Soares EG. Immunohistochemical expression of p16INK4a and bcl-2 according to HPV type and to the progression of cervical squamous intraepithelial lesions. *J. Histochem. Cytochem*. v. 53, n. 4, p. 509-516, 2005.

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*. v. 29, n. 5, p. 674-679. 2005.

Kalof AN, Cooper K. p16INK4a immunoexpression: surrogate marker of high-risk HPV and high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Adv. Anat. Pathol*. v. 13, n. 4, p. 190-194, 2006.

Keating JT, Cviko A, Riethdorf S, Riethdorf L, Quade BJ, Sun D, et al. Ki67, Cyclin E and p16^{INK4a} are complementary biomarkers for human papilloma virus – related cervical neoplasia. *Am. J. Pathol*, v. 25, p. 884-891, 2001.

Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U, Dallenbach-Hellweg G, Schmidt D, Von Knebel Doeberitz M. Overexpression of p16^(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int. J. Cancer. Bathesda*. v. 92, n. 1, p. 276-284, 2001.

Klaes R, Benner A, Friedrich T, Ridder R, Herrington S, Jenkins D, Kurman RJ, Schmidt D, Stoler M, von Knebel Doeberitz M. p16INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J SurgPathol*. v. 26, n. 11, p. 1389-99, 2002.

Kruse AJ, Baak JP, de Bruin PC, Jiwa M, Snijders WP, Boodt PJ, Fons G, Houben PW, The HS. Ki-67 immunoquantitation in cervical intraepithelial neoplasia (CIN): a sensitive marker for grading. *J. Pathol*. v. 193, n. 1, p. 48-54, 2001.

Lorenzato M, Caudroy S, Bronner C, Evrard G, Simon M, Durlach A, Birembaut P, Clavel C. Cell cycle and/or proliferation markers: what is the best method to discriminate cervical high-grade lesions? *Hum. Pathol.* v. 36, n. 10, p. 1101-1107, 2005.

Middleton K, Peh W, Southern S, Griffin H, Sotlar K, Nakahara T, El-Sherif A, Morris L, Seth R, Hibma M, Jenkins D, Lambert P, Coleman N, Doorbar J. Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers. *J. Virol.* v. 77, n. 19, p. 10186-10201, 2003.

Ozaki S, Zen Y, Inoue M. Biomarker expression in cervical intraepithelial neoplasia: potential progression predictive factors for low-grade lesions. *Hum. Pathol.* v. 42, n. 7, p. 1007-1012, 2011.

Petry KU, Schmidt D, Scherbring S, Luyten A, Reinecke-Lüthge A, Bergeron C, Kommos F, Löning T, Ordi J, Regauer S, Ridder R. Triaging Pap cytology negative, HPV positive cervical cancer screening results with p16/Ki-67 Dual-stained cytology. *Gynecol. Oncol.* v. 121, n. 3, p. 505-509, 2011.

Sano T, Oyama T, Kashiwabara K et al. Expression status of p16 protein is associated with Human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. *Am. J. Pathol.* v. 153, p. 1741-1747, 1998.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2016. *CA Cancer J Clin.* v. 16, n.66, p. 7-30, 2016.

Silva-Filho AL, Bruno BN, Silva LB, Traiman P, Silva JGC, Triginelli S A. Associação entre a expressão das proteínas p53 e Ki-67 e os achados clínicos-patológicos em pacientes com carcinoma invasor de colo uterino. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia.* v. 27, n. 5, p. 243-247, 2005.

Song SH, Park HM, Eom DW, Lee JK, Lee NW, Kim AR, Hur JY, Lee KW, Park YK, Saw HS. The expression of p16 (INK4a) and Ki-67 in relation to high-risk human papilloma viral load and residual disease after conization with positive margins. *Int. J. Gynecol. Cancer.* v. 17, n. 4, p. 858-867, 2007.

Steenbergen RDM, Wilde J, Wilting SM, Brink AATP, Snijders PJF and Meijer CJLM HPV-mediated transformation of the anogenital tract. *J. Clin. Virol.* v. 32, p. 25-33, 2005.

Stephen JK, Divine G, Chen KM, Chitale D, Havard S, Worsham MJ. Significance of p16 in Site-specific HPV Positive and HPV Negative Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Clin. Oncol.* v. 2, n. 1, p. 51-61, 2013.

Tsompou I, Arbyn M, Kyrgiou M, et al. p16INK4a immunostaining in cytological and histological specimens from the uterine cervix: a systematic review and metaanalysis. *Cancer Treatment. Rev.* v. 35, p. 210-220, 2009.

Virmani AK, Muller C, Rathi A, et al. Aberrant methylation during cervical carcinogenesis. *Clin. Cancer Res.* v. 7, p. 584-589, 2001.

Walters AE, Bose S. p16, Ki-67, and BD ProExC immunostaining: a practical approach for diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Hum. Pathol.* v. 40, n. 7, p. 957-964, 2009.

Wang JL, Zheng BY, Li XD, Angström T, Lindström MS, Wallin KL. Predictive significance of the alterations of p16INK4A, p14ARF, p53, and proliferating cell nuclear antigen expression in the progression of cervical cancer. *Clin. Cancer Res.* v. 10, n. 7, p. 2407-2414, 2004.

Wentzensen N, Von Knebel Doeberitz M. Biomarkers in cervical cancer screening. *Dis. Markers.* v. 23, p. 315-330, 2007.

Zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. *Virology.* v. 384, p. 260-265, 2009.

ANEXO – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DO CCS-UFPE



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Comitê de Ética em Pesquisa

Av. da Engenharia, s/n – 1º Andar, Cid. Universitária, CEP 50740-600, Recife - PE.
Tel/fax: 81 2126 8588 - www.ufpe.br/ccs; e-mail: cepccs@ufpe.br

Of. Nº. 894/2011 - CEP/CCS

Recife, 24 de novembro de 2011

Registro do SISNEP FR - 424538
CAAE –0285.0.172.000-11
Registro CEP/CCS/UFPE Nº 309/11
Título: Perfil Genotípico da infecção por papiloma vírus humano e sua correlação com as lesões epiteliais cervicais em mulheres do interior de Pernambuco - Brasil
Pesquisador Responsável: Jacinto da Costa Silva Neto

Senhor (a) Pesquisador (a):

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) registrou e analisou de acordo com a Resolução N.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, o protocolo de pesquisa em epígrafe, liberando-o para início da coleta de dados em 24 de novembro 2011.

Ressaltamos que a aprovação definitiva do projeto será dada após a entrega do relatório final, conforme as seguintes orientações:

- a) Projetos com, no máximo, 06 (seis) meses para conclusão: o pesquisador deverá enviar apenas um relatório final;
- b) Projetos com períodos maiores de 06 (seis) meses: o pesquisador deverá enviar relatórios semestrais.

Dessa forma, o ofício de aprovação somente será entregue após a análise do relatório final.

Atenciosamente

Prof. Geraldo Bosco Lindoso Couto
Coordenador do CEP/ CCS / UFPE

A
Jacinto da Costa Silva Neto
Departamento de Histologia e Embriologia – CCS/UFPE