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

CATHARINE DE ARAÚJO CRISÓSTOMO PONTES

PERFIL IMUNOCITOQUÍMICO DAS PROTEÍNAS Ki-67 e TOPIIα EM PACIENTES COM ANORMALIDADES CERVICAIS

RECIFE, 2017

CATHARINE DE ARAÚJO CRISÓSTOMO PONTES

PERFIL IMUNOCITOQUÍMICO DAS PROTEÍNAS Ki-67 e TOPIIα EM PACIENTES COM ANORMALIDADES CERVICAIS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia do Centro de Ciências da Saúde para obtenção do Grau de Mestre em Patologia, da Universidade Federal de Pernambuco.

Linha de pesquisa: Aspectos Biotecnológicos e Microbiológicos Aplicados à Patologia

Orientador: Prof. Dr. Mário Ribeiro de Melo Júnior

Co-orientadora: Prof. Dra. Adrya Lúcia Peres Bezerra de Medeiros

RECIFE, 2017

Catalogação na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

P814p Pontes, Catharine de Araújo Crisóstomo.

Perfil imunocitoquímico das proteínas Ki-67 e TOPIIα em pacientes com anormalidades cervicais / Catharine de Araújo Crisóstomo Pontes. – 2017.

55 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientador: Mário Ribeiro de Melo Júnior.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Patologia. Recife, 2017.

Inclui referências e anexos.

1. Topoisomerase. 2. Cervicite uterina. 3. Imunocitoquímica. 4. HPV. I. Melo Júnior, Mário Ribeiro de (Orientador). II. Título.

616.07 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2017-088)

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

Centro de Ciências da Saúde - UFPE

Av. Prof. Moraes Rego 1235 - Cidade Universitária - CEP: 50670-901 - Recife – PE

DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PARA OBTENÇÃO DO TITULO DE MESTRE EM PATOLOGIA.

AUTORA: Catharine de Araújo Crisóstomo Pontes

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Patologia

NOME DA DISSERTAÇÃO: "Perfil Imunocitoquímico das Proteínas Ki-67 e TOPIIα em Pacientes com Anormalidades Cervicais"**.**

ORIENTADOR: Prof. Dr. Mário Ribeiro Melo Júnior

DATA DA DEFESA: 31 de janeiro de 2017

BANCA EXAMINADORA:

_____

Profa. Dra. Manuela Figueiroa Lyra de Freitas

_____

Profa. Dra. Tássia Campos de Lima e Silva

_____

Profa. Dra. Adriana Maria da Silva Telles

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

R E I T O R
Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE- REITOR
Profª. Florisbela de Arruda Camara e Siqueira Campos

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Prof. Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
Prof. Nicodemos Teles de Pontes Filho

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA
Profª. Adriana Maria da Silva Telles

COORDENADOR DO MESTRADO EM PATOLOGIA
Profª. Manuela Figueiroa Lyra de Freitas

VICE-COORDENADOR DO MESTRADO EM PATOLOGIA
Prof. Jacinto Costa Neto

SECRETÁRIA DO MESTRADO EM PATOLOGIA
Margarete Valdevino da Silva

Dedico este trabalho a Deus,
a minha família e
a meus amigos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela sua infinita sabedoria e generosidade.

Aos meus pais, Manoel e Márcia, por todo o amor dedicado, por todo zelo com a minha educação e por sempre acreditarem e incentivarem os meus sonhos.

Ao meu esposo, Menelau Júnior, pela compreensão e por estar ao meu lado em todas as horas, me impulsionando a alçar voos cada vez mais distantes.

A minha irmã, Carolline, pelas experiências que compartilhamos e por me manter sempre motivada.

Ao professor Mário Ribeiro, por ser um exemplo de docente e um excelente orientador, por ter aberto caminhos e viabilizado a execução desse trabalho.

A minha querida professora Adrya Peres, que sempre esteve ao meu lado desde a graduação; uma pessoa iluminada por Deus, com certeza. Agradeço pelos ensinamentos, pela parceria e por acreditar na minha capacidade.

Ao professor Carlos Eduardo, por todo o incentivo e por contribuir diretamente para a execução desta pesquisa

A todos que fazem parte do Centro de Referência de Saúde da Mulher Maria de Lourdes Lopes de Lemos, em especial a Alda, Mônica, Tereza, Dra Socorro, Dra Márcia e Samara, por toda gentileza de me acolherem tão bem durante o período de coleta das amostras.

Às amizades construídas durante o mestrado que certamente levarei para toda vida: Ana Karina, Ana Paula, Ingrid Tavares, Kassia Fabíola e todos os colegas de turma que dividiram comigo momentos de aflições e felicidade durante toda essa jornada.

Ao Programa de Pós-Graduação em Patologia; à coordenadora, Manuela Figueroa; e à secretária, Margarete Valdevino, por conduzirem o programa com zelo e competência.

À banca examinadora, por aceitar o convite e por contribuir de forma significativa para a conclusão deste trabalho.

E por fim, agradeço a minha filha, Maria Laura, que, mesmo ainda em meu ventre, me motivou a concluir este trabalho; espero ansiosamente tê-la em meus braços em breve.

“O que a escultura é para um bloco de mármore,
a educação é para o espírito.”
Joseph Addison – poeta inglês
(1672-1719)

RESUMO

O câncer cervical é a quarta neoplasia mais diagnosticada em mulheres no mundo e tem como principal agente etiológico a infecção pelo Papillomavirus Humano (HPV), que induz à proliferação descontrolada das células, levando ao acúmulo de mutações ao longo do tempo podendo levar ao câncer. A expressão anormal de proteínas nucleares, como Ki-67 e TOPIIα, indica desregulação do ciclo celular e pode, em conjunto com outros testes, melhorar a acurácia dos programas de rastreamento. Este estudo objetivou avaliar a detecção dos marcadores Ki-67 e TOPIIα, através da técnica de imunocitoquímica, em pacientes com anormalidades cervicais, observando a possibilidade de detectar lesões clinicamente relevantes, melhorando a sensibilidade da citologia. Participaram do estudo 76 mulheres encaminhadas a um Centro de referência por apresentarem alterações em exames anteriores ou mesmo condilomas, que representam a infecção clínica pelo HPV. Observou-se um maior índice de positividade (IP) de Ki-67 e TOPIIα nas pacientes diagnosticadas com anormalidades cervicais detectadas pela citologia (41,6% e 62,5%, respectivamente). O desempenho do Ki-67 foi melhor em pacientes com LSIL (IP igual a 50%), e TOPIIα teve um melhor desempenho em pacientes com HSIL (66,6%). O teste de associação entre a imunocitoquímica e a citologia em base líquida revelou-se estatisticamente significante ($p< 0,05$) com valor de p=0,0026 para Ki-67 e p=0,0004 para TOPIIα. Os marcadores analisados, Ki-67 e TOPIIα, se mostraram eficientes na detecção de lesões cervicais clinicamente relevantes, dada a forte associação entre a expressão desses marcadores em pacientes diagnosticadas com anormalidades cervicais pela citologia.

Palavras-chave: Topoisomerase. Cervicite Uterina. Imunocitoquímica. HPV.

ABSTRACT

Cervical cancer is the fourth most diagnosed neoplasia in women in the world and its main etiological agent is infection by the Human Papillomavirus (HPV), which induces the uncontrolled proliferation of cells, leading to the accumulation of mutations over time and to cancer in some cases. The abnormal expression of nuclear proteins, such as Ki-67 and TOPIIα, indicating dysregulation of the cell cycle and can, in conjunction with other tests, improve the accuracy of screening programs. This study aimed to evaluate the detection of Ki-67 and TOPIIα, through the technique of immunocytochemistry in patients with cervical abnormalities, noting whether they are useful to detect clinically relevant lesions, improving the sensitivity of cytology. 76 women participated in the study referred to a reference centre for presenting changes in previous tests or even Condyloma, representing clinical infection by HPV. It was observed a higher rate of positivity (IP) of Ki-67 and TOPIIα in patients diagnosed with cervical abnormalities detected by cytology (41.6% and 62.5%, respectively). Seventh six women participated in the study referred to a reference centre for presenting changes in previous tests or even condylomas, representing clinical infection by HPV. It was observed a higher rate of positivity (RP) of Ki-67 and TOPIIα in patients diagnosed with cervical abnormalities detected by cytology (41.6% and 62.5%, respectively). The performance of the Ki-67 was better in patients with LSIL (equal to 50%) and TOPIIα had a better performance in patients with HSIL (66.6%). The test of association between the immunocytochemistry and liquid-based cytology proved to be statistically significant ($p < 0.05$) with value of $p = 0.0026$ for Ki-67 and $p = 0.0004$ to TOPIIα. The markers analysed, Ki-67 and TOPIIα, have proven effective in the detection of cervical lesions clinically relevant, given the strong association between the expression of these markers in patients diagnosed with cervical abnormalities for cytology.

Key words: Topoisomerase. Cervicitis. Imunocytochemistry. HPV.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANTI-KI 67 - Anticorpo Ki 67

ANTI-TOP IIα – Anticorpo Topoisomerase IIα

AR-HPV – Papiloma Vírus Humano de Alto Risco Oncogênico

ASC-H – Atipia Escamosa de Significado Indeterminado não Excluindo Lesão de Alto Grau

ASC-US – Atipia Escamosa de Significado Indeterminado

CC – Câncer Cervical

HPV – Papiloma Vírus Humano

HSIL – Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau

INCA – Instituto Nacional do Câncer José de Alencar Gomes da Silva

IARC - International Agency for Research on Cancer

IP – Índice de Positividade

LIKA – Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami

LSIL – Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau

NIC III – Neoplasia Cervical Grau III

NILM – Negativo para Lesão Intraepitelial Maligna

pRb – Proteína do Retinoblastoma

SUS – Sistema Único de Saúde

TCLE –Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TOP IIα – DNA Topoisomerase IIα

UFPE – Universidade Federal de Pernambuco

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Estatísticas Globais do Câncer. (Página15)

FIGURA 2 –Taxas de incidência e mortalidade do câncer cervical por área no mundo. (Página 16)

FIGURA 3 –Estimativa de novos casos de câncer em mulheres brasileiras para o ano de 2016. (Página 16)

FIGURA 4 – Ciclo de vida do HPV. (Página 18)

FIGURA 5 – Ação da proteína Rb sobre o ciclo celular (Página 20)

FIGURA 6 – Ação do HPV sobre o ciclo celular (Página 21)

FIGURA 7 – Citologia em meio líquido (Página 23)

FIGURA 8 – Reação Imunocitoquímica. Micropolímero de Enzimas. Sistema de Três Etapas. (Página 26)

FIGURA 9 – Preparação laboratorial das lâminas para estudo citológico e imunocitoquímico. (Página 31)

FIGURA 10: A1 e A2 – Reação imuno-histoquímica positiva para Ki-67 em biópsia cervical de paciente com NIC III. (Página 33)

FIGURA 11: B1 e B2 – Reação imuno-histoquímica positiva para TOPIIα em biópsia cervical de paciente com NIC III. (Página 33)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 13
2. DESENVOLVIMENTO 15
2.1 CÂNCER CERVICAL E O PAPILLOMAVIRUS HUMANO (HPV) 15
2.1.1 Epidemiologia do Câncer Cervical 15
2.1.2 Papillomavirus Humano (HPV) 17
2.1.3 Epidemiologia da Infecção por HPV 18
2.1.4 O papel do HPV no desenvolvimento do câncer cervical 19
2.2 EXAME CITOPATOLÓGICO 21
2.3 BIOMARCADORES 23
2.3.1 Uso de Biomarcadores no Rastreio do Câncer Cervical 23
2.3.2 Biomarcadores Ki-67 e DNA topoisomerase IIα (TOPIIα) 23
2.3.3 Imunocitoquímica 24
2.4 HIPÓTESE 26
2.5 JUSTIFICATIVA 27
2.6 OBJETIVOS 28
2.7 METODOLOGIA 29
2.7.1 Tipo de Estudo 29
2.7.2 Amostra e Local de Estudo 29
2.7.3 Critérios de Inclusão e Exclusão 29
2.7.4 Coleta do Material Cervical (Ectocérvice e Endocérvice) 29
2.7.5 Protocolo de preparação das lâminas a partir da base líquida 30
2.7.6 Estudo Citopatológico 31
2.7.7 Estudo Imunocitoquímico 31
2.7.8 Reação Imunocitoquímica para detecção de Ki-67 e TOPIIα 32
2.7.9 Análise de Dados 33
2.7.10 ARTIGO ORIGINAL 34
3. CONCLUSÃO 46
REFERÊNCIAS 47
ANEXOS 52
Anexo A – Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa 52
Anexo B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido 55

1. INTRODUÇÃO

As estatísticas sobre o câncer de colo uterino ainda trazem dados alarmantes sobre a incidência desta doença na população brasileira. Embora a citologia tenha sido instituída no Brasil há várias décadas como método de rastreamento para controle do câncer cervical (CC), dados do INCA, publicados em 2016, estimam uma incidência de 16.340 casos no Brasil, o que torna este tipo de câncer o terceiro mais frequente na população feminina. Uma alta incidência também foi estimada para o estado de Pernambuco (INCA, 2015).

Descobrir o agente etiológico desta neoplasia foi um passo importante no conhecimento desta doença. Em 1983, o médico e virologista alemão Dr. Harald Zur Hausen, juntamente com colaboradores, conseguiu isolar o Papillomavirus Humano (HPV) 16, um dos tipos mais envolvidos na carcinogênse cervical (Erickson, et al., 2013). A infecção por HPV é uma doença sexualmente transmissível bastante difundida na população. A grande maioria das infecções não leva a câncer, mas alguns tipos de HPV, considerados de alto risco oncogênico, têm um maior potencial de integração ao genoma do indivíduo infectado. Essa integração, assim como a expressão de onconproteínas virais, promove alterações em diversas proteínas relacionadas com ciclo celular, podendo levar ao bloqueio da apoptose e proliferação celular descontrolada (Brown, et al., 2012).

O controle da doença é feito principalmente através do rastreio citológico da população-alvo, com o intuito de detectar mulheres com lesões pré-malignas. A avaliação da lesão é seguida pela realização de outros testes, como a colposcopia e o exame histopatológico, e, se necessário, o tratamento é disponibilizado. Como há um intervalo de anos para que a displasia encontrada progrida para um processo invasivo, o diagnóstico precoce e o tratamento adequado previnem o desenvolvimento do câncer (Wright, et al., 2012).

A experiência de muitos países desenvolvidos, com programas de rastreamento organizados, com alta cobertura da população-alvo e que periodicamente realizam o rastreio citológico em intervalos frequentes, tem demonstrado ser bastante eficiente na redução da incidência do câncer cervical. Porém, manter toda a complexidade e infraestrutura de um programa de rastreamento bem estabelecido não é algo fácil e tem sido um grande desafio para os países com menos recursos. Esses desafios têm estimulado a busca por alternativas que aperfeiçoem o diagnóstico citológico (Astbury, et al., 2006).

Os marcadores moleculares têm-se mostrado uma alternativa interessante. O Ki-67 e a Topoisomerase IIα (TOP IIα) são exemplos de proteínas que se expressam anormalmente durante a infecção por HPV. O Ki-67 é considerado um marcador de proliferação celular. Ele é expresso em pacientes não infectadas pelo vírus, no compartimento proliferativo do epitélio escamoso (camada basal e parabasal), porém, em infecções persistentes por HPV, a expressão desse marcador aumenta consideravelmente e se estende acima do terço basal do epitélio (Sahebali, et al., 2003). A TOP IIα é uma enzima indispensável à proliferação celular, também se encontra expressa anormalmente quando a fase S do ciclo está descontrolada (Pinto, et al., 2010).

A expressão aumentada dessas proteínas pode ser detectada através de técnicas laboratoriais, como a imunocitoquímica. As principais vantagens dos marcadores é a possibilidade de predizer o risco de progressão de uma anormalidade citológica, o aumento na concordância interobservador e o auxílio em casos de dúvidas diagnósticas (Ozaki, et al., 2011).

Dada a importância da citologia na rotina e o auxílio dos marcadores moleculares na eficiência diagnóstica, este estudo se propôs a avaliar a detecção dos marcadores Ki-67 e TOPIIα em pacientes com anormalidades cervicais de diferentes graus ou que apresentam infecção clínica por HPV. Essas anormalidades foram monitoradas através do rastreio citológico, com o intuito de determinar a efetividade dos marcadores nas lesões pré-malignas do colo uterino. A intenção é responder se estes marcadores são úteis para evidenciar pacientes com lesões clinicamente relevantes, melhorando a sensibilidade do exame citológico.

2. DESENVOLVIMENTO

2.1 CÂNCER CERVICAL E O PAPILLOMAVIRUS HUMANO (HPV)

2.1.1 Epidemiologia do Câncer Cervical

O câncer cervical é o quarto tipo de neoplasia mais comumente diagnosticada e a quarta causa de morte por câncer em mulheres em nível mundial. Em 2012, foram estimados 527.600 novos casos da doença, e a taxa de mortalidade estimada foi de 265.700 casos, representando 7,5% das mortes por câncer em mulheres (Figura 1) (Torre, et al., 2015).

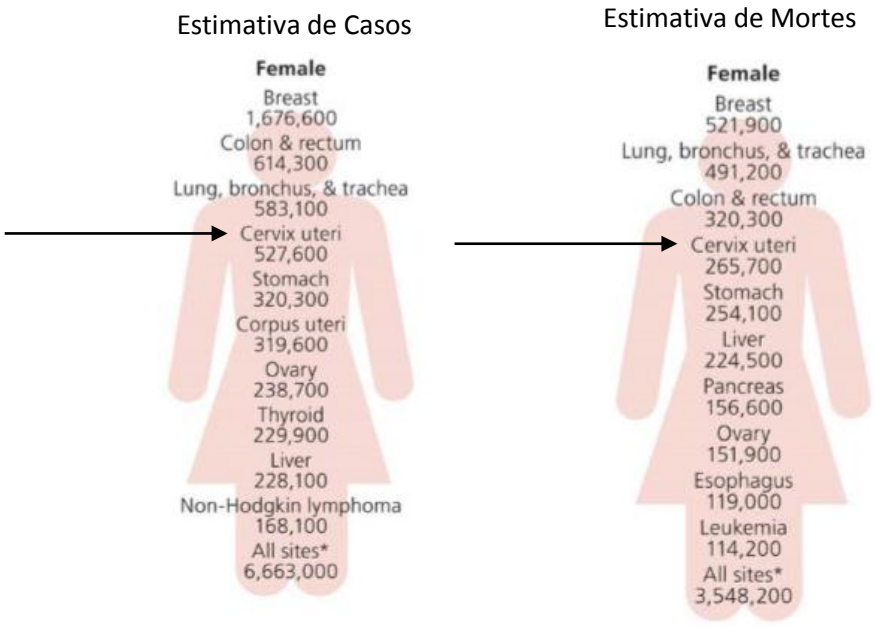

Figura 1: Estatísticas Globais do Câncer
Fonte: Torre, et al., 2015.
Acesso: maio/2015

Segundo Torre, et al., 2015, nos países em desenvolvimento, as taxas de incidência e mortalidade ajustadas para a idade foram de 15,7 e 8,3 por 100 mil mulheres, respectivamente; nos países desenvolvidos, essas taxas foram de 9,9 e 3,3 por 100 mil. A baixa incidência nos países desenvolvidos é alcançada através de investimentos substanciais em saúde para programas de rastreamento e avaliação diagnóstica. (Figura 2).

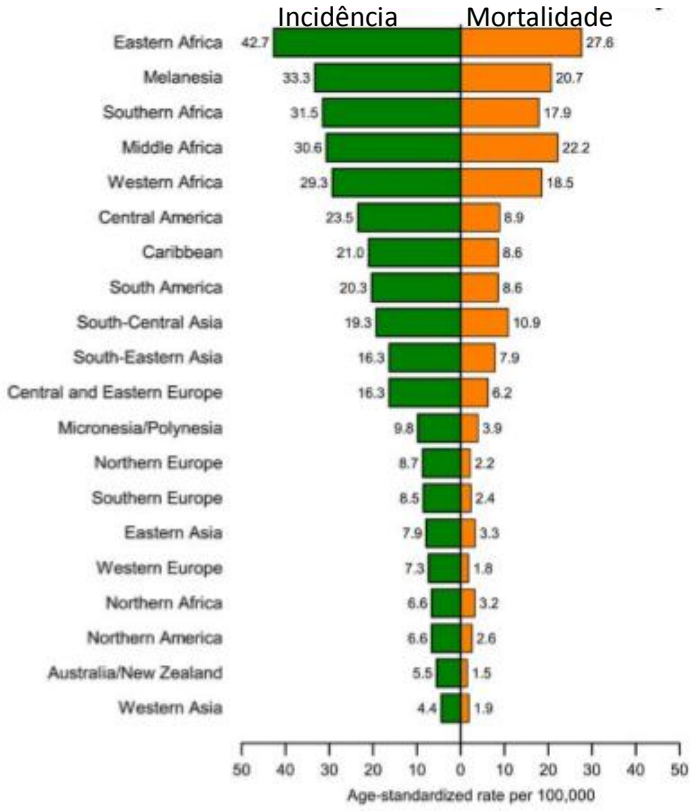

Figura 2: Taxas de incidência e mortalidade do câncer cervical por área no mundo
Fonte: Torre, et al., 2015
Acesso: maio/2015

No Brasil, o câncer cervical é o terceiro mais incidente e continua sendo uma causa relevante de mortalidade entre as mulheres. Dados do INCA estimam que ocorreram 16.340 casos em 2016 (Figura. 3).

Localização Primária	Casos Novos	%
Mama feminina	57.960	28,1%
Cólon e Reto	17.620	8,6%
Colo do útero	16.340	7,9%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Estômago	7.600	3,7%
Corpo do útero	6.950	3,4%
Ovário	6.150	3,0%
Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%
Leucemias	4.530	2,2%
Cavidade Oral	4.350	2,1%
Esôfago	2.860	1,4%
Pele Melanoma	2.670	1,3%
Bexiga	2.470	1,2%
Linfoma de Hodgkin	1.010	0,5%
Laringe	990	0,5%
Todas as Neoplasias sem pele*	**205.960**	
Todas as Neoplasias	300.870	

Figura 3: Estimativa de novos casos de câncer em mulheres brasileiras para o ano de 2016
Fonte: INCA
Acesso: Outubro/2016

Em Pernambuco, estima-se uma incidência de 20,23 casos a cada 100 mil mulheres, o segundo tipo de neoplasia mais incidente neste gênero (INCA, 2015).

Em relação à idade das pacientes, embora o câncer cérvico-uterino seja mais comum em mulheres acima dos 50 anos, nos países em desenvolvimento essa doença tem-se tornado cada vez mais incidente entre as mulheres durante seus anos reprodutivos (Echelman, et al., 2012).

2.1.2 Papillomavirus Humano (HPV)

Os Papillomavirus Humano (HPVs) são pequenos vírus de DNA circular de cadeia dupla, capsídeo icosaédrico, pertencentes à família *Papillomaviridae*. Seu genoma contém três regiões: uma regulatória, que exerce um controle sobre a transcrição e replicação do vírus; uma denominada "*Early*", que codifica as proteínas E1, E2, E4, E5, E6 e E7 para as funções virais iniciais; e uma região conhecida como "*Late*", que codifica as proteínas do capsídeo (L1 e L2) (Horvah C et al., 2011; Sahasrabuddhe VV, et al., 2011).

Atualmente, existem mais de 100 tipos diferentes de HPV. Cerca de 45 possuem um tropismo pelo epitélio do trato anogenital masculino e feminino. Esse grupo pode ser dividido com base no seu potencial oncogênico. Os HPVs de baixo risco oncogênico (BR-HPV), representados pelos tipos 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72, 81, 70, estão associados, principalmente, ao desenvolvimento de condilomas e lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau; e os HPVs de alto risco oncogênico (AR-HPV), cujos principais tipos são 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68 e 82, estão mais relacionados ao desenvolvimento de lesões precursoras e cânceres anogenitais (Stanley, 2010; Fedrizzi, 2011).

Na grande maioria dos casos, a transmissão do vírus ocorre através da relação sexual. A transmissão do HPV das mães para seus filhos também é possível no momento do parto, principalmente quando existem verrugas genitais. A transmissão iatrogênica, apesar de rara, é citada na literatura (Koss, et al., 1999).

Durante o contato sexual, o genoma do vírus é comumente depositado sobre a camada basal do epitélio cervical, que se torna exposto através de microlesões na superfície do epitélio. Ele depende da via de diferenciação dessas células para completar seu ciclo de vida (Enchelman, et al., 2012). Uma vez que o vírus consegue infectar um conjunto de células basais primitivas, há um ciclo de replicação do DNA viral, através da expressão dos genes E1, E2, E4, E5, E6 e E7, que amplificam um pequeno número de cópias do vírus (cerca de 50-100 cópias por célula). A célula infectada entra no compartimento proliferativo do epitélio e, nesta fase, a expressão do genoma

viral é mínima. Quando a célula infectada entra no compartimento de diferenciação, saindo do ciclo celular, há uma expressão aumentada de todos os genes virais. O número de cópias virais é amplificado, apresentando, no mínimo, 1000 cópias por célula. Finalmente, as proteínas do capsídeo L1 e L2 são expressas nas camadas mais superficiais do epitélio, onde a montagem viral ocorre, e novas partículas infecciosas são liberadas (Figura 4) (Stanley, 2010; Freitas, et al., 2012; Crosbie, et al., 2013).

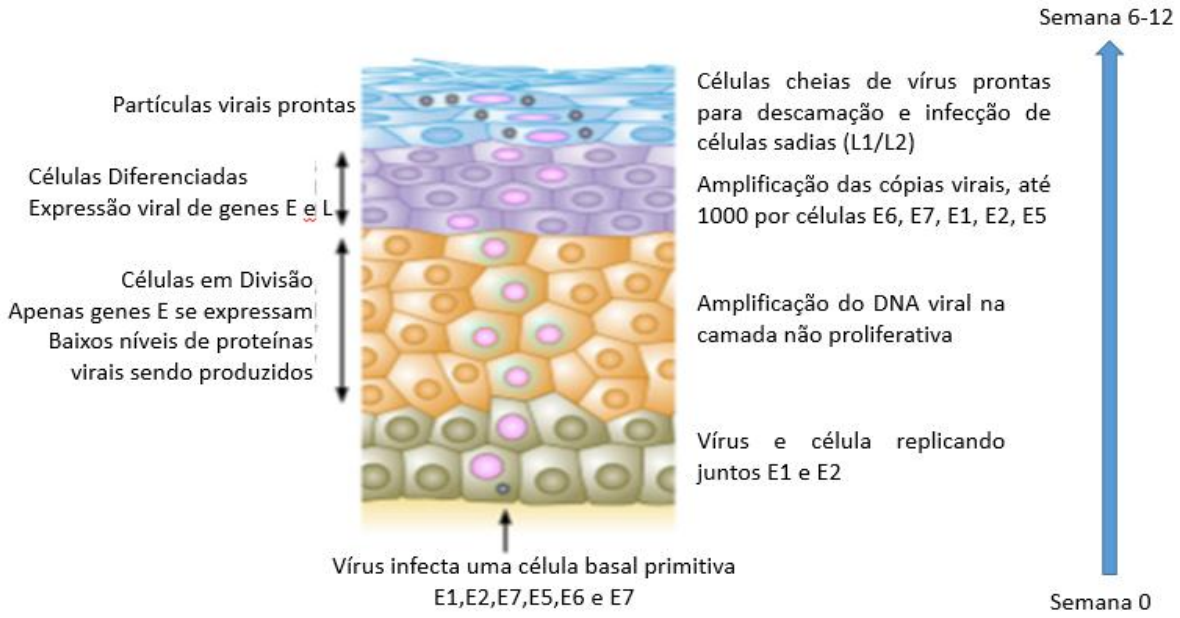

Figura 4: Ciclo de vida do HPV
Fonte: Stanley, 2012.
Acesso: Maio/2015

2.1.3 Epidemiologia da Infecção por HPV

A infecção por HPV genital é uma das doenças sexualmente transmissíveis mais comuns. Em nível mundial, o número de mulheres portando o DNA-HPV é estimado em 291 milhões, e cerca de 105 milhões irão ter uma infecção por HPV dos tipos 16 ou 18, os tipos oncogênicos mais comuns nos carcinomas cervicais (Burchell, et al., 2006).

Um estudo de meta-análise, que incluiu dados de mais de um milhão de mulheres em 59 países, com achados citológicos normais e testadas para detecção do DNA-HPV por meio de técnicas como PCR e captura híbrida, revelou que 11,7% dessas mulheres foram positivas para o DNA-HPV em algum momento de suas vidas. Altas incidências deste vírus foram observadas em regiões da África e América Latina em comparação com as regiões da Europa, Ásia e América do

Norte. De acordo com a região analisada, a incidênica variou de 1,6% a 41,9% (Bruni, et al., 2010).

O padrão de infecção em relação à idade demonstra pico em mulheres mais jovens (em média 20 a 25 anos), redução da incidência entre mulheres com 30 e 40 anos de idade e, em algumas regiões, há um leve aumento em grupos de mulheres na pós-menopausa(Stanley, 2010). Esse segundo pico, em idades mais avançadas, pode estar relacionado a mudanças nos comportamentos sexuais, resultando em novas infecções, ou mesmo por reativação de infecções latentes devido à reduzida resposta imune associada à imunossenescência pós-menopausal (Erickson, et al., 2013).

Apesar de esse vírus estar amplamente difundido na população, é importante enfatizar que cerca de 90% das mulheres infectadas pelo HPV, principalmente aquelas mais jovens, que é o grupo mais acometido, consegue resolver a infecção espontaneamente; a infecção persiste apenas em uma pequena fração de mulheres. Esse grupo menor tem maior probabilidade de desenvolver lesões intraepiteliais de alto grau e, se as lesões não forem devidamente tratadas, podem evoluir para o carcinoma cervical invasivo (Castellsagué, 2008).

2.1.4 O papel do HPV no desenvolvimento do câncer cervical

O papel dos HPVs de alto risco oncogênico (AR-HPV) em cânceres do colo uterino tem sido fortemente relacionado. Estudos epidemiológicos e clínicos que têm incorporado técnicas de biologia molecular de alta sensibilidade detectam o conteúdo genético do vírus em praticamente 100% de todos os carcinomas cervicais (Sahasrabuddhe, Luhn, Wentensen, 2011)

A infecção pelo Papilomavirus Humano (HPV) é necessária, mas não suficiente para causar o câncer. Estudos epidemiológicos mostram que outros fatores estão envolvidos e podem facilitar o processo de transformação maligna. A alta paridade, o uso prolongado de contraceptivos, o tabagismo, a coinfecção por outros agentes sexualmente transmitidos, fatores imunológicos e hormonais são os principais cofatores que influenciam na progressão para o câncer cervical (Castellsagué, et. al., 2002).

As oncoproteínas virais E6 e E7 têm um papel de destaque na iniciação e progressão do câncer cervical. O genoma do HPV é pequeno (aproximadamente oito pares de base) e não codifica polimerases ou enzimas necessárias para sua replicação. Para garantir a sobrevivência, o HPV depende da maquinaria de replicação da célula infectada, ou seja, depende que a célula infectada esteja se multiplicando para mediar a síntese do DNA viral (Moody, et. al., 2010).

A proliferação celular em indivíduos sadios é um fenômeno altamente regulado: existem pontos estratégicos (de checagem ou de restrição) que podem permitir ou interromper a continuidade do ciclo celular, tudo isso para evitar que células com danos em seu DNA se multipliquem. Em mamíferos, o principal momento da regulação está na fase G_1, no primeiro ponto de restrição (G_1/S), o qual, uma vez ultrapassado, permite a célula prosseguir nas fases S e G_2. A proteína do retinoblastoma (pRb) tem um papel-chave nessa etapa: ela se associa ao fator de transcrição E2F, impedindo que ele fique livre e ative os genes necessários para a fase S do ciclo. O complexo pRb/E2F, portanto, inibe a replicação do DNA. A fosforilação da pRb, libera a atividade de transcrição do E2F, ativando os genes necessários para a fase S (Figura 5) (Brasileiro Filho, 2006).

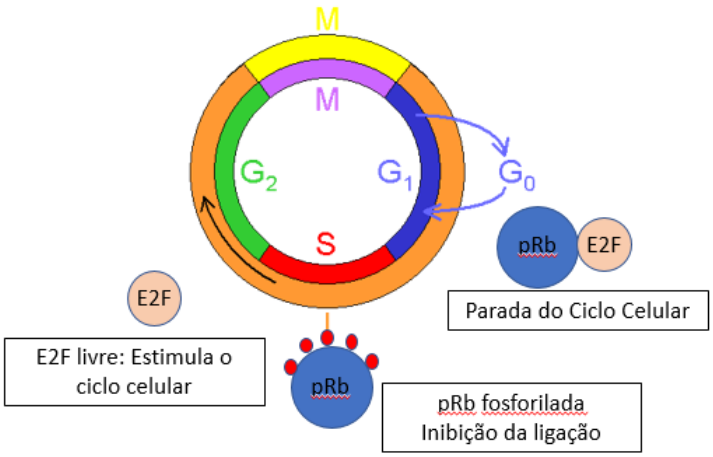

Figura 5. Ação da proteína Rb sobre o ciclo celular

A oncoproteína E7 do HPV se liga à pRb e promove a sua degradação; consequentemente, há um aumento e ativação do fator de transcrição E2F, que estimula a expressão dos genes envolvidos na fase S (Figura 6) (Brasileiro Filho, 2006).

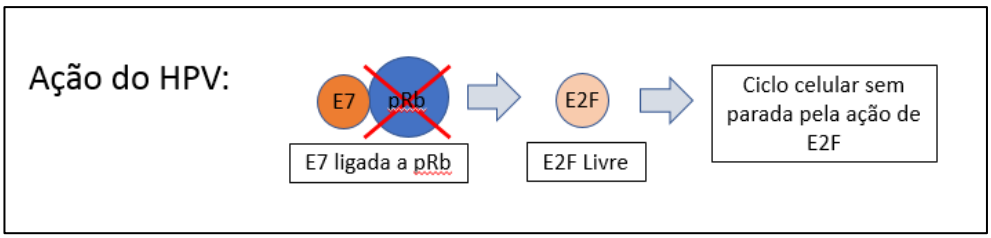

Figura 6. Ação do HPV sobre o ciclo celular

Esse crescimento celular descontrolado pode ser inibido pela via dependente da p53 (Moody, et al., 2010). A p53 é um fator de transcrição e age como um policial molecular que evita

a propagação de células geneticamente danificadas; ela consegue perceber o dano, interromper temporariamente o ciclo celular e, se o dano não for corrigido, induz a célula a entrar em apoptose (Kumar, et al., 2010). Para contornar esse recurso, oncoproteína E6 do HPV degrada a p53, privando as células infectadas desse importante mecanismo de controle.

A ação combinada das oncoproteínas virais E6 e E7 sobre as proteínas reguladoras do ciclo celular permite a proliferação descontrolada das células. Em células infectadas persistentemente com o AR-HPV, isso leva ao acúmulo de mutações ao longo do tempo e à consequente progressão para o câncer (Moody, et al., 2010; Stanley, 2012).

2.2 EXAME CITOPATOLÓGICO

O controle da doença é feito através dos programas de rastreamento, cujo objetivo é a detecção de lesões pré-cancerosas e, se necessário, a remoção delas antes que possam progredir. O exame citológico, ferramenta fundamental desses programas, foi desenvolvido pelo Dr. George Papanicolaou e consiste na análise de células obtidas a partir da ectocérvice e endocérvice uterina. A amostra é inicialmente fixada em lâmina de vidro, depois corada, e as anormalidades são detectadas através da microscopia (Wentzensen, et al., 2008). O Sistema de Bethesda propôs as seguintes terminações para a identificação de alterações nas células epiteliais escamosas: Atipia de significado indeterminado (ASC-US) abrange as alterações citológicas sugestivas tanto de lesão de baixo grau como de lesão de grau indeterminado que são qualitativa ou quantitativamente insuficientes para uma interpretação definitiva; Atipia em células escamosas não excluindo lesão de alto grau (ASC-H) refere-se às alterações citológicas sugestivas de Lesão de Alto Grau; Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL) abrange as alterações celulares relacionadas ao efeito citopático do HPV e displasia leve; Lesão intraepitelial escamosa de alto grau (HSIL) que abrange displasia moderada, acentuada e carcinoma *in situ* e Carcinoma escamoso (Solomon, et al., 2004).

Garantir a realização periódica do exame citopatológico é a estratégia mais adotada nestes programas; porém, para que haja uma efetiva redução na incidência e mortalidade, é necessária uma alta cobertura da população definida como alvo (INCA, 2012).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), com uma cobertura da população alvo de, no mínimo, 80% e com garantia de diagnóstico e tratamento adequados, é possível reduzir, em média, em 60% a 90% a incidência do câncer cervical. A experiência de alguns países desenvolvidos mostra que a incidência foi reduzida em torno de 80%, através de programas de

rastreamento altamente organizados, com qualidade, cobertura e seguimento das mulheres (INCA, 2012).

Infelizmente, no Brasil, a falta de controle sobre as mulheres que realizam o exame, como também a periodicidade com que o fazem, prejudicam a efetividade dos programas. Essa conduta resulta em uma baixa cobertura e tem-se mostrado pouco eficiente em reduzir a incidência da doença (Vale, et al., 2010).

Muitos países têm adotado a citologia em base líquida em seus programas. O princípio desta técnica é o mesmo do teste desenvolvido por Papanicolaou, o que muda é a metodologia de realização do exame. Na base líquida, após a remoção de células da cérvice uterina, a amostra é imersa em um fluido preservativo, processada em laboratório, e uma monocamada de células cervicais é espalhada sobre a lâmina (Figura 7) (Celik, et.al., 2008).

Essa metodologia permite o preparo de lâminas com maior representatividade celular. Enquanto a citologia convencional permite o aproveitamento de 20% do material coletado, sendo 80% do material coletado descartado com os instrumentos de coleta, a metodologia em meio líquido aproveita 100% do material celular coletado, permitindo, ainda, a conservação celular, preservando sua morfologia, evitando o acúmulo de restos celulares, fundo hemorrágico, muco, infiltrado inflamatório e sobreposição das células na lâmina (Consolaro e Maria-Engler, 2012).

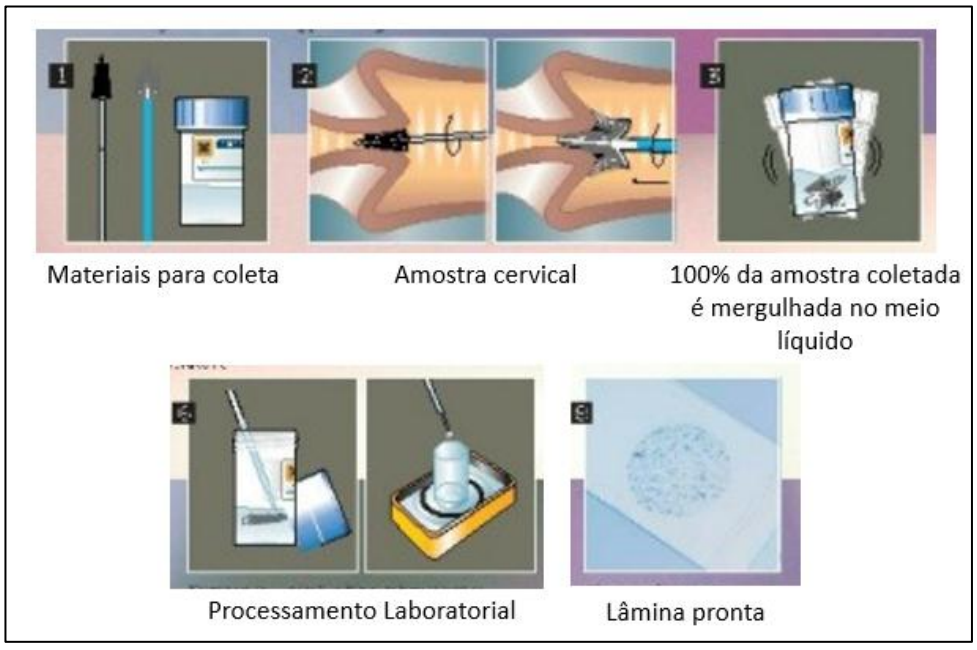

Figura 7. Citologia em meio líquido
Fonte: Bamed, 2011
Acesso: Fevereiro/2017

Outras vantagens desse método são a redução no número de amostras insatisfatórias - uma vez que diversos interferentes são removidos durante o processamento - e com a mesma amostra obtida para o rastreio citológico ainda é possível utilizar o material celular residual para testes moleculares subsequentes, facilitando a detecção de diversos marcadores envolvidos na infecção por HPV (Smith, 2011).

2.3 BIOMARCADORES

2.3.1 Uso de Biomarcadores no rastreio do câncer cervical

Com a disponibilidade de novas tecnologias, o uso de biomarcadores na prática clínica tem-se tornado cada vez mais comum. Essa metodologia permite uma abordagem mais individualizada do paciente em uma ampla variedade de doenças. Em relação ao câncer, os biomarcadores têm ajudado a determinar o risco de um indivíduo desenvolver uma neoplasia, como também a detectá-la em suas fases iniciais, quando as chances de sucesso no tratamento são mais eficazes (Manne, et al., 2005).

Essa utilidade dos biomarcadores pode ser aplicada aos programas de rastreamento para o câncer cervical como forma de otimizar o diagnóstico. Essa estratégia ajuda a diferenciar aquelas lesões precursoras que têm potencial de progressão para o câncer daquelas causadas por uma infecção transitória do HPV, evitando assim tratamentos desnecessários (Saslow, et al., 2014).

Além de avaliar essa questão da progressão, os biomarcadores também podem ajudar a melhorar a acurácia diagnóstica. Existem alguns quadros citológicos que mimetizam lesões e podem ser fontes de erros. Um exemplo é a atrofia acentuada - caracterizada por maturação alterada das células, dessecamento e elevada relação núcleo-citoplasma -, a qual pode ser confundida com HSIL. Outras armadilhas são os pseudocoilócitos, a metaplasia e o reparo atípico. Estas, entre outras situações, podem aumentar a variabilidade entre observadores, afetando a sensibilidade do teste (Pinto, et al., 2010).

2.3.2 Biomarcadores Ki-67 e DNA Topoisomerase IIα (Top IIα)

Muitos marcadores moleculares são proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular que se alteram na presença das oncoproteínas do HPV e podem ser detectados através de técnicas como a imunocitoquímica (Freitas, et al. 2014). A detecção dessas moléculas através de anticorpos monoclonais é um parâmetro de valor na análise de amostras citológicas e tem sido identificada uma boa correlação entre a positividade destas e o grau de lesão intraepitelial (Kurshumliu, et al., 2009).

Numa infecção clinicamente relevante por AR-HPV, os oncogenes virais E6 e E7 interferem substancialmente na apoptose e na regulação do ciclo celular. Todos esses efeitos são manifestados através de uma expressão anormal de proteínas associadas ao ciclo celular (Sahebali, et al., 2006; Freitas, et al., 2014). Uma dessas proteínas, o Ki-67, é considerado um marcador de proliferação celular, está presente no núcleo das células e é expresso durante todas as fases ativas do ciclo (G1, S, G2 e M) (Ançuta, et al., 2008). Esse marcador é expresso, em pacientes normais não infectadas pelo vírus, nas camadas basais e parabasais do epitélio cervical escamoso. Como na infecção por HPV - em casos de displasia e câncer - aumenta a taxa de proliferação celular nos tecidos infectados, a expressão do Ki-67 se estende acima do terço basal, e o número de células positivas aumenta consideravelmente (Sahebali, et al., 2003).

As HSIL geralmente apresentam forte correlação com este marcador, com grande número de células expressando a positividade nuclear, enquanto que nas LSIL o padrão de positividade se apresenta menos difuso, com apenas pequenos aglomerados de células escamosas expressando a marcação na porção superior do epitélio (Pinto, et al., 2010).

Um outro biomarcador, a DNA Topoisomerase IIα (Top IIα) é uma enzima indispensável à proliferação celular, pois promove a separação da cromátides-filhas durante a mitose. Ela também se encontra superexpressa quando a fase S do ciclo celular é aberrante (Pinto, et al., 2010).

Para verificar se a utilização de marcadores é útil na identificação de pacientes com lesão de alto grau (HSIL), um estudo recente analisou a expressão do mRNA de seis marcadores (CDKN2A/p16, BIRC5, MMP9, TOP 2α, MCM5 e MKI67) por RT-PCR (reverse transcripton quantitative polymerase chain reaction) em pacientes positivas para o teste de AR-HPV-DNA ou com resultado citológico anterior alterado. O Top IIα demonstrou melhor sensibilidade 97% (IC=95%) entre os marcadores avaliados (Del Pino, et al., 2015).

2.3.3 Imunocitoquímica

O termo imunocitoquímica é utilizado para descrever metodologias que usam imunoensaios para colocalizar um epítopo de interesse em esfregaços citológicos, preparações citocentrifugadas ou preparações em monocamadas (Ferro, 2013). Nesta técnica, anticorpos são utilizados como reagentes específicos capazes de identificar e estabelecer ligação com constituintes moleculares que funcionam como antígenos. Esta ligação permite situar e identificar a presença de variadas substâncias nas células por intermédio da cor, que é associada aos complexos antígenos-anticorpo formados durante a reação (Polak, et al., 2003).

Esse método tem suas principais aplicações no estudo de neoplasias, doenças infecciosas e doenças degenerativas, podendo, no entanto, ser aplicado no estudo de muitas outras doenças (Ferro, 2013)

No presente estudo, utilizou-se o método de micropolímeros de enzimas. Esta metodologia combina pequenas moléculas de estrutura linear, de forma a transformar em polímeros anticorpos e enzimas, construindo um complexo muito compacto (Shan-Rong Shi, 1999). De acordo com os fabricantes, esse procedimento proporciona maior acessibilidade ao antígeno, pois a pequena dimensão dos seus reagentes permite melhor difusão aos pontos-alvo e redução da ligação inespecífica. Para melhor penetração dos polímeros ao tecido/células, foi desenvolvido um sistema de três etapas em que é incluída a aplicação de um anticorpo extra (comumente conhecido como complemento), entre o anticorpo primário e o anticorpo conjugado ao polímero, o que aumenta a capacidade de detecção do sistema e a sua sensibilidade (Figura 5) (Skaland, et al., 2010).

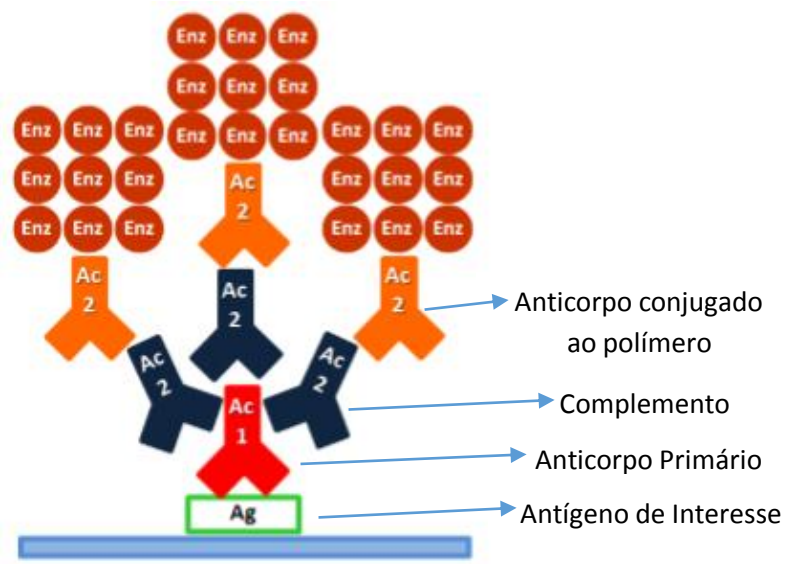

Figura 8: Reação Imunocitoquímica. Micropolímero de Enzimas. Sistema de Três Etapas.
Fonte: Ferro, 2013

2.4 HIPÓTESE

Os marcadores moleculares (Ki-67 e Top IIα) podem contribuir para melhorar a acurácia do exame citológico das pacientes que apresentam anormalidades cervicais no screaning de rotina?

2.5 JUSTIFICATIVA

O câncer cervical continua sendo uma importante causa de mortalidade entre as mulheres, principalmente nos países em desenvolvimento como o Brasil. A utilização do teste citológico na triagem da população de risco tem ajudado a reduzir a incidência da doença; no entanto, isso vem acontecendo em um ritmo lento. Além do mais, o alto custo dos programas de rastreamento tem contribuído para busca de métodos auxiliares que facilitem a identificação de mulheres com maiores chances de progredir para o câncer.

Os marcadores moleculares são uma alternativa interessante, uma vez que funcionam como ferramentas localizadoras que facilitam a identificação de amostras que contêm células potencialmente anormais. Os marcadores Ki-67 e TOP IIα têm sido muito utilizados como forma de melhorar a reprodutibilidade entre observadores e aumentar a taxa de concordância entre exames citológicos e histopatológicos. Existem ainda estudos que demonstram que para pacientes com anormalidades mais leves - como Atipias de significado indeterminado (ASC-US) e Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau (LSIL) - e que já manifestam a expressão dessas moléculas pode-se sinalizar um pior prognóstico, indicando a necessidade de um seguimento diferenciado para essas pacientes para que possam ser acompanhadas mais de perto.

O uso combinado dessas duas técnicas (citologia + biomarcadores) tem ajudado a aumentar a sensibilidade e a especificidade do seguimento. Isso contribui para uma redução dos resultados falsos positivos e falsos negativos e, consequentemente, uma redução de custos com tratamentos desnecessários.

Com o advento da citologia em base líquida, a detecção dos biomarcadores pode ser feita através da imunocitoquímica, uma técnica que vem ganhando espaço por ser rápida, simples e minimamente invasiva, e que pode ser realizada tanto em anormalidades graves quanto nas menos severas para avaliar o perfil de expressão dos marcadores, mesmo nos estágios mais iniciais da doença.

2.6 OBJETIVOS

Objetivo Geral

Analisar a expressão dos marcadores moleculares Ki-67 e Top IIα nas pacientes com anormalidades cervicais atendidas em um centro de saúde no município de Jaboatão dos Guararapes -PE.

Objetivos Específicos

- Realizar o processamento das amostras cervicais através da metodologia em base líquida;
- Detectar a expressão dos marcadores Ki-67 e Top IIα nas amostras citológicas através da técnica de imunocitoquímica;
- Correlacionar os resultados da citologia em meio líquido e biópsia com a coloração imunocitoquímica para os marcadores Top IIa e Ki-67.

2.7 METODOLOGIA

2.7.1. Tipo de Estudo

Esta pesquisa pode ser classificada como um estudo exploratório, analítico, observacional e transversal.

2.7.2 Amostras e Local de Estudo

As amostras utilizadas neste trabalho foram provenientes das coletas de material cervical de pacientes do CENTRO DE REFERÊNCIA DE SAÚDE DA MULHER Mª DE LOURDES LOPES DE LEMOS, no município de Jaboatão dos Guararapes – PE. As coletas ocorreram entre junho de 2015 e junho de 2016, formando uma população de 76 pacientes.

O estudo citopatológico foi desenvolvido no laboratório Labocito, prestador de serviço credenciado ao SISCAN; já as reações imunocitoquímicas ocorreram no Laboratório de Patologia do LIKA (Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami) - UFPE. O projeto foi aprovado pelo comitê de ética da Associação Caruaruense de Ensino Superior – ASCES (ANEXO A).

2.7.3 Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídas no estudo pacientes acima de 18 anos de idade, com exame citológico anterior alterado; pacientes encaminhadas para biópsia por apresentarem resultado colposcópico altamente sugestivo de lesão por HPV, bem como pacientes que estavam iniciando tratamento contra a infecção clínica do HPV; atendidas no centro de referência do município de Jaboatão-PE para coleta de amostras cervicovaginal, no período da pesquisa.

Foram excluídas do estudo todas as pacientes histerectomizadas e gestantes.

2.7.4 Coleta de Material Cervical (Ectocérvice e Endocérvice)

A obtenção das amostras ocorreu após o consentimento das pacientes selecionadas. Estas foram esclarecidas e consultadas para participar da pesquisa através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO B)

A coleta foi realizada da ectocérvice e da endocérvice, utilizando instrumentos específicos (espátula de Ayre e Escova Endocervical) e fazendo giros de 360°, percorrendo o contorno cervical externo e interno. Posteriormente, o material foi depositado dentro do recipiente contendo meio líquido específico do sistema Liqui-PREP^{TM}.Os exames realizados anteriormente

pelas pacientes, quando disponíveis, também foram catalogados, como citologia, colposcopia e histopatológico.

2.7.5 Protocolo de Preparação de Lâminas a partir da Base Líquida

A preparação das lâminas seguiu as especificações do fabricante do sistema em meio líquido da Liqui-PREP^{TM}(Ref: PV100713). Durante a coleta, as amostras foram acondicionadas em frasco contendo solução preservante e armazenadas até o momento da análise. A amostra de cada paciente foi transferida para um tubo de centrífuga de 8 ml e então centrifugada a 1600 rpm por cinco minutos. Após esse período, removeu-se o sobrenadante, e ao pellet de células foram adicionados 500 µl da solução chamada Cell Base, que promove aderência à lâmina. As amostras foram agitadas no vórtex por 1 minuto e, por fim, 50µl dessa suspensão homogênea foram depositados sobre a lâmina. Para o estudo citológico, a amostra foi depositada na porção central da lâmina e esta seguiu para a bateria de coloração e montagem, enquanto que, para o estudo imunocitoquímico, utilizaram-se lâminas sinalizadas e a amostra foi depositada em duplicata em uma mesma lâmina, para que anticorpos diferentes pudessem ser avaliados. Utilizou-se a caneta Pap-pen (Dako, USA) a fim de produzir uma barreira hidrofóbica entre as amostras para impedir a mistura das soluções de anticorpos. Depois de secas, as lâminas foram processadas (Figura 9).

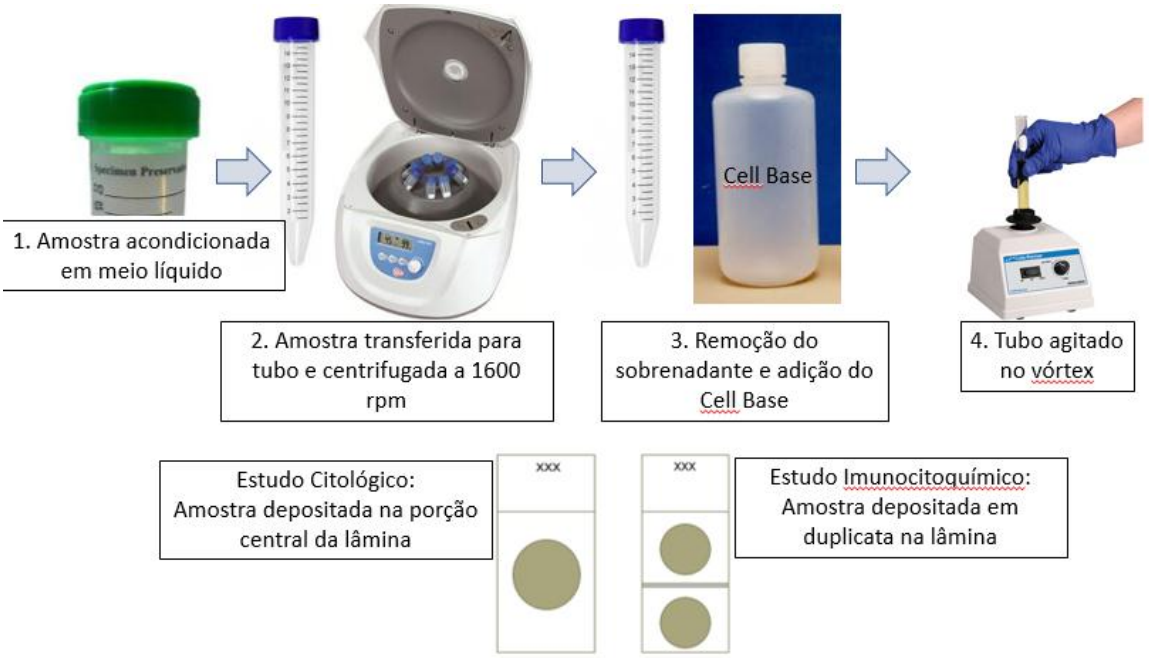

Figura 9: Preparação laboratorial das lâminas para o estudo citológico e imunocitoquímico

Uma avaliação média de um mínimo de dez campos na objetiva de 40x foi realizada para avaliar a satisfatoriedade da amostra. Permaneceram no estudo as amostras que apresentaram uma estimativa mínima de, pelo menos, 5.000 células escamosas bem visualizadas e preservadas (Solomon, et al., 2004).

2.7.6 Estudo Citopatológico

As lâminas coletadas foram submetidas à coloração pela técnica de Papanicolaou, utilizando-se os seguintes corantes: Hematoxilina, Orange G 6 e EA 65, além de álcool absoluto comercial e Xilol P.A. Após coloração, as lâminas foram montadas com entellan e então levadas à análise microscópica.

A identificação citomorfológica das amostras foi executada pelos pesquisadores citologistas e seguiu padrões de qualidade laboratorial e nomenclatura proposta pelo Sistema Bethesda, 2001 (Solomon, et al., 2004). Os resultados foram categorizados utilizando a nomenclatura do Sistema Bethesda 2001. Nas lesões pré-malignas do epitélio escamoso, foram utilizados LSIL ou HSIL; nas atipias escamosas, utilizaram-se ASC-US ou ASC-H e utilizou-se AGC nas Atipias em Células Glandulares. Nos casos de malignidade, os esfregaços foram categorizados como Carcinoma Escamoso ou Adenocarcinoma, sendo utilizado Adenocarcinoma *in situ* para as alterações pré-malignas da endocérvice. As amostras que incluíam alterações benignas e inflamatórias foram categorizadas como Negativo para Lesão Intraepitelial e Malignidade (NLIM).

2.7.7 Estudo Imunocitoquímico

A partir dos resultados da análise citológica, foram formados seis grupos experimentais para a análise imunocitoquímica.

Grupo I: formado por pacientes que tiveram resultado NLIM na análise citológica;
Grupo II: formado por pacientes que tiveram resultado ASC-US na análise citológica;
Grupo III: formado por pacientes que tiveram resultado ASC-H na análise citológica;
Grupo IV: formado por pacientes que tiveram resultado LSIL na análise citológica;
Grupo V: formado por pacientes que tiveram resultado HSIL na análise citológica.

Duas lâminas sabidamente positivas para Ki-67 e TOP-IIα foram utilizadas como controles positivos. Elas foram provenientes de um corte histológico cujo resultado era Neoplasia Intraepitelial Cervical Grau III (NIC III) (Figuras 10 e 11). Esfregaços citológicos de pacientes sem história prévia de lesão intraepitelial ou infecção clínica pelo HPV foram utilizados como controles negativos.

A reação imunocitoquímica foi considerada positiva quando ao menos uma célula apresentava uma forte coloração nuclear marrom escuro.

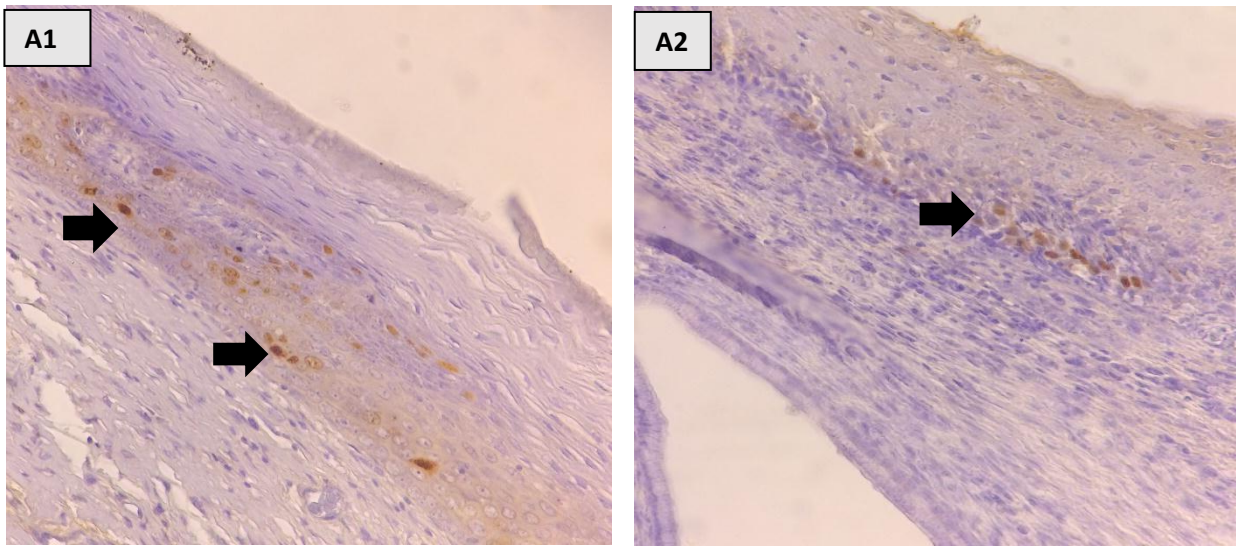

Figura 10: A1 e A2 - Reação imuno-histoquímica positiva para Ki-67 em biópsia cervical de paciente com NIC III

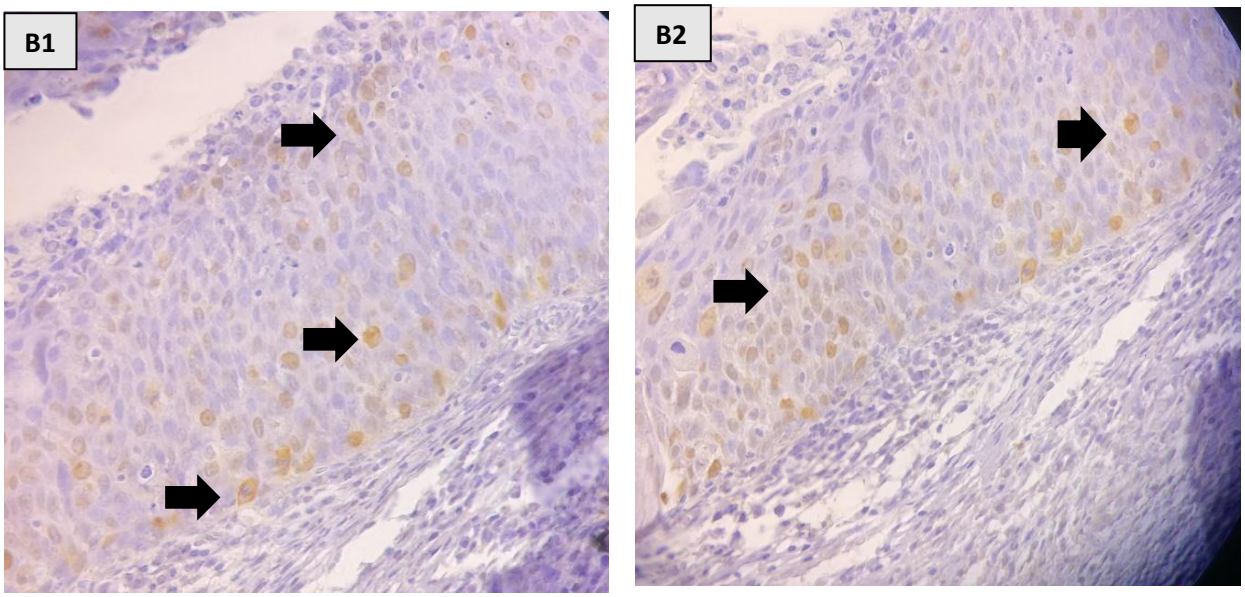

Figura 11: B1 e B2 - Reação imuno-histoquímica positiva para TOPIIα em biópsia cervical de paciente com NIC III

2.7.8 Reação Imunocitoquímica para Detecção de Ki-67 e TOP II α

As amostras citológicas positivas contendo lesão intraepitelial ou atipias escamosas, além das amostras que apresentaram resultado citológico negativo na base líquida, foram submetidas ao estudo imunocitoquímico.

O protocolo foi descrito pelo fabricante do Kit Reveal (SPD 125, Spring) e as lâminas passaram pelas etapas de rehidratação em álcoois, iniciando com o álcool etílico PA, álcool etílico

a 70% e finalizando em água destilada durante cinco minutos cada. Posteriormente, iniciou-se a etapa de recuperação antigênica, realizada com tampão citrato (10mM pH 6,0) em steamer durante 30 minutos. Após lavagem das lâminas em água destilada, executou-se o bloqueio da Peroxidase Endógena (Hydrogen Peroxide Block) e, posteriormente o bloqueio das Proteínas Inespecíficas (Hydrogen Peroxide Block), as lâminas estiveram em contato com os respectivos reagentes durante um período de trinta minutos cada. Após remover o excesso da última solução procedeu-se a incubação com o anticorpo primário: em cada lâmina, foi realizada a pesquisa para dois anticorpos diferentes. Utilizou-se o anticorpo anti-Ki 67 (clone MIB 1, code M7240, DAKO) diluído 1:100 e o anti-TOP IIa (clone Ki-S1, code M7186, DAKO), titulado em 1:50, ambos diluídos em tampão Fosfato Alcalino (PBS), pH 7,2, contendo 1% de albumina bovina. Os anticorpos foram incubados overnight a 4°C em câmera úmida. Em seguida, procedeu-se a incubação com o anticorpo secundário contido no kit (Reveal Complement) por 30 minutos e depois com o anticorpo terciário (Reveal HRP) também por 30 minutos. Por fim, a revelação foi feita através do revelador Diaminobenzidina (DAB) durante três minutos, ao abrigo da luz. As lâminas foram contracoradas com hematoxilina para evidenciar os núcleos das células e a diafanização foi feita com banhos de xilol durante três minutos. Para montagem das lâminas, utilizou-se um meio de montagem permanente (Entellan, Merck) e lamínulas.

2.7.9Análise de Dados

A análise estatística foi realizada utilizando o aplicativo PRISM versão 6.0. Sendo utilizado o teste qui-quadrado de associação, considerando um nível de significância, onde $p<0,05$.

2.7.10 ARTIGO ORIGINAL

A ser submetido ao JORNAL BRASILEIRO DE PATOLOGIA E MEDICINA LABORATORIAL

Perfil imunocitoquímico das proteínas Ki-67 e TOPIIα em pacientes com anormalidades cervicais

Catharine de Araújo Crisóstomo Pontes[1], Ingrid Tavares de Lima[1], Carlos Eduardo Queiroz de Lima[1], Adrya Lúcia Peres[2], Mário Ribeiro de Melo-Júnior[1]

1. Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Pernambuco, Brasil;
2. Centro Universitário Tabosa de Almeida (Asces-Unita), Pernambuco, Brasil.

ABSTRACT

Cervical cancer is the fourth most diagnosed neoplasia in women in the world and its main etiological agent is infection by the Human Papillomavirus (HPV), which induces the uncontrolled proliferation of cells, leading to the accumulation of mutations over time and to cancer in some cases. The abnormal expression of nuclear proteins, such as Ki-67 and TOPIIα, indicating dysregulation of the cell cycle and can, in conjunction with other tests, improve the accuracy of screening programs. This study aimed to evaluate the detection of Ki-67 and TOPIIα, through the technique of immunocytochemistry in patients with cervical abnormalities, noting whether they are useful to detect clinically relevant lesions, improving the sensitivity of cytology. Seventh six women participated in the study referred to a reference centre for presenting changes in previous tests or even Condyloma, representing clinical infection by HPV. It was observed a higher rate of positivity (IP) of Ki-67 and TOPIIα in patients diagnosed with cervical abnormalities detected by cytology (41.6% and 62.5%, respectively). It was observed a higher rate of positivity (RP) of Ki-67 and TOPIIα in patients diagnosed with cervical abnormalities detected by cytology (41.6% and 62.5%, respectively). The performance of the Ki-67 was better in patients with LSIL (equal to 50%) and TOPIIα had a better performance in patients with HSIL (66.6%). The test of association between the immunocytochemistry and liquid-based cytology proved to be statistically significant ($p < 0.05$) with value of $p = 0.0026$ for Ki-67 and $p = 0.0004$ to TOPIIα. The markers analysed, Ki-67 and TOPIIα, have proven effective in the detection of cervical lesions clinically relevant, given the strong association between the expression of these markers in patients diagnosed with cervical abnormalities for cytology.

Key words: DNA topoisomerase tipo II. Ki-67 Antigen. Imunocytochemistry. Antibodies. Cytology.

INTRODUÇÃO

O câncer cervical é o quarto tipo de neoplasia mais comumente diagnosticada e a quarta causa de morte por câncer em mulheres em nível mundial. Em 2012, foram estimados 527.600 novos casos da doença, e a taxa de mortalidade estimada foi de 265.700 casos, representando 7,5% das mortes por câncer em mulheres (Torre, et al., 2015). .Descobrir o agente etiológico desta neoplasia foi um passo importante no conhecimento desta doença. A infecção por HPV é uma doença sexualmente transmissível bastante difundida na população. A grande maioria das infecções não leva a câncer, mas alguns tipos de HPV considerados de alto risco oncogênico têm um maior potencial de integração ao genoma do indivíduo infectado. Essa integração, assim como a expressão de onconproteínas virais, promove alterações em diversas proteínas relacionadas com ciclo celular, podendo levar ao bloqueio da apoptose e proliferação celular descontrolada (Brown, et al., 2012).

O controle da doença é feito, principalmente, através do rastreio citológico da população-alvo, com o intuito de detectar mulheres com lesões pré-malignas. A avaliação da lesão é seguida pela realização de outros testes, como a colposcopia e o exame histopatológico, e, se necessário, o tratamento é disponibilizado. Como há um intervalo de anos para que a displasia encontrada progrida para um processo invasivo, o diagnóstico precoce e o tratamento adequado previnem o desenvolvimento do câncer (Wright, et al., 2012).

A utilização do teste citológico na triagem da população de risco tem ajudado a reduzir a incidência da doença, no entanto, isso vem acontecendo em um ritmo lento, além do mais, o alto custo dos programas, tem contribuído para busca de métodos auxiliares que facilitem a identificação de mulheres com maiores chances de progredir para o câncer.

Os marcadores moleculares têm se mostrado uma alternativa interessante. Dentre esses, o Ki-67 e a Topoisomerase IIα (TOP IIα) são exemplos de proteínas que se expressam anormalmente durante a infecção por HPV. O primeiro é considerado um marcador de proliferação celular, é expresso em pacientes não infectadas pelo vírus, no compartimento proliferativo do epitélio escamoso (camada basal e parabasal), porém, em infecções persistentes por HPV, a expressão desse marcador aumenta consideravelmente e se estende acima do terço basal do epitélio (Sahebali, et al.,, 2003). O segundo é uma enzima indispensável à proliferação celular, também encontra-se expressa anormalmente quando a fase S do ciclo está descontrolada (Pinto, et al., 2010).

A expressão dessas proteínas pode ser detectada através de técnicas, como a imunocitoquímica. As principais vantagens dos marcadores é a possibilidade de predizer o risco de progressão de uma anormalidade citológica, o aumento na concordância interobservador e o auxílio em casos de dúvidas diagnósticas (Ozaki, et al., 2011).

Dada a importância da citologia na rotina e o auxílio dos marcadores moleculares na eficiência diagnóstica, este estudo se propôs a avaliar a detecção dos marcadores Ki-67 e TOPIIα em pacientes com lesões cervicais de diferentes graus ou que apresentam infecção clínica por HPV, monitoradas através do rastreio citológico, numa tentativa de determinar a efetividade destes nas lesões pré-malignas do colo uterino, buscando responder se estes marcadores são úteis para evidenciar pacientes com lesões clinicamente relevantes.

METODOLOGIA

As amostras utilizadas neste trabalho foram provenientes das coletas de material cervical de pacientes do Centro De Referência De Saúde Da Mulher Mª De Lourdes Lopes De Lemos no município de Jaboatão dos Guararapes – PE. As coletas ocorreram entre junho de 2015 e junho de 2016, formando uma população de76 pacientes.

Foram incluídas no estudo pacientes acima de 18 anos de idade, com exame citológico anterior alterado; pacientes encaminhadas para biópsia por apresentarem resultado colposcópico altamente sugestivo de lesão por HPV, bem como, pacientes que estavam iniciando tratamento contra a infecção clínica do HPV; atendidas no centro de referência do município de Jaboatão-PE para coleta de amostras cervicovaginal, no período da pesquisa. Foram excluídas do estudo todas as pacientes histerectomizadas e gestantes.

A obtenção das amostras ocorreu após o consentimento das pacientes selecionadas. Estas foram esclarecidas e consultadas para participar da pesquisa através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Do Centro Universitário Tabosa de Almeida – Caruaru-PE (CAAE: 43319915.9.0000.5203) e esteve em consonância com a Declaração de Helsinki (2008) e a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde.

A coleta foi realizada da ectocérvice e da endocérvice, utilizando instrumentos específicos (espátula de Ayre e Escova Endocervical) e fazendo giros de 360°, percorrendo o contorno cervical externo e interno, posteriormente o material foi depositado dentro do recipiente contendo

meio líquido específico. Os exames realizados anteriormente pelas pacientes, quando disponíveis, também foram catalogados, como citologia, colposcopia e histopatológico.

A preparação das lâminas seguiu as especificações do fabricante do sistema em meio líquido da Liqui-PREP^{TM} . Para o estudo citológico a amostra foi depositada na porção central da lâmina e esta seguiu para a bateria de coloração e montagem, enquanto que, para o estudo imunocitoquímico, utilizou-se lâminas silanizadas e a amostra foi depositada em duplicata em uma mesma lâmina para que anticorpos diferentes pudessem ser avaliados. Utilizou-se a caneta Pap-pen (Dako, USA) a fim de produzir uma barreira hidrofóbica entre as amostras para impedir a mistura das soluções de anticorpos (Figura I).

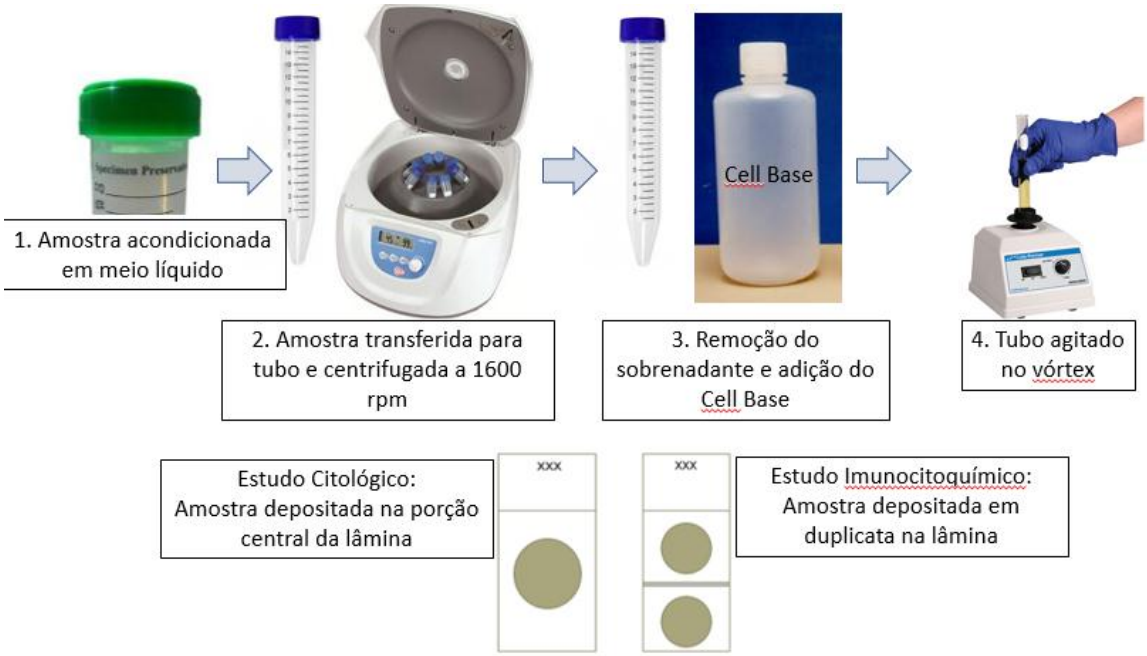

Figura I: Preparação laboratorial para o estudo citológico e imunocitoquímico

Depois de secas, as lâminas foram processadas. Uma avaliação média de um mínimo de dez campos na objetiva de 40x foi realizada para avaliar a satisfatoriedade da amostra. Permaneceram no estudo as amostras que apresentaram uma estimativa mínima de, pelo menos, 5.000 células escamosas bem visualizadas e preservadas (Solomon, et al., 2004).

Estudo Citopatológico

A identificação citomorfológica das amostras, foi executada por citologistas certificados, seguiu padrões de qualidade laboratorial e nomenclatura proposta pelo Sistema Bethesda, 2001 (Solomon, et al., 2004). Os resultados foram categorizados, utilizando a nomenclatura do Sistema

Bethesda 2001, nas lesões pré-malignas do epitélio escamoso, foram utilizados: Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau (LSIL) e Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau (HSIL), nas atipias escamosas: Atipias em Células Escamosas, de Significado Indeterminado (ASC-US) ou não Excluindo Lesão de Alto Grau (ASC-H). Nos casos de malignidade, os esfregaços foram categorizados como Carcinoma Escamoso ou Adenocarcinoma, sendo utilizado Adenocarcinoma *in situ* para as alterações pré-malignas da endocérvice. As amostras que incluíam alterações benignas e inflamatórias foram categorizadas como Negativo para Lesão Intraepitelial e Malignidade (NLIM).

Estudo Imunocitoquímico

A partir dos resultados da análise citológica, foram formados seis grupos para a análise imunocitoquímica.

Grupo I: formado por um grupo de pacientes que tiveram resultado NLIM na análise citológica;

Grupo II: formado por pacientes que tiveram resultado ASC-US na análise citológica;

Grupo III: formado por pacientes que tiveram resultado ASC-H na análise citológica;

Grupo IV: formado por pacientes que tiveram resultado LSIL na análise citológica;

Grupo V: formado por pacientes que tiveram resultado HSIL na análise citológica.

Duas lâminas sabidamente positivas para Ki-67 e TOP-IIα foram utilizadas como controles positivos. Elas foram provenientes de um corte histológico cujo resultado era Neoplasia Intraepitelial Cervical Grau III (NIC III) (Figuras II e III).

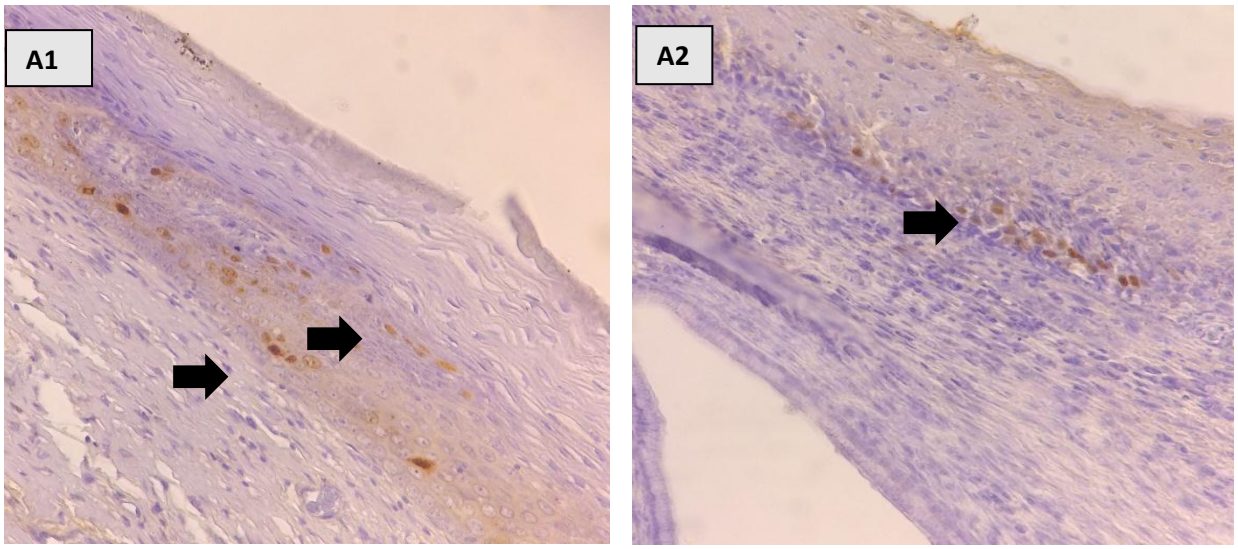

Figura II: A1 e A2 - Reação imuno-histoquímica positiva para Ki-67 em biópsia cervical de paciente com NIC III

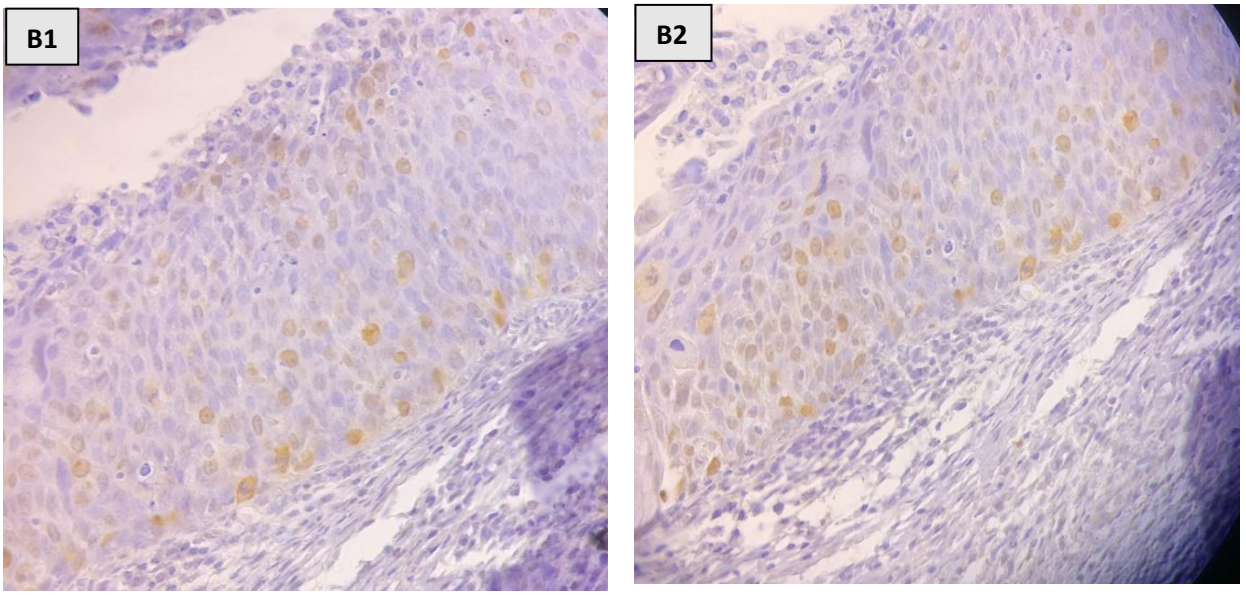

Figura III: B1 e B2 - Reação imuno-histoquímica positiva para TOPIIα em biópsia cervical de paciente com NIC III

Esfregaços citológicos de pacientes sem história prévia de lesão intraepitelial ou infecção clínica pelo HPV, foram utilizados como controles negativos.

A reação imunocitoquímica foi considerada positiva quando ao menos uma célula apresentava uma forte coloração nuclear marrom escuro.

Os resultados da imunocitoquímica foram categorizados em três grupos: $Ki67^{+}$, $TOPII\alpha^{+}$ e $Ki67^{+}/TOPII\alpha^{+}$(quando ambos os marcadores foram positivos).

As amostras citológicas positivas contendo lesão intraepitelial ou atipias escamosas, além das amostras que apresentaram resultado citológico negativo na base líquida foram submetidas ao estudo imunocitoquímico. O protocolo utilizado para a imunocitoquimica foi o descrito pelo fabricante do Kit Reveal (SPD 125, Spring). Após as etapas de re-hidratação em álcoois, recuperação antigênica, bloqueio da Peroxidase Endógena e proteínas específicas, as lâminas foram incubadas com os anticorpos primários. Em cada lâmina, foi realizada a pesquisa para dois anticorpos diferentes. Os anticorpos utilizados foram: o anticorpo anti-Ki 67 (clone MIB 1, code M7240, DAKO) diluído 1:100 e o anti-TOP IIa (clone Ki-S1, code M7186, DAKO), titulado em 1:50, ambos diluídos emTampão Fosfato Alcalino (PBS), pH 7,2, contendo 1% de albumina bovina. Os anticorpos foram incubados overnight a 4°C em câmera úmida. A revelação da reação foi realizada através da aplicação de Diaminobenzidina (DAB). As lâminas foram contracoradas com Hematoxilina, montadas com meio de montagem permanente (Entellan, Merck) e seguiram para avaliação

A análise estatística foi realizada utilizando o aplicativo PRISM versão 6.0. Sendo utilizado o teste qui-quadrado de associação, considerando um nível de significância, onde p< 0,05.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o período de estudo foram atendidas 76 pacientes, com média de idade de 30,89 anos (idade mínima:18 anos e idade máxima:56 anos).

A avaliação dos exames realizados anteriormente pelas pacientes revelou que, em relação à colposcopia, 36 apresentavam alteração no exame colposcópio, a principal delas foi a presença de epitélio acetobranco, 2 tiveram achados colposcópicos normais e 38 não haviam realizado o exame ou não haviam trazido no momento da coleta. (Figura VI).

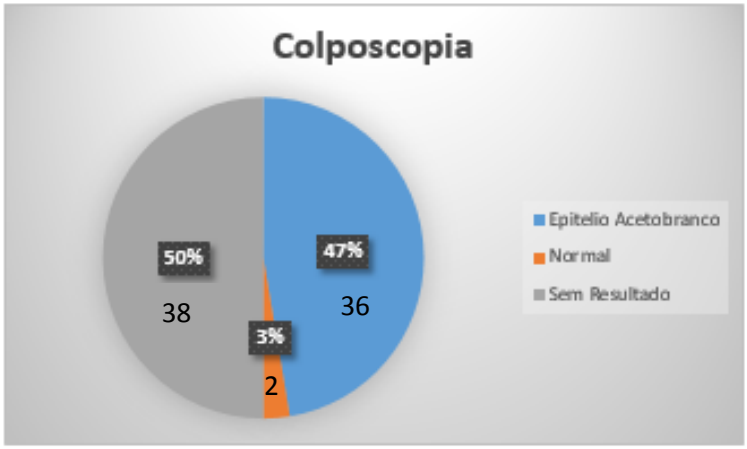

Figura IV: Análise dos resultados realizados previamente pelas pacientes - Colposcopia

Neste tipo de exame, uma luz incide sobre o epitélio cervical, penetrando através dele até o estroma. A coloração da luz refletida depende da vascularização do estroma e da espessura do epitélio, que atuam como um filtro à passagem de luz. A presença do epitélio acetobranco deve-se a existência de alterações epiteliais que impedem a passagem de luz até o estroma, após a aplicação do ácido acético. É um sinal pouco específico que pode ser causado por diversas situações clínicas, tais como: infecção por HPV, paraqueratose, hiperqueratose, acantose, metaplasia, aumento da densidade nuclear, infiltração inflamatória do estroma, etc. (Moutinho, 2010). Os resultados da citologia convencional realizada previamente pelas pacientes, da citologia em meio líquido e do exame histopatológico estão disponíveis na tabela I.

	*NLIM	*ASC-US	*ASC-H	*LSIL	*HSIL	Insatisfatório	Sem Resultado
Citologia Convencional	34	6	1	3	0	1	31
Citologia em Meio Líquido	49	7	2	12	6	0	0
Exame Histopatológico	10	0	0	29	0	0	37

Tabela I: Resultados da citologia convencional, citologia em meio líquido e exame histopatológico. *NLIM= Negativo para Lesão Intraepitelial e Malignidade; ASC-US=Atipia em Células Escamosas de Significado Indeterminado; ASC-H=Atipia em Células Escamosas Não Podendo Afastar Lesão de Alto Grau; LSIL=Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau e HSIL= Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau.

Em relação ao estudo imunocitoquímico, 40 pacientes das 76 atendidas foram analisadas. Os resultados da imunocitoquímica foram categorizados em três grupos: $Ki67^{+}$, $TOPII\alpha^{+}$ e $Ki67^{+}/TOPII\alpha^{+}$ (quando ambos os marcadores foram positivos). O percentual de positividade para o marcador Ki-67 foi igual a 25% (n=10) e TOPIIα foi igual a 40% (n=16). Em 22,5% das pacientes (n=9), a amostra foi positiva para ambos os marcadores ($Ki\text{-}67^{+}/TOPII\alpha^{+}$). Para uma melhor compreensão dos resultados as pacientes foram divididas em grupos de I a V de acordo com o resultado citológico. O percentual de positividade para Ki-67 no grupo I (n=16) foi igual a 0% e para TOPIIα foi igual a 6,25% (n=1), enquanto que o percentual de positividade nos Grupos II, III, IV e V, formado por 24 pacientes que apresentaram alteração citológica na base líquida foi igual a 41,6% para Ki-67 (n=10) e 62,5% para TOPIIα (n=15). O detalhamento dos grupos está descrito na tabela II.

Grupo	Citologia	Tamanho da amostra (n)	Ki-67(+)	TOPIIα(+)	Ki-67/TOPIIα(+)
I	NLIM	16	0	1 (6,25%)	0
II	ASC-US	6	2 (33,3%)	4 (66,6)	2 (33,3%)
III	ASC-H	2	1 (50%)	1 (50%)	1 (50%)
IV	LSIL	10	5 (50%)	5 (50%)	4 (40%)
V	HSIL	6	2 (33,3%)	4 (66,6%)	2 (33,3%)

Tabela II: Perfil Imunocitoquímico de Ki-67 e TOPIIα em esfregaços cervicais

O desempenho do Ki-67 foi melhor em pacientes com LSIL (índice de positividade igual a 50%), células imunorreativas apresentaram coloração marrom-escuro, homogênea, limitada exclusivamente ao núcleo (Fig. V). A expressão desse marcador também foi observada no estudo de Pirog e Colaboradores (2002) que concluiu que Ki-67 é um marcador altamente sensível e específico para identificar Lesões Intraepiteliais Escamosas de Baixo Grau (LSIL) e também é útil para elucidar casos que podem gerar dúvidas.

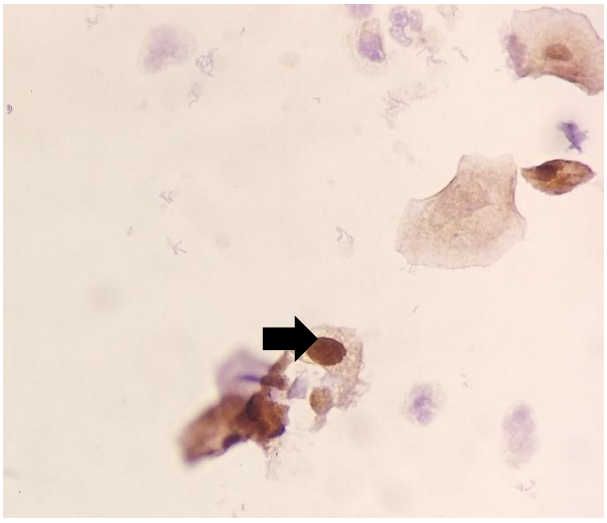

Figura V: Imunocitoquímica-positiva para Ki-67 em células cervicais de paciente com LSIL. (Aumento: 400x)

Em relação a reatividade para TOPIIα, a expressão foi alta em paciente com HSIL (66,6%) (Fig VI). Um estudo realizado em Barcelona que incluiu amostras de 123 mulheres direcionadas a colposcopia por apresentarem teste de DNA-HPV de alto risco positivo ou resultado citológico alterado, objetivou avaliar a expressão de seis marcadores (CDKN2A/p16, BIRC5, MMP9, TOPIIα, MCM5, and MKI67), através da técnica de detecção de mRNA. Mesmo usando uma técnica diferente, foi possível perceber uma maior sensibilidade de TOPIIα para identificar pacientes com lesão de alto grau (HSIL) quando comparado aos outros marcadores avaliados, realçando o potencial desse marcador (Del Pino, et al., 2015).

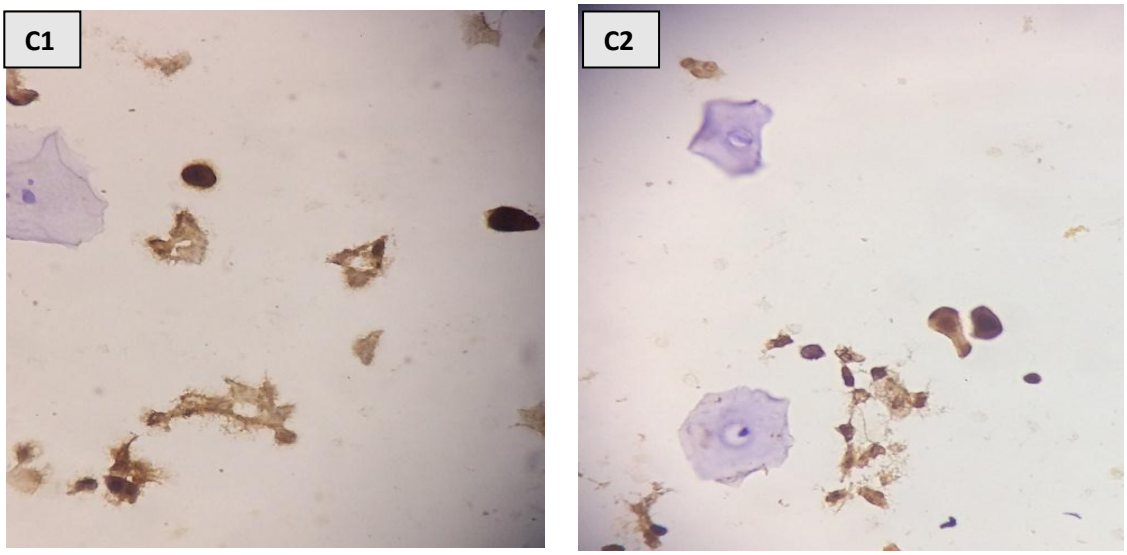

Figura VI – C1 e C2: Imunocitoquímica-positiva para TOPIIα em células cervicais de paciente com HSIL (Aumento: 400x)

Um outro estudo que avaliou amostras de 110 pacientes provenientes de unidades de saúde de Olinda-PE, cujo o objetivo era avaliar se os marcadores Ki-67 e TOPIIα, detectados por imunocitoquímica, poderiam melhorar a acurácia do rastreamento de lesões cervicais, detectou uma maior positividade dos marcadores nas amostras com anormalidades cervicais (71,9% para TOPIIα e 81,2% para Ki-67). Eles concluíram que, comparando os dois marcadores, TOPIIα foi mais eficiente em detectar HSIL, o que é concordante com o presente estudo (Peres, et al., 2016)

O teste de associação entre a imunocitoquímica e a citologia em base líquida revelou-se estatisticamente significante com valor de p=0,0026 para Ki-67 e p=0,0004 para TOPIIα. A associação entre os marcadores imunocitoquímicos e o exame histopatológico não se mostrou significativa. Os resultados estão resumidos na tabela III.

	Tamanho da Amostra (n)	Ki-67	TOPIIα
Citologia Base Líquida	40	p=0,0026	p=0,004
Histopatológico	15	p=0,7703	p=1,000

Tabela III: Análise imunocitoquímica associada a citologia em base líquida, a colposcopia e ao exame histopatológico.

A ausência de associação entre os marcadores imunocitoquímicos e o exame histopatológico, pode ter ocorrido porque esse exame foi realizado previamente, fora do período de estudo, e não no momento da coleta. Além disso, houve um pequeno número de resultados de biópsias disponíveis.

Diante do exposto, pode-se concluir que os marcadores avaliados Ki-67 e TOPIIα são ferramentas úteis que podem melhorar a acurácia do exame citológico, dada a associação existente entre a expressão desses marcadores em pacientes diagnosticadas com anormalidades cervicais pela citologia. Ki-67 apresentou um melhor desempenho em pacientes portadoras de LSIL, enquanto que TOPIIα se mostrou mais eficiente em detectar pacientes com HSIL. Estudos mais aprofundados, que incluam uma amostragem maior, assim como a incorporação de exames complementares como o teste de DNA-HPV podem contribuir para uma melhor compreensão dos resultados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BROWN, AJ E TRIMBLE, CL. **New Technologies for Cervical Cancer Screening**. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 26, Vol. 2, pp. 233-42, 2012.

DEL PINO, M, SVANHOLM-BARRIE, C, TORNÉ, A,MARIMON, L, GABER, J, SAGASTA A, PERSING, DH, ORDI, J**. mRNA biomarker detection in liquid-based cytology: a new approach in the prevention of cervical cancer.** Mod Pathol. 28, Vol. 2, pp. 1-13, 2015.

INCA. **Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil**, Rio de Janeiro, Coordenação de Prevenção e Vigilância, 2015.

MOUTINHO, J.M. **Manual de Ginecologia: Colposcopia.** Permanyer Portugal, Coimbra, 2010.

OZAKI, S, ZEN, Y E INOUE, M. **Biomarker expression in cervical intraepithelial neoplasia: potential progression predictive factors for low-grade lesions.** Hum Pathol. 42, Vol. 7, pp. 1007-12, 2011.

PERES, AL, PAZ E SILVA, KM, ARAÚJO, RFF, LIMA FILHO, JL, MELO JÚNIOR, MR, MARTINS, DBG, PONTES FILHO, NT. **Immunocytochemical study of TOP2A and Ki-67 in cervical smears from women under routine gynecological care.** Journal of Biomedical Science. 23, Vol. 42, pp. 1-8, 2016.

Persing, DH, Ordi, J**. mRNA biomarker detection in liquid-based cytology: a new approach in the prevention of cervical cancer.** Mod Pathol. 28, Vol. 2, pp. 1-13, 2015.

PIROG, E. C. M.D., et al. **Diagnostic Accuracy of Cervical Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesions Is Improved With MIB-1 Immunostaining.** American Journal of Surgical Pathology. 1, 2 Vol. 26, pp. 70-75, 2002.

SAHEBALI, S, DEPUYDT, CE, BOULET, GAV, ARBYN, M, MOENECLAY, LM, VEREECKEN, AJ**. Immunocytochemistry in liquid-based cervical cytology: analysis of clinical use following a cross-sectional study.** Int J Cancer. 118, Vol. 5, pp. 1254-60, 2006.

TORRE, LA, BRAY, F, SIEGEL, RL, FERLAY, J, LORTET-TIEULENT, J, JEMAL, A. **Global Cancer Statistic**. Cancer J Clin. 65, Vol. 2, pp. 1-22, 2015.

Wright, TC e Kuhn, L. **Alternative approaches to cervical cancer screening for developing countries.** Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 26, Vol. 2, pp. 197-208, 2012.

3. CONCLUSÃO

Baseando-se na metodologia utilizada e resultados obtidos podemos concluir que:

- O teste de associação entre a imunocitoquímica e a citologia em base líquida revelou-se estatisticamente significante, isso significa que esses marcadores se expressam de forma anormal em pacientes diagnosticadas com anormalidades cervicais pela citologia, consequentemente, Ki-67 e TOPIIα podem ser utilizados como ferramentas auxiliares que facilitam a localização de células potencialmente anormais;

- A incorporação da citologia em base líquida facilita a incorporação de testes moleculares nos programas de rastreamento, uma vez que é possível realizar tanto o estudo citológico quanto molecular em uma mesma amostra;

- A imunocitoquímica para Ki-67 e TOPIIα como teste de detecção destes antígenos se mostrou eficiente e uma alternativa viável para realizar o acompanhamento das lesões.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANÇUTA, E, ANÇUTA, C, COZMA, LG, IORDACHE, C, ANGHELACHE-LUPAŞCU, I, ANTON I, CARASEVICI, E, CHIRIEAC, R. **Tumor biomarkers in cervical cancer: focus on Ki-67 proliferantion factor and E-cadherin expression.** Rom J Morphol Embryol. 50, Vol. 3, pp. 413-8, 2008.

ASTBURY, K, MARTIN CM, RING, M, PILKINGTON, L, BOLGER, N, SHEILS, OM, O'LEARY, JJ. **Future Molecular Aspects ok Cervical Cytology.** Current Diagnostic Pathology. 12, pp. 104-113, 2006.

BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo, Patologia.** Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 1492, 2006.

BROWN, AJ E TRIMBLE, CL. **New Technologies for Cervical Cancer Screening**. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 26, Vol. 2, pp. 233-42, 2012.

BRUNI, L, DIAS, M, CASTELLSAGUÉ, X, FERRER, E, BOSCH, FX, SANJOSÉ, S. **Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 milion women with normal cytologiccal findings.** J Infect Dis. 202, Vol. 12, pp. 1789-99, 2010.

BURCHELL, A.N, WINER, RL, SANJOSÉ, S, FRANCO, EL. **Chapter 6: Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection.** Vaccine. 24, Vol. 3, pp. 52-61, 2006.

CASTELLSAGUÉ, X, BOSCH, FX E MUNOZ, N. **Environmental co-factors in HPV carcinogenesis.** Virus Res, 89, Vol. 2, pp. 191-9, 2002.

CASTELLSAGUÉ, X. **Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer.** Gynecol Oncol, 110, Vol. 3, pp. 4-7, 2008.

CELIK, C, GEZGINÇ, K, TOY, H, FINDIK, S, HILMAZ, O. **A comparison of liquid-based cytology with conventional cytology.** Int Gynaecol Obstet. 100, Vol. 2, pp. 163-6, 2008.

CONSOLARO, MEL, MARIA-ENGLER, SS. **Citologia Clínica Cérvico-Vaginal: Texto e Atlas.** Roca. São Paulo. 2012.

CROSBIE, EJ, EINSTEIN, MH, FRANCESCHI, S, KITCHENER, HC. **Human Papillomavirus and cervical cancer.** Lancet. 382, Vol. 9895, pp. 889-99, 2013.

DEL PINO, M, SVANHOLM-BARRIE, C, TORNÉ, A,MARIMON, L, GABER, J, SAGASTA A, PERSING, DH, ORDI, J**. mRNA biomarker detection in liquid-based cytology: a new approach in the prevention of cervical cancer.** Mod Pathol. 28, Vol. 2, pp. 1-13, 2015.

ECHELMAN, D E FELDMAN, S. **Management of cercical precancers: a global perspective.** Hematol Oncol Clin North Am. 26, Vol. 1, pp. 31-44, 2012.

ERICKSON, BK, ALVAREZ, RD E HUH, WK**. Human papillomavirus: what every provider should know**. Journal Obstet Gynecol-Elsevier, 208, Vol. 3, pp. 169-75, 2013.

ERICKSON, BK, ALVAREZ, RD E HUH, WK**. Human papillomavirus: what every provider should know.** Journal Obstet Gynecol-Elsevier. 208, Vol. 3, pp. 169-75, 2013.

FEDRIZZI, EN. **Epidemiologia da infecção genital pelo HPV.** Rev Bras Pat Trato Gen. 1, Vol. 1, pp. 3-8, 2011.

FERRO, A.B. **Manual de Imunohistoquímica.** Lisboa : s.n., 2013.

FREITAS, AC, COIMBRA, EC E MDCG, LEITÃO. **Molecular targets of HPV oncoproteins: Potential biomarkers for cervical carcinogenesis.** Biochim Biophys Acta - Rev Cancer. 1845, Vol. 2, pp. 91-103, 2014.

HORVAH C, VANDEN D, SAHEBALI S, BOGERS J. **Human papilomavirus: E6 and E7 oncogenes.** Int J Biochem Cell Biol. 39, pp. 2006-11, 2011.

INCA. **Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil**, Rio de Janeiro, Coordenação de Prevenção e Vigilância, 2015.

INCA**. Manual de Gestão da Qualidade para Laboratórios de Citopatologia**. Rio de Janeiro, Mnistério da Saúde , 2012.

KOSS, L E GOMPEL, C**. Introduction to Gynecologic Cytopathology with Histologic and Clinical Correlations.** : Lippincott Williams & Wilkins, New York, p. 203. 1999.

KUMAR, V, ET AL. **Robbins & Cotran PATOLOGIA.** Elsevier, Rio de Janeiro, p. 4456, 2010.

KURSHUMLIU, F, THORNS, C E GASHI-LUCI, L. **p16INK4A in routine pratice as a marker of cervical epithelial neoplasia.** Gynecol Oncol. 115 , Vol. 1, pp. 127-31, 2009.

MANNE, U E SRIVASTAVA, R. **Recent advances in biomarkers for cancer diagnosis and treatment.** Drug Discov Today. 10, Vol. 14, pp. 965-76, 2005.

MOODY, CA E LAIMINS, LA. **Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation.** Nat Rev Cancer. 10, Vol. 8, pp. 550-60, 2010.

MOUTINHO, J.M. **Manual de Ginecologia: Colposcopia.** Permanyer Portugal, Coimbra, 2010.

OZAKI, S, ZEN, Y E INOUE, M. **Biomarker expression in cervical intraepithelial neoplasia: potential progression predictive factors for low-grade lesions.** Hum Pathol. 42, Vol. 7, pp. 1007-12, 2011.

PERES, AL, PAZ E SILVA, KM, ARAÚJO, RFF, LIMA FILHO, JL, MELO JÚNIOR, MR, MARTINS, DBG, PONTES FILHO, NT. **Immunocytochemical study of TOP2A and Ki-67 in cervical smears from women under routine gynecological care.** Journal of Biomedical Science. 23, Vol. 42, pp. 1-8, 2016.

PINTO, AP, CRUM, CP E HIRSCH, MS. **Molecular Markers of early cervical neoplasia.** Diagnostic Histopathol. 16, Vol. 10, pp. 445-54, 2010.

PIROG, E. C. M.D., et al. **Diagnostic Accuracy of Cervical Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesions Is Improved With MIB-1 Immunostaining.** American Journal of Surgical Pathology. 1, 2 Vol. 26, pp. 70-75, 2002.

POLAK, JM E VAN NOORDEM, S. **Introduction to Immunocytochemistry**. Bios Scientific Publishers, Oxford2003. p. 176, 2003.

SAHASRABUDDHE, VV, LUHN, P E WENTZENSEN, N. **Improved Prevention Efforts.** Future Microbiol. 6, Vol. 9, pp. 1083-98, 2011.

SAHEBALI, S, DEPUYDT, CE, BOULET, GAV, ARBYN, M, MOENECLAY, LM, VEREECKEN, AJ**. Immunocytochemistry in liquid-based cervical cytology: analysis of clinical use following a cross-sectional study.** Int J Cancer. 118, Vol. 5, pp. 1254-60, 2006.

SASLOW, D, ET AL. **NIH Public Access.** J Low Genit Tract Dis. 16, Vol. 3, pp. 175-204, 2014.

SHAN-RONG SHI, JG. **Sensitivity and Detection Efficiency of a Novel Two-Step Detection System (PowerVision) for Immunohistochemistry.** Appl Immunohistochem Amp Mol Morphol. 7, Vol. 3, p. 201, 1999.

SKALAND, I, et al. **Evaluation of 5 different labeled polymer immunohistochemical detection systems.** Appl Immunohistochem Mol Morphol. 18 , Vol. 1, pp. 90-96, 2010.

SMITH, JHF. **Cytology, liquid-based cytology and automation.** Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 25, Vol. 5, pp. 585-96, 2011.

SOLOMON, D E NAYAR, R. **Sistema Bethesda para Citopatologia Cervicovaginal.** Revinter Ltda, New York, 2004.

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

TORRE, LA, BRAY, F, SIEGEL, RL, FERLAY, J, LORTET-TIEULENT, J, JEMAL, A. **Global Cancer Statistic**. Cancer J Clin. 65, Vol. 2, pp. 1-22, 2015.

VALE, DBAP, MORAIS, SS, PIMENTA, AL, ZEFERINO, LC. **Avaliação do rastreamento do câncer do colo do útero na estratégia saúde da família no município de Amparo, São Paulo, Brasil.** Cad Saude Publica. 26, Vol. 2, pp. 383-90, 2010.

WENTZENSEN, N E KLUG, SJ. **Early detection of cervical carcinomas: finding an overall approach.** Dtsch Arztebl Int. 105, Vol. 37, pp. 617-22, 2008.

WRIGHT, TC E KUHN, L. **Alternative approaches to cervical cancer screening for developing countries.** Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 26, Vol. 2, pp. 197-208, 2012.

ANEXOS

ANEXO A – Certificado de Aprovação do Comitê de Ética

ASSOCIAÇÃO CARUARUENSE DE ENSINO SUPERIOR -

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES POR IMUNOCITOQUÍMICA EM AMOSTRAS CERVICAIS DE PACIENTES COM LESÕES INTRAEPITELIAIS PROCESSADAS POR CITOLOGIA EM BASE LÍQUIDA (Liqui-PREPTM).

Pesquisador: ADRYA LÚCIA PERES BEZERRA DE MEDEIROS

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 43319915.9.0000.5203

Instituição Proponente: ASSOCIAÇÃO CARUARUENSE DE ENSINO SUPERIOR

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.050.262

Data da Relatoria: 07/04/2015

Apresentação do Projeto:

O presente Projeto de Pesquisa, intitulado "IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES POR IMUNOCITOQUÍMICA EM AMOSTRAS CERVICAIS DE PACIENTES COM LESÕES INTRAEPITELIAIS PROCESSADAS POR CITOLOGIA EM BASE LÍQUIDA (Liqui-PREPTM)", trata-se de um estudo observacional, analítico e longitudinal. A seleção de amostras se dará por conveniência incluindo pacientes acima de 18 anos atendidas no período do estudo que mostrarem resultados do exame citológico com anormalidades (ASC-US,LSIL, HSIL ou Câncer) e forem encaminhadas ao centro de referência em colposcopia do Município de Jaboatão-PE. Sendo o estudo citopatológico desenvolvido no laboratório Labocito, prestador de serviço credenciado ao SISCAN, já as reações imunocitoquímicas e as análises moleculares no Laboratório de Patologia do LIKA (Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami)-UFPE. Para o qual se espera detectar expressão das proteínas KI-67 e TOP IIa nas amostras citológicas com anormalidades (atípias, lesões intraepiteliais ou câncer) através da reação imunocitoquímica; identificação DNA do HPV em amostras cervicais e associação as alterações citológicas, a infecção pelo HPV e a expressão das proteínas KI-67 e TOP IIa nas amostras analisadas.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Endereço: Avenida Portugal, 584
Bairro: Universitário **CEP:** 55.016-010
UF: PE **Município:** CARUARU
Telefone: (81)2103-2090 **Fax:** (81)2103-2053 **E-mail:** cep@asces.edu.br

Analisar a expressão de marcadores moleculares em amostras citológicas com anormalidades e processadas em meio líquido em mulheres submetidas ao rastreamento do câncer cervical.

Objetivo Secundário:

• Processar amostras citológicas cervicais pelo método em meio líquido;

• Verificar a expressão das proteínas KI-67 e TOP IIa nas amostras citológicas com anormalidades (atipias, lesões intraepiteliais ou câncer) através da reação imunocitoquímica/quimioluminescencia;

• Identificar DNA do HPV em amostras cervicais;

• Associar as alterações citológicas, a infecção pelo HPV e a expressão das proteínas KI-67 e TOP IIa nas amostras analisadas;

• Acompanhar a expressão dos marcadores com os resultados da citologia, nos 6 e 12 meses após monitoramento das pacientes;

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos serão minimizados, visto que o procedimento é rotineiramente realizado na prática laboratorial sem gerar danos a paciente. O que poderá ocorrer será um pequeno desconforto, o qual será atribuído apenas à coleta de amostra de material cérvico-vaginal após introdução do espéculo apropriado a nível vaginal, permitindo visualização do colo uterino. Serão utilizadas escova e espátula especial, para remover algumas células do colo do útero, as quais serão mandadas a um laboratório para serem analisadas microscopicamente. O risco de expor as pacientes a qualsquer
constrangimentos será minimizado, visto que a abordagem será individual e sigilosa, além de que esta manipulação de dados será de total responsabilidade dos pesquisadores envolvidos.

Benefícios:

Serão benefícios a realização de exames sem custo algum as pacientes que participarem da pesquisa; melhores esclarecimentos relacionados ao desenvolvimento de lesões e câncer cervical.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Segundo dados do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (2014), as estimativas para o ano de 2014 e 2015 de número de novos casos do câncer do colo do útero em mulheres segundo localização primária no Brasil é de 15.590, sendo considerado no Nordeste Brasileiro como o segundo mais frequente. O diagnóstico precoce do câncer do colo uterino permite o

ASSOCIAÇÃO CARUARUENSE DE ENSINO SUPERIOR -

rastreamento das lesões de colo em
suas fases iniciais antes de se tornarem lesões invasivas através de um método de detecção conhecido como exame de Papanicolau. Logo este estudo tem como objetivo a identificação de marcadores moleculares por imunocitoquímica em amostras cervicais de pacientes com lesões intraepiteliais processadas por citologia em base líquida (liqui-preptm). Trata-se, portanto, de um relevante trabalho que trará benefícios as pacientes participantes da pesquisa, bem como ao conjunto da sociedade e comunidade científica.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados os Termos Obrigatórios, conforme exigências do Sistema CEP/CONEP.

Recomendações:

No TCLE, recomenda-se acrescentar os nomes e telefones de contato dos pesquisadores envolvidos na pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

No TCLE, recomenda-se acrescentar os nomes e telefones de contato dos pesquisadores envolvidos na pesquisa.

Projeto de Pesquisa aprovado para execução.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CARUARU, 05 de Maio de 2015

Assinado por:
ROSIEL JOSÉ DOS SANTOS
(Coordenador)

ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado para participar da pesquisa intitulada:Identificação de marcadores moleculares por imunocitoquímica em amostras cervicais de pacientes com lesões intraepiteliais processadas por citologia em base líquida (Liqui-Prep^{tm}).

Com este trabalho, pretendemos testar alguns biomarcadores em amostras citológicas de cérvice uterina processadas em citologia em base líquida, contribuído para melhor diagnóstico e prognóstico das lesões intraepiteliais cervicais e câncer, contribuindo na prevenção do câncer cervical e consequentemente para a saúde da mulher.

Os riscos serão minimizados, visto que o procedimento é rotineiramente realizado na prática laboratorial sem gerar danos a paciente. O que poderá ocorrer será um pequeno desconforto, o qual será atribuído apenas à coleta de amostra de material cérvico-vaginal após introdução do espéculo apropriado a nível vaginal, permitindo visualização do colo uterino. Serão utilizadas escova e espátula especial, para remover algumas células do colo do útero, as quais serão mandadas a um laboratório para serem analisadas microscopicamente. O risco de expor as pacientes a quaisquer constrangimentos será minimizado, visto que a abordagem será individual e sigilosa, além de que esta manipulação de dados será de total responsabilidade dos pesquisadores envolvidos.

Sua participação não é obrigatória. A sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a Instituição.

Os resultados obtidos por meio desta pesquisa serão publicados sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação, bem como os seus dados pessoais.

Como participante você receberá uma cópia deste termo, onde constam os telefones e o endereço da Instituição vinculada aos pesquisadores, e nos disponibilizamos a tirar todas às duvidas que possam surgir relativas à pesquisa e sua participação.

Declaro para devidos fins que entendi os benefícios, riscos e objetivos da minha participação na pesquisa intitulada identificação de marcadores moleculares por imunocitoquímica em amostras cervicais de pacientes com lesões intraepiteliais processadas por citologia em base líquida (Liqui-Prep^{tm}).

Nome: _____

_____

Assinatura do Participante ou Responsável Legal

_____

Adrya Lúcia Peres Bezerra

Professora Responsável