

# Ciclo celular, HPV e evolução da neoplasia intraepitelial cervical: seleção de marcadores biológicos

*Cell cycle, HPV and cervical intraepithelial neoplasia evolution: biomarkers selection*

Laís de Campos Ferraz<sup>1</sup>, Ana Beatriz Rossetti Santos<sup>1</sup>, Michelle Garcia Discacciati<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Curso de Biomedicina da Universidade Paulista, Campinas-SP, Brasil.

## Resumo

O câncer de colo do útero é a segunda causa de câncer mais comum entre as mulheres em todo o mundo, sendo precedido por lesões precursoras denominadas neoplasias intraepiteliais cervicais (NICs), de grau 1, 2 e 3. A relação entre o papilomavírus humano (HPV) e o câncer de colo uterino já está bem estabelecida. O ciclo de vida do HPV, assim como seu mecanismo de ação sobre o ciclo celular da célula hospedeira, causam a transformação neoplásica e progressão das lesões precursoras para o câncer de colo uterino. Tal transformação está associada principalmente à expressão de dois genes do HPV: o E6 e o E7, cujos produtos interferem no controle do ciclo celular, tendo como alvos principais as proteínas p53 e pRB. Esta revisão de literatura pretende fornecer ao leitor conhecimento da ação do HPV sobre o ciclo celular, visando identificar potenciais marcadores biológicos da evolução das lesões precursoras ao câncer de colo uterino.

**Descritores:** Infecções por papilomavírus; Neoplasia intraepitelial cervical; Ciclo celular; Proteínas oncogênicas virais; Inibidores p16 de quinase ciclina-dependente

## Abstract

Cervical cancer is the second most common malignant disease in women worldwide and is preceded by cervical intraepithelial neoplasia (CIN) grades 1, 2 and 3. The relationship between human papillomavirus (HPV), cervical CIN and cervical cancer is well established. The HPV life cycle cause neoplastic transformation and CIN progression for cervical cancer. This transformation is associated with E6 and E7 HPV genes, whose products interfere with cell cycle control, mainly through action on p53 and pRB proteins. This review aims to provide to the reader an update for the understanding of the HPV effects on the cell cycle, attempting to identify potential biological markers for the evolution of precursor lesions to cervical cancer.

**Descriptors:** Papillomavirus infections; Cervical intraepithelial neoplasia; Cell cycle; Oncogene protein, viral; Cyclin-dependent kinase inhibitor p16

## Introdução

Segundo a *International Agency for Research on Cancer* (IARC), o câncer do colo do útero é a segunda causa de câncer mais comum entre as mulheres em todo o mundo<sup>1</sup>.

A infecção pelo papilomavírus humano (HPV) é atualmente considerada uma condição necessária para desenvolvimento do câncer de colo do útero<sup>2</sup>. Contudo, apesar desta infecção ser a mais comum das doenças sexualmente transmissíveis<sup>3</sup>, apenas uma pequena parcela das mulheres infectadas pelo vírus desenvolvem o câncer, o que demonstra que apenas a presença do HPV parece ser insuficiente para o desenvolvimento de câncer cervical<sup>2</sup>.

Já foram identificados cofatores na gênese do câncer de colo do útero que se somam à infecção viral tais como: fatores comportamentais (tabagismo, uso de hormônios exógenos), relacionados ao hospedeiro (idade, resposta imune, predisposição genética) e relacionados ao vírus (tipo, variante, carga viral, integração)<sup>4</sup>.

O câncer do colo do útero é uma doença de progressão lenta, sendo precedido por lesões precursoras denominadas neoplasias intraepiteliais cervicais (NICs) ou lesões intraepiteliais cervicais. Tais lesões foram classificadas por Richart<sup>5</sup> em 1973 como NIC 1, NIC 2 e NIC 3 de acordo com o grau de comprometimento epitelial e são caracterizadas pela perda gradual das funções celulares básicas, como o controle da divisão celular e capacidade de amadurecimento<sup>6</sup>.

Em média transcorrem de 12 a 15 anos entre o momento

da infecção por HPV e o desenvolvimento do câncer cervical, o que reforça o padrão de múltiplos estágios no processo de carcinogênese<sup>7</sup>. Considerando esta lenta progressão, a identificação de potenciais marcadores de proliferação celular e de progressão das lesões, pode ser valiosa no seguimento das pacientes com infecção por HPV e presença de NIC, auxiliando no diagnóstico e prognóstico da doença e na definição daquelas que se beneficiariam de conduta expectante ou de tratamento primário imediato<sup>8</sup>.

## Revisão da literatura

### *HPV: classificação e estrutura genômica*

O HPV pertence à família *Papillomaviridae*, gênero Papilomavírus. São vírus não envelopados de simetria icosaédrica, com capsídeo composto por 72 capsômeros e um genoma de DNA dupla fita circular, com cerca de 8.000 pares de bases<sup>9-10</sup>.

Mais de 200 tipos de HPV já foram identificados e cerca de 40 destes infectam o trato genital feminino<sup>10</sup>. Os tipos de HPV são classificados entre vírus de alto ou baixo risco oncogênico, de acordo com a propensão das células infectadas à transformação neoplásica<sup>11</sup>. Os tipos de HPV considerados de baixo risco oncogênico são representados principalmente pelos tipos 6, 11, 40, 42, 43, 54, 61, 70, 72, 81. Aqueles considerados de alto risco oncogênico, por estarem frequentemente associados às NICs 2 e 3 e às neoplasias invasoras, são representa-

dos principalmente pelos tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82<sup>12</sup>.

O risco oncogênico do vírus está diretamente relacionado ao comportamento de seu genoma no núcleo da célula hospedeira. HPVs de baixo risco oncogênico tendem a manter o seu DNA íntegro, circular e episossomal, diferente dos HPVs de alto risco oncogênico, cujas fitas de DNA circular se abrem, sofrem deleções e se integram ao genoma da célula hospedeira<sup>9,13</sup>.

O genoma do HPV possui oito regiões conhecidas como fases de leitura aberta (*Open Reading Frames*) e uma região não-codificadora. As fases de leitura aberta são organizadas em três regiões: a região precoce (composta pelos genes E1, E2, E4, E5, E6, E7), a região tardia (composta pelos genes L1 e L2), e a região controladora (URR)<sup>9</sup> (Figura 1).

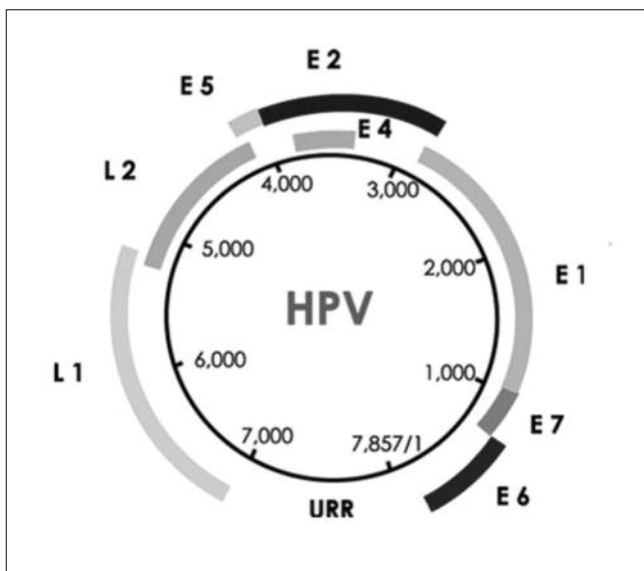


Figura 1. Representação esquemática do genoma do HPV  
Fonte: Muñoz *et al.*<sup>6</sup> (2006)

Resumidamente, os genes E1 e E2 codificam proteínas que são vitais para a replicação do DNA viral e controle da transcrição gênica do vírus. A proteína E4 é expressa nos estágios tardios da infecção e tem um papel importante na alteração da matriz intracelular, maturação e liberação das novas partículas virais. As proteínas E6 e E7 são importantes para a amplificação do genoma viral. As regiões tardias L1 e L2 codificam as proteínas virais dos capsídeos durante os últimos estágios da replicação dos vírus<sup>9,13</sup>.

### Ciclo celular

O ciclo celular pode ser conceituado como uma cadeia de eventos que leva à proliferação celular por mitose<sup>14</sup>.

A divisão celular nos seres eucariontes compreende quatro fases: G1, S, G2 e M. Células quiescentes encontram-se em uma condição denominada G0. A fase G1 é considerada uma fase pré-sintética, na qual a célula inicia a ativação de uma série de genes, incluindo proto-oncogenes e genes necessários à síntese de ribossomos e tradução de proteínas. A fase S compreende o período da duplicação do DNA. O período G2 é o intervalo entre o final da síntese e o início da mitose propriamente dita da célula em questão, sendo por essa razão denominada fase pré-mitótica. Na fase

M ocorre a divisão do núcleo seguida da citocinese<sup>14-15</sup>.

A cadeia de eventos que levam a divisão celular é em geral dependente da ligação de fatores de crescimento a receptores celulares, seguida de ativação de um mecanismo de transdução de sinal envolvendo proteínas sinalizadoras como Fosfolipase C- $\gamma$ , proteínas G, proteínas *Ras/Raf*. Ocorre então a transferência de informação para o núcleo e a modulação da transcrição de genes através da atividade de fatores de transcrição como *c-JUN* e *c-MYC*<sup>14-15</sup>.

A progressão do ciclo celular a partir da fase G1 é regulada por proteínas chamadas ciclinas, as quais formam um complexo com proteínas chamadas quinases ciclina-dependentes (CDKs). Os complexos ciclina-CDK regulam a fosforilação de proteínas envolvidas na progressão do ciclo celular<sup>14-15</sup>.

O gene RB foi o primeiro gene supressor de tumor a ser descoberto e seu produto, a proteína RB (pRB), exerce efeitos antiproliferativos ao controlar a transição da fase G1 para a fase S do ciclo celular. Tal proteína na forma ativa (hipofosforilada) encontra-se ligada ao fator de transcrição E2F (proteína de regulação gênica), que estimula a transcrição de vários genes envolvidos na fase S do ciclo. Ligada à pRB, a ação de E2F permanece bloqueada e, assim, a célula para em G1. Os complexos ciclina-CDK ocasionam a fosforilação da pRB. Uma vez hiperfosforilada, a pRB torna-se inativa e se desliga do fator E2F, dando continuidade ao ciclo celular<sup>15-16</sup>.

Nas células normais, existem proteínas que exercem controle negativo sobre o ciclo celular. Os inibidores de CDK (CDKIs) interagem com as CDKs bloqueando sua atividade. As CDKIs, como p21 e p16<sup>INK4</sup>, exercem controle negativo sobre a proteína pRB por bloquearem a atividade dos complexos ciclina-CDKs que fosforilam a pRB, promovendo assim a parada do ciclo celular na fase G1<sup>15,17</sup>.

O gene supressor de tumor p53 atua como uma das principais vias de controle do ciclo celular, reparo do DNA e indução da morte celular por apoptose, ao ativar a transcrição dos genes p16, GADD45 e BAX. Assim, o gene p53 impede que células com anormalidades em seu DNA completem o ciclo celular<sup>15,17</sup>. Ao parar o ciclo celular em G1 pela ação da CDKI p16<sup>INK4</sup>, a célula tem a chance de reparar o dano no DNA antes de dar continuidade ao ciclo através do gene GADD45. O gene BAX, também ativado pela p53, induz a apoptose nas células cujo DNA foi irreversivelmente lesado<sup>15,18</sup>.

Logo, o gene p53 é considerado um “guardião do genoma” por impedir a transformação neoplásica através de três mecanismos: 1) interrompendo o ciclo celular em células com DNA alterado, 2) reparando o DNA e 3) disparando a morte celular programada (apoptose) nas células cujo reparo do DNA não foi possível<sup>15</sup>.

### Mecanismos de alteração do ciclo celular pelo HPV

A infecção inicial por HPV requer acesso de partículas virais às células da camada proliferativa basal do epitélio escamoso do colo uterino. Após a infecção, acredita-se que o vírus mantenha seu genoma com um baixo número de cópias sob a forma episossomal nas células da camada basal. Nesta fase, há um baixo nível de expressão dos genes E6, E7, E1 e E2, suficiente para a manutenção genômica do vírus<sup>19</sup>.

A expressão dos genes virais é regulada e dependente da

diferenciação das células infectadas pelo HPV. Segundo Doorbar<sup>19</sup> (2005), o ciclo normal da infecção pelo HPV passa por cinco etapas consecutivas: 1) infecção, 2) manutenção do genoma, 3) fase proliferativa, 4) amplificação genômica e 5) síntese e liberação de novas partículas virais.

Para a produção de partículas virais, ocorre a amplificação do genoma do HPV, que é dependente da expressão dos genes E1, E2, E4 e E5. A montagem das partículas infecciosas ocorre nas camadas médias e superiores do epitélio cervical. Nesta fase mais tardia, os genes L1 e L2 codificam as proteínas do capsídeo viral e são expressos nos grupos de células com maior expressão do gene E4, importante na alteração da matriz intracelular, maturação e replicação do vírus<sup>19</sup>. A montagem dos vírions e o empacotamento do DNA celular ocorrem na camada superficial. A formação e liberação de partículas virais completas são liberadas na superfície do epitélio sem lisar as células hospedeiras, caracterizando o ciclo produtivo da infecção pelo HPV<sup>19</sup>.

Esta organização da expressão viral no ciclo de uma infecção produtiva é semelhante para os diferentes tipos de HPV. Porém, o desenvolvimento de neoplasias está associado à perda da regulação deste ciclo produtivo do HPV, evento observado em infecções persistentes pelos HPVs de alto risco oncogênico, que tendem a integrar o seu genoma ao da célula hospedeira<sup>7,18-19</sup>. Durante o processo de integração, o genoma viral pode perder o gene E4 e parte do gene E2, que exerce função de controle da transcrição dos demais genes virais. Em consequência da perda de função de E2, haverá um aumento da expressão dos genes E6 e E7 e uma incapacidade do vírus dar continuidade ao seu ciclo de vida. Neste cenário, não haverá amadurecimento das células hospedeiras e produção de novas partículas virais<sup>13,18-19</sup>.

A alta velocidade de proliferação das células infectadas que já não é mais restrita às camadas inferiores do epitélio, a perda de polaridade e maturação das células com perturbação da arquitetura tecidual, assim como a perda da capacidade de completar o ciclo produtivo do vírus, diferenciam as lesões de baixo grau como a NIC 1, das lesões de alto grau (NICs 2 e 3) e câncer provocados por HPVs de alto risco oncogênico<sup>7,19</sup>.

O potencial oncogênico do HPV está relacionado aos produtos dos genes E6 e E7, que interagem com uma variedade de proteínas reguladoras do ciclo celular codificadas por genes supressores de tumor (Figura 2).

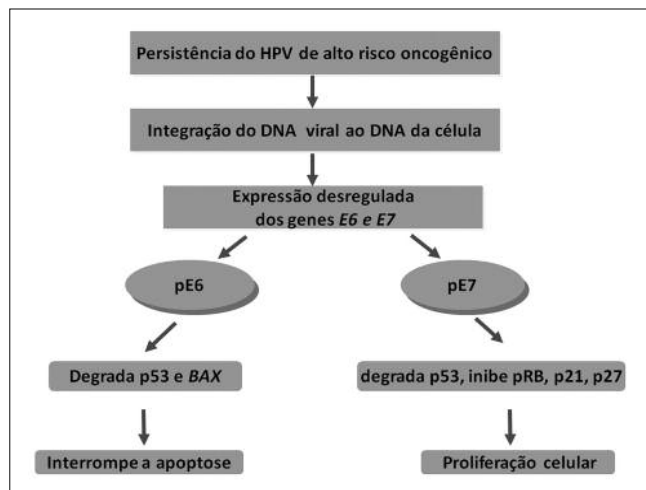


Figura 2. Principal atuação das proteínas virais sobre o ciclo celular

A proteína E7 inibe a atividade da pRB, que tem papel fundamental na manutenção da célula em G1, exercendo sua função por formar complexos estáveis com o fator de transcrição E2F. O E2F quando livre, desencadeia o processo de replicação do DNA<sup>20-21</sup>.

A inativação da pRB aumenta a proliferação celular no epitélio infectado, o que pode ser diretamente demonstrado através da detecção do antígeno nuclear associado à proliferação (Ki-67)<sup>22</sup>.

A p16<sup>INK4</sup>, uma CDKI que inibe a fosforilação da pRB, mantendo-a ativa e ligada ao E2F, tem sua expressão controlada por feedback negativo exercido pela pRB. A inativação da pRB pela proteína E7 do HPV resulta em um aumento da expressão de p16<sup>INK4</sup> nas células infectadas<sup>16,18,20</sup>.

A proteína E7 do HPV também é capaz de se ligar à p21 e p27, ambas CDKIs, o que impede o controle do ciclo celular em diversos pontos de checagem<sup>15,21</sup>.

O HPV pode interferir no controle do ciclo celular e apoptose por meio dos produtos de seus genes E6 e E7, os quais se ligam à p53, marcando-a para degradação pelo proteassomo<sup>21</sup>. A degradação da p53 pelas proteínas virais compromete a integridade do DNA replicado, causando instabilidade cromossomal, imortalização e proliferação anormal das células transformadas, favorecendo o desenvolvimento do tumor. A proteína E6 também está envolvida na degradação da proteína pró-apoptótica BAX em queratinócitos humanos<sup>21</sup>.

## Discussão

Há muita heterogeneidade no comportamento biológico das NICs. Algumas lesões deste tipo podem não representar verdadeiros precursores do câncer de colo uterino, uma vez que as infecções produtivas que albergam espécies de HPV de baixo risco oncogênico costumam apresentar regressão espontânea<sup>7</sup>. Em contraste, existem NICs que exibem expressões gênicas virais similares às observadas nos carcinomas e lesões de alto grau, incluindo aumento na expressão dos genes E6 e E7, normalmente associadas às infecções por HPVs de alto risco oncogênico<sup>7</sup>.

Uma vez que os produtos destes genes, as proteínas E6 e E7, possuem diferentes alvos celulares, marcadores biológicos relacionados ao ciclo celular e à expressão de tais genes virais podem ter utilidade na detecção de mulheres infectadas por HPV com maior probabilidade de apresentar progressão da NIC para o câncer invasor.

Neste contexto, tem sido sugerido que biomarcadores podem aumentar a acurácia e a efetividade dos programas de rastreamento e diagnóstico das lesões precursoras do câncer<sup>23</sup>. Dentre os marcadores relacionados à alteração da proliferação celular mais estudados destacam-se o Ki-67, p16<sup>INK4</sup> e p53<sup>17,22-24</sup>.

A proteína p16<sup>INK4</sup> constitui o marcador mais estudado para progressão da NIC. A determinação da expressão p16<sup>INK4</sup> já foi utilizada para marcar pacientes de risco com biopsia negativa<sup>25</sup>. Também já foi demonstrado um aumento da expressão de p16<sup>INK4</sup> em lesões de alto grau, como NIC 2 e NIC 3, em contraste com a não detecção deste marcador nos casos de NIC 1 ou alterações benignas<sup>20</sup>. Dentro da rotina de diagnóstico laboratorial, a

imuno-histoquímica para p16<sup>INK4</sup> pode representar um teste auxiliar útil no exame de biópsias cervicais dirigidas por colposcopia<sup>26</sup>. Além disto, a análise imunocitoquímica de p16<sup>INK4</sup> representa uma ferramenta útil nos casos em que o exame citológico é incapaz de determinar a natureza de algumas alterações morfológicas observadas, ajudando a distinguir lesões neoplásicas de alterações benignas<sup>27</sup>.

Uma meta-análise conduzida por Tsoumpou *et al.*<sup>28</sup> (2009), demonstrou uma forte correlação entre a positividade para p16<sup>INK4</sup> e a severidade das lesões do colo uterino, mas os autores consideram que a reprodutibilidade do teste para p16<sup>INK4</sup> ainda é limitada devido à insuficiência na padronização da interpretação das reações de imunocoloração. Além disso, há certa heterogeneidade em relação à expressão de p16<sup>INK4</sup> de acordo com os diferentes graus de NIC e câncer cervical<sup>29</sup>, de tal maneira que, apesar de representar uma boa ferramenta de auxílio ao diagnóstico das lesões, estudos ainda são necessários para definir a utilidade deste marcador como ferramenta de rastreamento do câncer de colo uterino.

Em relação aos marcadores biológicos relacionados ao vírus HPV, há fortes indicações de que os transcritos E6 e E7 do HPV podem representar marcadores úteis na determinação do risco de progressão das NICs<sup>30-32</sup>. A superexpressão desregulada dos genes E6 e E7 causa mudanças no ciclo e função celular, levando a transformação maligna e, de fato, há um aumento da detecção de RNA mensageiro (mRNA) de E6 e E7 em lesão de alto grau e carcinoma cervical<sup>30-32</sup>.

Sotlar *et al.*<sup>30</sup> (2004) encontraram uma prevalência de detecção de transcritos de HPV de 84% nos casos de NIC 3, 77% nos casos de NIC 2 e 58% nos casos de NIC 1, o que demonstra a estreita relação entre a expressão dos genes E6 e E7 com a gravidade da lesão precursora do câncer de colo uterino. Entretanto, é importante salientar que o desenho dos estudos supracitados é do tipo transversal. Assim, as informações sobre a expressão destes genes E6 e E7 espelham a situação biológica no momento da coleta de amostra. Por outro lado, um estudo longitudinal conduzido em 2010, no qual 50 mulheres com diagnóstico histológico de NIC 2 foram acompanhadas com conduta expectante por 12 meses, não mostrou diferença estatisticamente significativa entre a detecção de mRNA de E6 e E7 para os HPVs dos tipos 16, 18, 31, 33 e 45 e a evolução da lesão cervical<sup>33</sup>.

Apesar de ainda não ter sido demonstrado resultados convincentes como ferramenta de acompanhamento, um estudo considerou útil o teste para mRNA dos genes E6 e E7 no rastreamento das lesões, devido à sua maior especificidade em relação aos testes moleculares para detecção do DNA viral. Além de indicar a presença do vírus, este teste indica se este vírus demonstra expressão desregulada de E6 e E7, ou seja, se as células infectadas estão em processo de carcinogênese. Quando utilizado como ferramenta de rastreamento complementar à citologia, estudo demonstrou que o teste para mRNA pode detectar um número maior de lesões de alto grau do que a citologia sozinha, sem aumentar o número de biópsias (exame necessário para confirmação do diagnóstico)<sup>34</sup>.

O tratamento preconizado para a NIC, principalmente a NIC de alto grau, é o tratamento por excisão cirúrgica da lesão<sup>35</sup>. Tal procedimento pode representar supertratamento para uma lesão se esta apresentar baixo potencial de progressão<sup>8</sup>. Assim, com base na ponderação entre o risco de progressão da NIC e a possibilidade de complicações oriundas do tratamento, uma conduta expectante poderia ser adotada com maior segurança, desde que haja subsídios para tal decisão clínica. Tais subsídios podem ser fornecidos pelo conhecimento de marcadores preditivos da evolução da NIC, sendo que a avaliação da proteína p16<sup>INK4</sup> e da expressão dos genes virais E6 e E7 despontam como fatores prognósticos.

## Conclusão

Dentre os marcadores biológicos com potencial para serem utilizados como fatores preditivos da evolução das lesões precursoras do câncer de colo uterino destacam-se a proteína p16<sup>INK4</sup>, relacionada ao ciclo celular, e os transcritos dos genes E6 e E7 do HPV.

## Referências

1. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization. GLOBOCAN: Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2008 [acesso 17 maio 2011]. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=900>
2. Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol.* 2002;55(4):244-65.
3. Hoory T, Monie A, Gravitt P, Wu TC. Molecular epidemiology of human papillomavirus. *J Formos Med Assoc.* 2008;107(3):198-217.
4. Wang SS, Hildesheim H. Viral and host factors in human papillomavirus persistence and progression. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2003;(31):35-40.
5. Richart RM. Cervical intraepithelial neoplasia. *Pathol Annu.* 1973;8:301-28.
6. DeMay RM. The Pap smear. *In:* DeMay RM, editor. *The art and the science of cytopathology.* Chicago: ASCP Press; 1966.
7. Snijders PJF, Steenbergen RDM, Heideman DAM, Meijer CJ. HPV-mediated cervical carcinogenesis: concepts and clinical implications. *J Pathol.* 2006;208(2):152-64.
8. Discacciati MG, de Souza CA, d'Ottaviano MG, Angelo-Andrade LA, Westin MC, Rabelo-Santos SH *et al.* Outcome of expectant management of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 in women followed for 12 months. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2011;155(2):204-8.
9. Muñoz N, Castellsagué X, de González AB, Gissmann L. HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine.* 2006;24 Suppl 3:S3/1-10.
10. García-Espinosa B, Nieto-Bona MP, Rueda S, Silva-Sánchez LF, Piernas-Morales MC, Carro-Campos P *et al.* Genotypes distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with cervical lesions in Bioko, Equatorial Guinea. *Diagn Pathol.* 2009;4(3):1-8.
11. De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology.* 2004;324(1):17-27.
12. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV *et al.* International Agency for Research on Cancer Multi-center Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* 2003;348(6):518-27.

13. Scheurer ME, Tortolero-Luna G, Adler-Storthz K. Human papillomavirus infection: biology, epidemiology and prevention. *Int J Gynecol Cancer*. 2005;15:727-46.
14. Cotran RS, Kumar V, Collins T. Robbins: patologia estrutural e funcional. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.
15. Kumar V, Abbas A, Fausto N, Mitchell RN. Robbins: patologia básica. 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2010.
16. Singh S, Johnson J, Chellappan S. Small molecule regulators of Rb-E2F pathway as modulators of transcription. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1799(10-12):788-94.
17. Eleutério Junior J, Giraldo PC, Gonçalves AK. Marcadores imunistoquímicos de lesões precursoras do câncer de colo uterino associadas ao HPV: o papel da proteína de supressão tumoral p16ink4a. *DST J Bras Doenças Sex Transm*. 2006;18(1):62-5.
18. Wentzensen N, Vinokurova S, von Knebel Doeberitz M. Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. *Cancer Res*. 2004;64:3878-84.
19. Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol*. 2005;32S:S7-S15.
20. Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U *et al*. Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer*. 2001;92:276-84.
21. Ganguly N, Parihar SP. Human papillomavirus E6 e E7 oncoproteins as risk factors for tumorigenesis. *J Biosci*. 2009;34:113-23.
22. Kruse AJ, Baak JP, de Bruin PC, Jiwa M, Snijders WP, Boordt PJ *et al*. Ki-67 immunohistochemistry in cervical intraepithelial neoplasia (CIN): a sensitive marker for grading. *J Pathol*. 2001;193:48-54.
23. Middletoon K, Peh W, Southern S, Griffin H, Sotlar K, Nakahara T *et al*. Organization of human papillomavirus productive cycle during neoplastic progression provides a basis for selection of diagnostic markers. *J Virol*. 2003;77(19):10186-201.
24. Keating JT, Cviko A, Riethdorf S, Riethdorf L, Quade BJ, Sun D *et al*. Ki67, Cyclin E and p16<sup>ink4a</sup> are complementary biomarkers for human papilloma virus – related cervical neoplasia. *Am J Pathol*. 2001;25:884-91.
25. Ordi J, Garcia S, del Pino M, Landolfi S. p16 INK4a immunostaining identifies occult CIN lesions in HPV-positive women. *J Gynecol Pathol*. 2009;28(1):90-7.
26. Dray M, Russell P, Dalrymple C, Wallman N, Angus G, Leong A *et al*. p16 (INK4a) as a complementary marker of high-grade intraepithelial lesions of the uterine cervix. I. Experience with squamous lesions in 189 consecutive cervical biopsies. *Pathology*. 2005;37(2):112-24.
27. Anghebem-Oliveira MI, Merlin JC. A proteína p16 é um novo marcador para progressão neoplásica no colo uterino? *Rev Bras Anal Clin*. 2010;52(3):181-5
28. Tsoumpou I, Arbyn M, Kyrgiou M, Wentzensen N, Kolioupolos G, Martin-Hirsch P *et al*. p16<sup>INK4A</sup> immunostaining in cytological and histological specimens from the uterine cervix; a systematic review and meta-analysis. *Cancer Treat Rev*. 2009;35:210-20.
29. Volgareva G, Zavalishina L, Andreeva Y, Frank G, Krutikova E, Golovina D *et al*. Protein p16 as a marker of dysplastic and neoplastic alterations in cervical epithelial cells. *BMC Cancer*. 2004;4:58.
30. Sotlar K, Stubner A, Diemer D, Menton S, Menton M, Dietz K *et al*. Detection of high-risk human papillomavirus E6 and E7 oncogene transcripts in cervical scrapes by nested RT-polymerase chain reaction. *J Med Virol* 2004;74(1):107-16.
31. Cattani P, Zannoni GF, Ricci C, D'Onghia S, Trivellizzi IN, Di Franco A *et al*. Clinical performance of human papillomavirus E6 and E7 mRNA testing for high-grade lesions of the cervix. *J Clin Microbiol*. 2009;47:(12)3895-901.
32. Varnai AD, Bollmann M, Bankfalvi A, Speich N, Schmitt C, Griefingholt H *et al*. Predictive testing of early cervical pre-cancer by detecting human papillomavirus E6/E7 mRNA in cervical cytologies up to high-grade squamous intraepithelial lesions: diagnostic and prognostic implications. *Oncol Rep*. 2008;19(2):457-65.
33. Discacciati MG. Valor preditivo da avaliação do DNA e da expressão dos genes E6/E7 do papilomavírus humano na evolução da neoplasia intraepitelial de grau 2 [tese de doutorado]. Campinas: Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas; 2010.
34. Wright TC Jr, Massad LS, Dunton CJ, Spitzer M, Wilkinson EJ, Solomon D. 2006 consensus guidelines for the management of women with cervical intraepithelial neoplasia or adenocarcinoma *in situ*. *Am J Obstet Gynecol*. 2007;197:346-55.
35. Sorbye SW, Fismen S, Gutteberg TJ, Mortensen ES. HPV mRNA test in women with minor cervical lesions: experience of the University Hospital of North Norway. *J Virol Methods*. 2010;169:219-22.

#### Endereço para correspondência:

Michelle Garcia Discacciati  
 Curso de Biomedicina  
 Universidade Paulista  
 Av. Comendador Enzo Ferrari, 280 – Swift  
 Campinas-SP, CEP 13043-900  
 Brasil

E-mail: michelle.garciadisc@gmail.com

Recebido em 20 de junho de 2011  
 Aceito em 13 de setembro de 2011