

Biologia Molecular na abordagem das alterações citológicas, lesões cervicais e na presença da infecção pelo HPV de alto risco

Ana Carolina Marchesini de Camargo

Mestre e Doutora pela Faculdade Medicina Ribeirão Preto - USP

Vice-diretora da Faculdade de Medicina de Jundiaí (2020-2024)

Professora Adjunta da Disciplina de Ginecologia da Faculdade de Medicina de Jundiaí - SP

O conhecimento que a infecção persistente pelo hrHPV (HPV de alto risco) é fator essencial para o advento do câncer invasivo do colo uterino mudou completamente a perspectiva dos métodos de prevenção primária e secundária desta doença. Hoje além da citologia oncótica que nos permite encontrar o efeito citopático do vírus, marcadores moleculares da presença do vírus ou de suas proteínas expressas durante o processo de carcinogênese nos permitem fazer seleções ainda mais acuradas das mulheres em risco de evolução para o câncer.

O teste de DNA HPV é o método de biologia molecular de identificação da infecção viral mais estudado e validado. Seja esta detecção feita por método de captura híbrida, por PCR ou especificamente por genotipagem, o teste de DNA HPV tem desempenho inquestionável como exame de rastreamento populacional, na avaliação de risco de persistência ou recorrência da doença após tratamento de lesão de alto grau (*HSIL*) e elucidação de triagem citológica alterada. Mas, apesar de intuitivamente acreditarmos que o desfecho de uma infecção pelo tipo 16 seja mais grave do que pelos outros tipos de alto risco, o teste de DNA HPV não é capaz de estimar o risco de progressão da lesão. Daí a necessidade de exames que avaliem o prognóstico da lesão instalada para evitarmos número excessivo de colposcopias e biópsias. Considerando a elevada prevalência da infecção pelo HPV em mulheres adultas e o uso do teste de DNA HPV como método primário de rastreamento, estima-se que elevado número de mulheres portadoras do hrHPV sem lesão histológica detectável sejam consideradas positivas no processo de triagem. E neste caso, muitas mulheres também seriam encaminhadas para colposcopia.

Baseados em estudos que avaliaram a expressão proteica histológica do efeito viral, surgiram novos marcadores biomoleculares entre os quais destacamos o p16/Ki67 e o E6/E7. O E6 e o E7 são

oncogenes de expressão precoce do HPV que estão intimamente ligados, respectivamente, aos mecanismos de controle de apoptose celular através da proteína p53, e de transcrição do DNA celular através da proteína do retinoblastoma (pRb). Histologicamente observa-se a positividade da expressão destas oncoproteínas nas neoplasias intraepiteliais, sendo que sua expressão acompanha a distribuição das células atípicas ocupando toda a extensão do epitélio nas HSIL e apenas a porção inferior do epitélio nas LSIL¹.

O p16 é um gene supressor tumoral da família INK4, que regula negativamente a via do pRb-E2F mantendo a célula nas fases G1/S do ciclo celular. Assim a inativação da pRb causada pelo E7 leva ao acúmulo de p16, que nas HSIL também está presente em toda a extensão do epitélio podendo marcar o núcleo de maneira difusa ou o núcleo e o citoplasma juntos². O Ki67 é uma proteína nuclear presente nas fases ativas do ciclo celular por isso associada à ação proliferativa, regulada pela ação do gene p53 inativado pelo E6. Nas HSIL a expressão do Ki67 também pode ser vista em toda a extensão do epitélio, marcando o núcleo celular.

Segundo a *American Society for Colposcopy and Cervical Cytology (ASCCP)* e *College of American Pathologists*, a marcação do p16 pode ser usada como um divisor molecular das lesões consideradas HSIL das LSIL³, ou seja, o p16 positivo num achado histológico compatível com atipia moderada a grave comprovaria o diagnóstico histológico de HSIL. Assim a realização da marcação para p16 pode ser utilizada nos casos de:

- Diagnóstico diferencial entre HSIL e lesões que mimetizam HSIL (metaplasia escamosa imatura, atrofia, alterações epiteliais reparativas e cortes tangenciais);
- Discordância na classificação de espécimes entre patologistas cujo diagnóstico diferencial incluem HSIL;
- Quando o aspecto morfológico na H&E favorecem o diagnóstico de NIC2;
- Casos de amostras histológicas interpretadas como NIC1 ou metaplasia precedidas de exames com alto risco de encontrar HSIL, como citologia de alto grau (HSIL, ASC-H, AGC, ou ASCUS/HPV16+).

O emprego do Ki67 associado ao p16 pode melhorar a especificidade do exame. E o E6 e E7 também tem padrão de distribuição histológica semelhante⁴.

A associação da dupla coloração p16/Ki67 pode ser empregada como exame de elucidação pós rastreamento primário positivo com teste DNA HPV. O desempenho deste método em termos de sensibilidade, Valor preditivo positivo (VPP) e Valor preditivo negativo (VPN) foram superiores quando comparados à citologia oncótica⁵. Por isso existe a sugestão de inclusão da marcação p16/Ki67 nos programas de rastreamento cujo exame de triagem é o teste de DNA HPV. Ele estaria indicado nos casos de triagem positiva e discriminariam as mulheres que deveriam ser encaminhadas para a colposcopia ou não; ou seja, só seriam encaminhadas para colposcopia aquelas pacientes com teste de DNA HPV positivo e p16/Ki67 positivo. Numa outra situação onde o teste de DNA HPV distingue a presença dos HPV 16/18, a marcação p16/Ki67 deveria ser empregada apenas nos casos de hrHPV-positivos mas não 16/18. Nos casos HPV 16/18 positivos as pacientes deveriam ser encaminhadas diretamente para a colposcopia⁶.

Nos casos de rastreamento com a citologia oncótica como exame de triagem, existem evidências de que a marcação com E6/E7 possa ajudar a distinção das mulheres com alterações citológicas menores. Assim, mulheres com citologia ASCUS ou LSIL com marcação E6/E7 positiva devem ser encaminhadas para colposcopia devido ao maior risco de presença de lesão NIC2+⁷.

Nenhum destes métodos moleculares se mostrou verdadeiramente discriminativo na avaliação de risco de evolução das HSIL. Mas estudo com casuística pequena encontrou que as LSIL que tenham expressão positiva de p16 e ainda apresentem marcação de E6/E7 positiva e integrada ao DNA nuclear podem ter maior risco de evolução. E desta maneira a marcação de E6/E7 discriminaria casos de mau prognóstico de p16+². Outro estudo com casuística também pequena, mas com *follow up* de 2 anos mostrou que em pacientes com citologia ASCUS ou LSIL a presença de E6/E7 positiva aumentaria em quase 70 vezes o risco de apresentar uma lesão NIC2 em 2 anos. Enquanto que nestas mesmas alterações citológicas a positividade do teste de DNA HPV aumentaria apenas 5 vezes este risco⁸; sinalizando que nas citologias consideradas de baixo grau a marcação E6/E7 tem melhor valor prognóstico que o teste de DNA HPV.

Na prática clínica o objetivo dos testes moleculares é identificar de maneira acurada e específica as mulheres que necessitam colposcopia por se tratarem de pacientes com risco mais elevado para HSIL. No presente momento, existem evidências que apoiam o uso da biologia nos casos de: após

triagem citológica ASCUS/LSIL em pacientes HR-HPV+, ou substituindo o teste DNA-HPV nestas pacientes; após triagem primária com DNA HR-HPV + (exceto HPV 16/18); e na avaliação de risco de progressão em pacientes com LSIL.

Entretanto, há que se considerar o custo destes exames e o real benefício deles para as mulheres. A nossa realidade nacional é diferente da realidade de outros países onde o custo da colposcopia é elevado. É possível fazer um bom rastreamento e aconselhamento com as ferramentas que possuímos no nosso dia a dia, e que são disponíveis na saúde suplementar e no SUS, basta disponibilizá-las a quem de fato precisa.

Referências Bibliográficas:

1. Doorbar J, Egawa N, Griffin H, Kranjec C, Murakami I. Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Rev Med Virol.* 2015 Mar;25 Suppl 1(Suppl Suppl 1):2-23. doi: 10.1002/rmv.1822. PMID: 25752814; PMCID: PMC5024016.
2. Gatta LB, Berenzi A, Balzarini P, Dessy E, Angiero F, Alessandri G, Gambino A, Grigolato P, Benetti A. Diagnostic implications of L1, p16, and Ki-67 proteins and HPV DNA in low-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Gynecol Pathol.* 2011 Nov;30(6):597-604. doi: 10.1097/PGP.0b013e31821ac4fd. PMID: 21979598.
3. Darragh TM, Colgan TJ, Cox JT, Heller DS, Henry MR, Luff RD, McCalmont T, Nayar R, Palefsky JM, Stoler MH, Wilkinson EJ, Zaino RJ, Wilbur DC; Members of LAST Project Work Groups. The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization Project for HPV-Associated Lesions: background and consensus recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. *J Low Genit Tract Dis.* 2012 Jul;16(3):205-42. doi: 10.1097/LGT.0b013e31825c31dd. Erratum in: *J Low Genit Tract Dis.* 2013 Jul;17(3):368. PMID: 22820980.
4. Evans MF, Peng Z, Clark KM, Adamson CS, Ma XJ, Wu X, Wang H, Luo Y, Cooper K. HPV E6/E7 RNA in situ hybridization signal patterns as biomarkers of three-tier cervical intraepithelial neoplasia grade. *PLoS One.* 2014 Mar 13;9(3):e91142. doi: 10.1371/journal.pone.0091142. PMID: 24625757; PMCID: PMC3953338.

5. Wright TC Jr, Behrens CM, Ranger-Moore J, Rehm S, Sharma A, Stoler MH, Ridder R. Triaging HPV-positive women with p16/Ki-67 dual-stained cytology: Results from a sub-study nested into the ATHENA trial. *Gynecol Oncol.* 2017 Jan;144(1):51-56. doi: 10.1016/j.ygyno.2016.10.031. Epub 2016 Oct 27. PMID: 28094038.
6. Cuschieri K, Ronco G, Lorincz A, Smith L, Ogilvie G, Mirabello L, Carozzi F, Cubie H, Wentzensen N, Snijders P, Arbyn M, Monsonego J, Franceschi S. Eurogin roadmap 2017: Triage strategies for the management of HPV-positive women in cervical screening programs. *Int J Cancer.* 2018 Aug 15;143(4):735-745. doi: 10.1002/ijc.31261. Epub 2018 Feb 8. PMID: 29341110.
7. Yang L, Zhu Y, Bai Y, Zhang X, Ren C. The clinical application of HPV E6/E7 mRNA testing in triaging women with atypical squamous cells of undetermined significance or low-grade squamous intra-epithelial lesion Pap smear: A meta-analysis. *J Cancer Res Ther.* 2017;13(4):613-620. doi: 10.4103/jcrt.JCRT_56_17. PMID: 28901302.
8. Molden T, Nygard JF, Kraus I, et al. Predicting CIN2+ when detecting HPV mRNA and DNA by PreTect HPVproofer and consensus PCR: A 2-year follow-up of women with ASCUS or LSIL Pap smear. *Int J Cancer* 2005;114:973-6.

Ana Carolina Marchesini de Camargo

Mestre em Ginecologia pela Faculdade Medicina Ribeirão Preto - USP
Doutora em Ginecologia pela Faculdade Medicina Ribeirão Preto - USP
Professora adjunta da Disciplina de Ginecologia da Faculdade de Medicina de Jundiaí - SP
Vice-diretora da Faculdade de Medicina de Jundiaí – SP (2020-2024)
Título de Especialista em Ginecologia e Obstetrícia
Título de Qualificação em Colposcopia

É permitida reprodução deste texto e dos dados nele contidos, desde que citada a fonte. Lei de Direitos Autorais nº 9.610, de 19.02.98, do Governo Federal Brasileiro.