



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

**AVALIAÇÃO IMUNOQUIMILUMINESCENTE DO PERFIL
ANTIGÊNICO COM ANTI-Ki-67 E ANTI-TOP II A EM
LESÕES INTRAEPITELIAIS CERVICAIS**

LEDSON GLÁUCIO OLINTO BRAGA

RECIFE, 2016

LEDSON GLÁUCIO OLINTO BRAGA

**AVALIAÇÃO IMUNOQUIMILUMINESCENTE DO PERFIL
ANTIGÊNICO COM ANTI-Ki-67 E ANTI-TOP IIa EM LESÕES
INTRAEPITELIAIS CERVICAIS**

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

Linha de pesquisa: Aspectos Biotecnológicos e Microbiológicos Aplicados a Patologia

Orientador: Prof. Dr. Mário Ribeiro de Melo-Júnior

Co-orientadora: Adrya Lúcia Peres Bezerra de Medeiros

RECIFE, 2016



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

Centro de Ciências da Saúde - UFPE

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

Prédio da Pós-graduação do Centro de Ciências da Saúde (CCS) - térreo

Fone/Fax: (81) 2126.8529

<http://www.ppgpatologiaufpe.com>

**DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM
PATOLOGIA**

AUTOR: Ledson Gláucio Olinto Braga

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Patologia

**NOME DA DISSERTAÇÃO: “AVALIAÇÃO IMUNOQUIMILUMINESCENTE DO
PERFIL ANTIGÊNICO COM ANTI-Ki-67 E ANTI-TOP IIa EM LESÕES
INTRAEPITELIAIS CERVICAIS.”**

ORIENTADOR: Prof. Dr. Mário Ribeiro de Melo Júnior

DATA DA APROVAÇÃO: 15 de setembro de 2016

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Ivone Antônia de Souza

Profa. Dra. Paloma Lys de Medeiros

Profa. Dra. Carina Scanoni Maia

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

R E I T O R

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE- REITOR

Prof^a. 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

Prof^a. Adriana Maria da Silva Telles

COORDENADOR DO MESTRADO EM PATOLOGIA

Prof^a. Manuela Figueiroa Lyra de Freitas

VICE-COORDENADOR DO MESTRADO EM PATOLOGIA

Prof. Lucas André Cavalcanti Brandão

SECRETÁRIA DO MESTRADO EM PATOLOGIA

Margarete Valdevino da Silva

RECIFE

2016

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

AGRADECIMENTOS

A Deus, criador e dono de tudo, pelo dom da vida e por me permitir conquistar mais um sonho. Quando as lembranças da minha história vêm, percebo Sua mão em cada momento cuidando de mim nos mínimos detalhes e vejo que com minhas próprias forças não conseguiria chegar até aqui, pois sou falho e imperfeito. As experiências vividas até aqui proporcionaram amadurecimento da minha fé Naquele que vive eternamente. Não sei como será o meu futuro mas sei que Deus já está lá. Não há palavras para expressar minha gratidão, toda honra e glória a Ele.

A toda minha família que esteve ao meu lado, travando batalhas dia a dia, acreditando no meu potencial. A minha amada mãe Socorro, em especial, guerreira, que luta com todas as forças por mim desde o meu primeiro fôlego de vida, pelas noites mal dormidas, vou honrá-la todos os dias da minha existência. A minha avó Francisca, a minha tia Maria do Céu, ao meu irmão Elykláucio, a minha prima-irmã Janekelly e todos os tios e primos que de igual forma estão conquistando essa vitória. A todos os amigos da família que estiveram conosco nos ajudando e orando pela minha vida. As dificuldades enfrentadas não puderam abalar nossa fé nem nossa vontade de vencer.

Aos meus tão estimados amigos, presentes de Deus para mim, que não apenas partilham comigo momentos de alegria como este, mas que me dão força e coragem nos momentos difíceis. Aqueles que não estão presentes dia a dia, mas que de longe estão sempre torcendo por mim. Aos amigos mais chegados, os melhores que alguém poderia ter, são os irmãos que pude escolher.

Aos amigos que conquistei em recife, em especial, aos meus irmãos Lucas Emanuel e Wictor Oliveira, como também a Jaine Mariá, Amanda Domingos, Sidney Vasconcelos, Jaire Marinho e Ramon Tenório. A minha turma de mestrado, por todo o apoio e parceria, conviver com vocês esses dois anos foi uma experiência incrível. Não é possível citar o nome de todos mas estão em meu coração para o resto da vida.

Aos colegas dos departamentos de Bioquímica e Patologia do LIKA, Catharine Crisóstomo, Luiza Lima e Gabriela Ayres, que colaboraram de forma excepcional com a execução da pesquisa. Ao professor Carlos Eduardo, pela colaboração com a preparação das lâminas citológicas. Ao amigo Eweton Pereira, pelo auxílio com os dados. Aos amigos do CETENE, por todo apoio e aprendizado adquirido durante o tempo que trabalhamos juntos.

Ao professor e amigo Marcos Machado por me acompanhar desde a graduação incentivando e contribuindo diretamente com essa conquista.

Ao meu estimado orientador, Professor Mario Ribeiro, a quem tenho uma imensa admiração e respeito, por ter me acompanhado ao longo todo processo de elaboração deste trabalho, por toda atenção prestada, conselhos e correções necessárias, sendo um exemplo notável que é referência para mim. A minha querida co-orientadora, Professora Adrya Peres, por toda colaboração e disponibilidade mesmo tendo muitos compromissos. Tenho orgulho de ter trabalhado com pessoas tão competentes e humanas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Patologia, a coordenadora Manuela Figueroa, a secretária Margarete Valdevino pela dedicação e apoio durante todo esse período. A todos os professores que colaboraram com seus conhecimentos para minha formação.

Ao Centro de Referência em Saúde da Mulher Maria de Lourdes Lopes Lemos por aceitar a realização das coletas. A todas as mulheres que participaram do trabalho.

A banca examinadora, por aceitar o convite contribuindo de forma importante para a conclusão do trabalho

A FACEPE pelo apoio financeiro, sem o qual, não seria possível a realização deste trabalho.

*Muito Obrigado,
Ledson Braga.*

*Confia no Senhor de todo o teu
coração e não te estribes no teu
próprio entendimento.*

Pv. 3:5

RESUMO

O câncer do colo do útero é um problema de saúde pública mundial que afeta principalmente países em desenvolvimento como o Brasil. O Papiloma Vírus Humano é o principal causador desse tipo de câncer e está presente em 99% dos casos. O principal método de rastreio, hoje, é o exame de Papanicolaou, porém o mesmo apresenta algumas limitações como resultados falso-negativos e insatisfatórios e nos últimos anos vem sendo desenvolvidas metodologias que objetivam minimizar essas limitações como o uso de marcadores de proliferação celular. Foram utilizados os marcadores Ki 67 e TOP IIa que quando estão com níveis de expressão muito elevados indicam desregulação. A mensuração desses marcadores pode ser feita por alguns métodos como a Imunoquimiluminescência. Neste trabalho objetivou-se estabelecer protocolo para imunocitoquímica por quimiluminescência em amostras cervicais, detectar os marcadores Ki 67 e TOP IIa e relacionar com os resultados citológicos convencionais. 31 mulheres participaram do estudo formando cinco grupos: Negativo para Lesão Intraepitelial (NILM), Lesão de significado Indeterminado (ASC US), Lesão de Significado Indeterminado Não excluindo lesão de alto grau (ASC H), Lesão de Baixo Grau (LSIL) e Lesão de Alto Grau (HSIL). A análise dos dados mostrou que na expressão de Ki 67 os grupos LSIL – NILM (0.0208905) e LSIL – ASC (0.0208905) e na expressão TOP IIa os grupos NILM – LSIL (0.0126204) foram significativas ao nível de 5% de significância. Os marcadores Ki 67 e TOP IIa são eficientes na detecção das lesões cervicais, porém são necessários estudos aprofundados, com uma maior amostragem para validar a sensibilidade dos testes imunoquimiluminescentes.

Palavras-chave: Anticorpos. HPV. Marcadores. Câncer Cervical.

ABSTRAT

Cervical cancer is a worldwide public health problem that affects mainly developing countries like Brazil. The Human Papilloma Virus is the main cause of this type of cancer and is present in 99% of the cases. The main method of screening today is the Pap test, but it has some limitations as false-negative and unsatisfactory results, and in recent years methodologies have been developed that aim to minimize these limitations, such as the use of markers of cell proliferation. Ki 67 and TOP Ila markers were used, which, when they have very high levels of expression, indicate deregulation. Measurement of these markers can be done by some methods such as Immunochemiluminescence. In this work we aimed to establish protocol for immunocytochemistry by chemiluminescence in cervical samples, to detect Ki 67 and TOP Ila markers and to relate to the conventional cytological results. 31 women participated in the study in five groups: Negative for Intraepithelial Injury (NILM), Injury of Undetermined Significance (ASC US), Injury of Undetermined Significance Not excluding high grade lesion (ASC H), Low Grade Lesion (LSIL) Of High Grade (HSIL). Data analysis showed that the LSIL - NILM (0.0208905) and LSIL - ASC (0.0208905) and TOP Ila NILM - LSIL (0.0126204) groups were significant at the 5% significance level in Ki 67 expression. The Ki 67 and TOP Ila markers are efficient in the detection of cervical lesions, however, in-depth studies are required, with greater sampling to validate the sensitivity of immunochemiluminescent assays.

Keywords: Antibodies. HPV. Markers. Cervical Cancer.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANTI-KI 67 - Anticorpo Ki 67

ANTI-TOP IIA – Anticorpo Topoisomerase IIA

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

ASC-US – Atipia Escamosa de Significado Indeterminado

CCU – Câncer do Colo do Útero

EA – Éster de Acridina

HPV – Papiloma Vírus Humano

HSIL – Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau

INCA – Instituto Nacional do Câncer

LIKA – Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami

LSIL – Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau

NIC – National Cancer Institute

NIC I – Neoplasia Cervical Grau I

NIC II – Neoplasia Cervical Grau II

NIC III – Neoplasia Cervical Grau III

NILM – Negativo para Lesão Intraepitelial Maligna

OMS – Organização Mundial da Saúde

PSA – Antígeno Prostático Específico

SUS – Sistema Único de Saúde

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TOP IIA – Topoisomerase IIA

UFPE – Universidade Federal de Pernambuco

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Estimativa de casos novos de câncer em mulheres no Brasil em 2016.....	17
FIGURA 2 – Infecção das células cervicais pelo HPV.....	18
FIGURA 3 – Infecção pelo HPV, surgimento das lesões até o câncer do colo do útero.....	19
FIGURA 4 – Procedimento da coleta do material citológico.....	20
FIGURA 5 – Expressão de biomarcadores em lesões intraepiteliais cervicais.....	23
FIGURA 6 – Células Positivas para KI 67 através de Imunocitoquímica.....	24
FIGURA 7 – Células Positivas para TOP II A através de Imunocitoquímica.....	26

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO	15
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
2.1 CÂNCER	17
2.2 CÂNCER DO COLO DO ÚTERO	17
2.2.1 Etiologia do Câncer do Colo do Útero	18
2.2.2 Infecção pelo HPV	19
2.2.3 Classificação das lesões Intraepiteliais Cervicais	20
2.2.4 Exame de Papanicolaou	21
2.3 MÉTODOS DE DETECÇÃO DE LESÕES CERVICAIS	22
2.3.1 Colposcopia	22
2.3.2 Imunoistoquímica	23
2.3.3 Citopatologia	23
2.4 BIOMARCADORES	23
2.4.1 Anti- KI-67	25
2.4.2 Anti-DNA topoisomerase IIA	26
2.5 QUIMILUMINESCENCIA	27
3. JUSTIFICATIVA	29
4. OBJETIVOS	29
4.1 Objetivo Geral	29
4.2 Objetivos Específicos	29
5. METODOLOGIA	30
5.1 Tipo de estudo	30
5.2 Amostra e local de estudo	30
5.3 Critérios de Inclusão e Exclusão	30
5.4 Coleta do material cervical	31
5.5 Conjugação do Anticorpo ao Ea	31

5.6 Estudo Imunocitoquimiluminescente	31
5.7 Análise dos dados	32
6. ARTIGO ORIGINAL	33
7. CONCLUSÕES	45
REFERÊNCIAS	46
APÊNDICE A	52
ANEXO A	53

1. APRESENTAÇÃO

Câncer é um termo referente a um grupo que possui mais de uma centena de doenças que têm como semelhante o desenvolvimento rápido, desordenado, a fuga do processo de apoptose e o perfil maligno de células que se disseminam por várias regiões do corpo de forma bastante agressiva (INCA, 2016).

O câncer do colo do útero (CCU) é um problema de saúde pública mundial que afeta principalmente países em desenvolvimento como o Brasil. Segundo a Organização Mundial da Saúde, a cada ano há a incidência de 500 mil casos levando 230 mil mulheres a óbito em decorrência do Câncer do Colo do Útero no mundo (INCA, 2016).

O Papilomavírus Humano (HPV) é o principal agente causador desse tipo de câncer e está presente em 99% dos casos. Os subtipos mais comuns para essa neoplasia são os subtipos 16 e 18. Outros fatores predisponentes estão associados com o aparecimento dessa doença como uso de contraceptivos orais, multiplicidade de parceiros sexuais, baixa condições socioeconômicas, higiene íntima inadequada e tabagismo (PARKIN et al., 2005; TROTTIER; FRANCO, 2006).

O exame de Papanicolaou atualmente é indicado como sendo o principal método de rastreamento para o câncer cervical, principalmente em mulheres que já possuam vida sexual ativa ou que estejam na faixa etária de 25 a 64 anos de idade, faixa etária onde se diagnostica as lesões de alto grau (INCA, 2016). Apesar do seu uso, existem algumas limitações que diminuem a sensibilidade e especificidade do referido teste, como: falso-negativo devido a erros de coleta e a falta de experiência profissional dentre outros (TAVARES, 2007).

Nos últimos anos, vem sendo desenvolvidos testes que reduzem as limitações dos exames usuais, melhorando o rastreio e prognóstico da doença, dentre eles, o uso de marcadores de proliferação celular. O uso de alguns marcadores como Ki 67, p16 INK4a e ProEx C (BD), tem sido reportado para facilitar a detecção de células anormais através de amostras citológicas convencionais baseado em ensaio imunocitoquímico (BROWN *et al.*, 2016).

O Antígeno nuclear Ki-67 encontra-se em todas as fases do ciclo celular, com exceção da fase G0. Sua expressão varia de acordo com a fase do ciclo, sendo alcançado o pico nas

fases G2 e M. Sua função ainda não está estabelecida, porém alguns estudos apontam que o antígeno está envolvido na regulação da proliferação celular (FITZGIBBONS, 2000).

A Topoisomerase IIa (Top IIa) é uma enzima do núcleo participante de etapas do metabolismo do DNA (ENGELSTAEDTER, 2012). Quando essa proteína está super-expressa denota-se uma indução aberrante (BROWN *et al.*, 2016).

A atividade dessas proteínas pode ser medida através de técnicas como a quimiluminescência que possui alta sensibilidade e seletividade, sendo assim, uma ferramenta bastante atraente (COELHO, 2002).

Diante do exposto, no presente trabalho avaliou-se o perfil dos marcadores Ki-67 e TOP IIa utilizando o método imunoquimilunesciente visando um rastreamento precoce das lesões cervicais utilizando amostras em meio líquido.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 CÂNCER

O Câncer faz referência a um grupo de doenças que possui o crescimento celular descontrolado e rápido que tende a se distribuir entre órgãos adjacentes, o que caracteriza a metástase (OMS, 2016).

Nas últimas décadas, o câncer vem alcançado uma proporção maior, despontando como um grave problema de saúde pública no mundo. OMS estima que, em 2030, podem ocorrer 27 milhões de casos incidentes de câncer, 75 milhões de pessoas vivas com câncer e 17 milhões de mortes por câncer. No Brasil, as estimativas para os anos de 2016 e 2017 mostram a ocorrência de cerca de 596.000 casos novos, sendo que, 295.200 para o sexo masculino e 300.800 para o sexo feminino (INCA, 2016).

2.2 CÂNCER DO COLO DO ÚTERO (CCU)

O câncer cervical tornou-se um problema de saúde pública nos países em desenvolvimento e as suas altas taxas de incidência e mortalidade acometem principalmente mulheres de baixo nível social e econômico, além de estarem na fase reprodutiva (BRENNNA; HARDY; ZEFERINO, 2001). É o segundo tipo de neoplasia mais frequente entre as mulheres (FIGURA 1), com aproximadamente 500 mil casos novos por ano no mundo, sendo responsável pelo óbito de aproximadamente 230 mil mulheres por ano. O número de novos casos estimados para o Brasil no ano de 2016 é de 16.340, com um risco de 16 casos para cada 100 mil mulheres (BRASIL, 2016).

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 1: Estimativa de casos novos de câncer em mulheres no Brasil em 2016.

Fonte: Estimativa, INCA.

2.2.1 Etiologia do Câncer do Colo do Útero

O Papilomavírus humano (HPV) está presente em 99,7% dos casos de câncer de colo de útero (BURD, 2003). Dos mais de 200 tipos de HPV existentes, identificados através de análise de DNA, aproximadamente 35 possuem considerável tropismo pelo trato genital, e uma porção expressiva destes (20 tipos) está vinculada ao potencial oncogênico, devido ao aparecimento de condilomas acuminados e lesões intraepiteliais escamosas e posteriormente, câncer (BAGARELLI; OLIANI, 2004; JUNG; CHUN; SUL, 2004; HO; YANG; CHIEN, 2005; PAPAConstantinou, *et al.*, 2005).

Em sua maioria, as lesões estão relacionadas com quatro tipos de HPVs: 6 e o11 que são causadores de 90% das verrugas na região anal e genital, e os tipos 16 e 18 são responsáveis por 70% das lesões de alto grau, como também pelo câncer invasivo (GAMEIRO, 2016).

Distintamente dos outros cânceres humanos já conhecidos, o câncer cervical, é, sem dúvida, uma doença de caráter evitável, pois tem como característica peculiar uma evolução lenta, desde o desenvolvimento de lesões até o aparecimento do câncer propriamente dito (DERCHAIN, 2005).

2.2.2 Infecção pelo HPV

O HPV possui um ciclo de vida que depende da diferenciação celular. A infecção inicial por esse vírus ocorre nas células das camadas mais profundas do epitélio estratificado (FIGURA 2). As células basais proliferam-se e, em seguida, passam por um processo de diferenciação levando a uma maturação epitelial. Células filhas também continuam a se dividir na camada basal servindo de reservatório de DNA viral para novas divisões celulares. Como a produção do vírus se restringe às células suprabasais, as células da camada basal não são destruídas com a produção de novos vírus, prosseguindo com a proliferação (SOUTO, 2005).

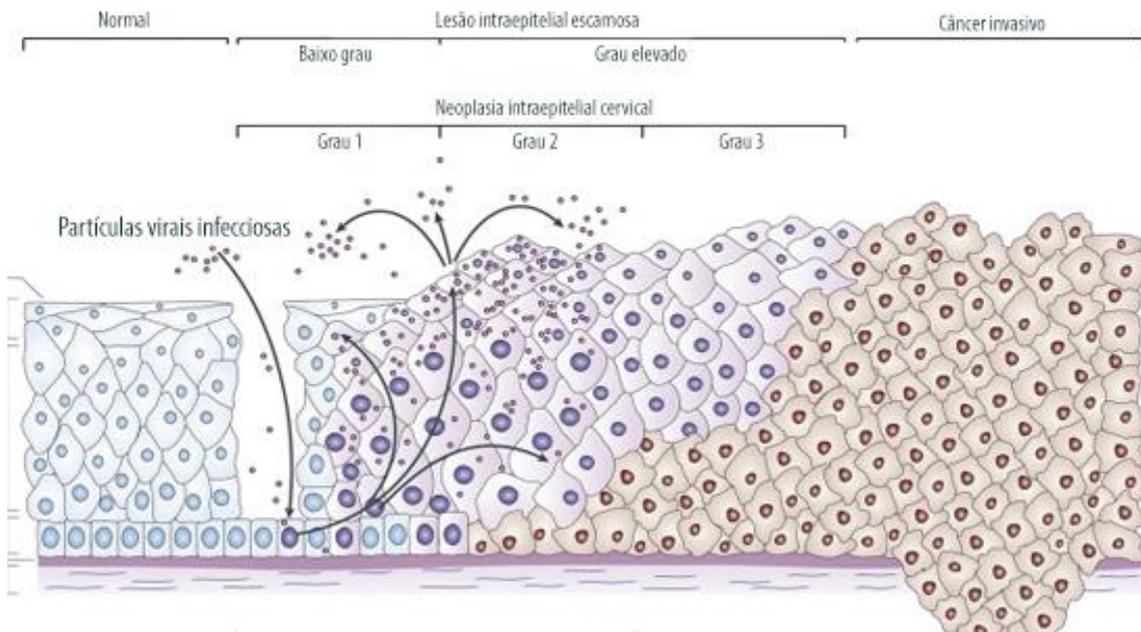


Figura 2. Infecção das células cervicais pelo HPV.

Fonte: <http://www.drrobertoelias.com.br/tratamentos/hpv-e-cancer-cabeca-pescoco>

(ADAPTADO)

Sabe-se que a infecção pelo HPV não é suficiente para causar o câncer cervical, e sim, a persistência da infecção do HPV oncogênico aliado a alguns cofatores que potencializam o desenvolvimento das lesões. Alguns exemplos de fatores que contribuem para a evolução da neoplasia cervical são: uso de contraceptivos orais, número de gestações, tabagismo, imunossupressão, idade da sexarca, deficiências nutricionais e número de parceiros sexuais (BONARDI, 2010).

2.2.3 Classificação das lesões Intraepiteliais Cervicais

O CCU desenvolve-se a partir de lesões intraepiteliais escamosas (*SIL: squamous intraepithelial lesions*) e se classificam em lesões de alto ou baixo grau, onde essas são estabelecidas através do nível de protrusão da diferenciação do epitélio da cérvix uterina (SCHOELL; JANICEK; MIRHASHEMI, 1999). Essas lesões alteram a morfologia característica do epitélio cervical, quando são oriundas da infecção pelo H., podendo dessa forma, serem facilmente rastreadas, quando é realizado o exame citológico dos raspados cérvico vaginais, através da técnica de Papanicolaou (JANICEK; AVERETTE, 2001).

O NIC (*National Cancer Institute – Bethesda 2001*), propôs as seguintes terminações para identificação de alterações nas células epiteliais escamosas: Atipia de significado indeterminado (ASC-US), Atipia de Significado indeterminado não excluindo lesão de alto grau (ASC-H), Lesão intraepitelial de baixo grau (LSIL), Lesão intraepitelial de alto grau (HSIL) e Carcinoma escamoso. Apesar da nomenclatura do Sistema Bethesda, alguns profissionais ainda utilizam a classificação antiga: Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) grau I, II e III (APGAR; ZOSCHNICK, 2003). A figura 3 mostra a correlação das nomenclaturas com o grau da Lesão Intraepitelial Cervical que representa uma longa fase da doença pré-invasiva.

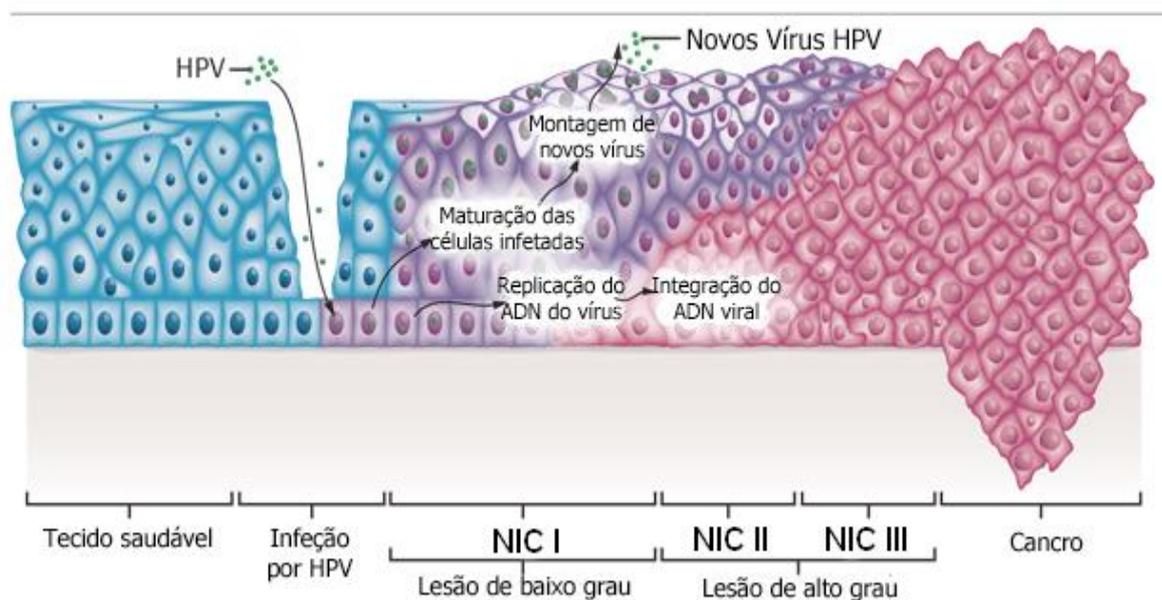


Figura 3: Infecção pelo HPV, surgimento das lesões até o câncer do colo do útero.

Fonte: <http://www. Roche.pt/resources/files/portugal2015/tipos/infecaohpv1.png>

2.2.4 Exame de Papanicolaou

O exame foi criado por George Nicolas Papanicolaou (1941), com a finalidade de identificar, pelo microscópio, células anormais, pré-malignas ou malignas. Esse método também pode ser chamado de exame citopatológico ou citológico, citologia oncótica e ainda citologia esfoliativa (BRASIL, 2016).

O Papanicolaou, hoje, é tido como a principal ferramenta de rastreio para o câncer cervical, principalmente em mulheres que já possuam atividade sexual ou que se encontram entre 25 a 64 anos de idade, faixa etária é onde se diagnostica as lesões de alto grau, que podem ser tratadas de forma precoce, impedindo o desenvolvimento do câncer (INCA, 2016).

A coleta do material citológico é feita na rede pública de saúde ou em laboratórios privados. O Sistema Único de Saúde (SUS) dispõe do Programa de Controle do Câncer do Colo do Útero, que tem o objetivo de minimizar os níveis de incidência e mortalidade do câncer cervical (DIOGENES et al., 2001; BRITO et al., 2007; INCA, 2016). É um método indolor, feito pela coleta do material citológico do colo do útero, com o espêculo vaginal, sendo coletadas células da endocérvice, usando-se a escova endocervical e da ectocérvice, usando a espátula de Ayre, conforme mostra a figura 4 (BRASIL, 2002; PARKIN et al., 2005; TROTTIER; FRANCO, 2006;).

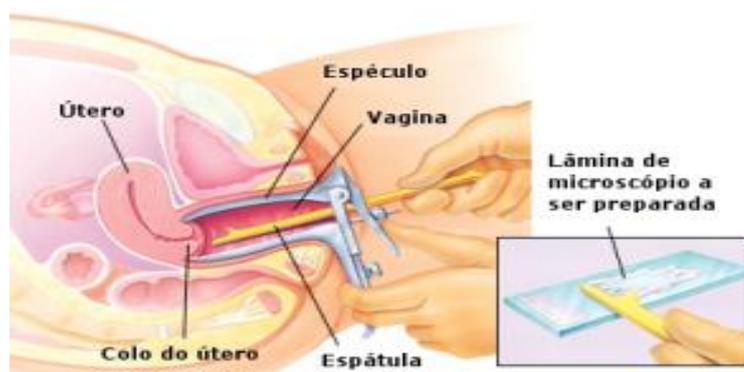


Figura 4: Procedimento da coleta do material citológico.

Fonte: <http://invida.med.br/diagnostico/exames-vaginais>

Depois da coleta a amostra é transferida para uma lâmina, em seguida essa lâmina passa pelo processo de coloração e no microscópio será analisada para identificação de possíveis alterações nas células cervicais. Alguns cuidados são importantes na coleta como:

iniciais do nome da paciente, o número do registro da mulher no local da coleta, identificação correta da lâmina com o código do local que está sendo realizada, como também deve ser lembrado de fixar a amostra logo depois da coleta para evitar o dessecamento, sendo o polietilenoglicol, o fixador mais recomendado (BRASIL, 2016).

A recomendação do Ministério da Saúde é que o exame de Papanicolaou seja realizado a cada três anos, depois de dois anos consecutivos com resultados negativos (NILM) para lesão intraepitelial maligna. Há uma necessidade quanto a orientação às mulheres em relação ao exame, tais como: não fazer o uso de duchas, não ter relações sexuais, não usar medicamentos durante as 48 horas que antecipam o exame, para, assim, garantir uma maior eficácia e confiabilidade nos resultados. Esse exame não deve ser realizado durante o período menstrual, pois interfere diretamente na visualização do material celular, tornando o esfregaço insatisfatório para o diagnóstico citopatológico (BRITO et al., 2007; FERREIRA, 2009; INCA, 2016; CASARIN; PICCOLI, 2011;).

A citologia pode proporcionar uma boa sensibilidade para a detecção de lesão intraepitelial escamosa de alto grau (HSIL) e alguns casos de lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL). No entanto, resultados falso-negativos dos testes de Papanicolaou têm sido relatados em até 30% dos casos. Como exemplo, pacientes que já possuem alguma lesão cervical apresentam a citologia negativa, podendo ser causada pela falta de representatividade celular (SHI *et. al.*, 2007).

2.3 MÉTODOS DE DETECÇÃO DE LESÕES CERVICAIS

2.3.1 Colposcopia

A colposcopia é um procedimento visual da cérvix, da vagina e dos lábios vaginais externos que permite localizar e identificar a lesão que deu origem as células alteradas, como também possibilita a determinação da sua extensão e prediz o grau histológico da alteração. Geralmente é feita em mulheres com alguma lesão citológica e é disponível na rede pública, sendo também uma ferramenta usada na detecção de lesões precursoras do câncer cervical (KULASINGAM *et al.*, 2006).

2.3.2 Imunohistoquímica

O processo de identificação de antígenos nos tecidos com anticorpos, através de colorações é definido como imunohistoquímica. O valor prático dessa técnica reside na identificação de várias estruturas celulares a nível funcional e morfológico sem provocar nenhum tipo de dano a ligação estabelecida entre o anticorpo e o antígeno. O desenvolvimento de anticorpos monoclonais possibilitou uma gama de reagentes específicos, que podem ser usados na avaliação antigênica celular ou tissular, e o surgimento da recuperação antigênica se caracterizam como dois acontecimentos importantes na história da imunohistoquímica (SALLES *et. al.*, 2009).

2.3.3 citopatologia

A histopatologia é baseada no critério morfológico das células, sendo considerado o padrão ouro no diagnóstico do CCU. Na avaliação da lâmina, quando são encontradas células da Junção Escamo-Colunar, dentre outras, indicam uma ótima execução da coleta. Para a avaliação das células, nas áreas teciduais anormais, retira-se uma pequena amostra, denominada biópsia, completando assim a tríade diagnóstica: citologia, colposcopia e histopatologia (STOFLER, 2011).

2.4 BIOMARCADORES

Um biomarcador é uma molécula biológica usada como indicador de processos biológicos normais ou aberrantes, como também auxilia na avaliação da resposta farmacológica numa intervenção terapêutica. Podem ser de DNA, ácido Ribonucléico (RNA), ou um marcador de proteína medido diretamente nos tecidos, soro ou outros fluidos corporais

(LARI *et. al.*, 2011). Nos processos neoplásicos, os biomarcadores são usados no diagnóstico da doença, no estadiamento, no monitoramento da resposta ao tratamento e no prognóstico do paciente (KELLY *et. al.*, 2006; LARI *et. al.*, 2011).

Os recentes avanços tecnológicos genômicos e proteômicos em conjunto com os avanços das ferramentas de bioinformática mostram uma variedade de novos biomarcadores de câncer que são sensíveis e específicos, com impacto no diagnóstico e um melhor acompanhamento do paciente. Os biomarcadores possibilitam o monitoramento de acontecimentos moleculares essenciais em amostras citológicas ou histológicas e são capazes de aprimorar a detecção de lesões que têm risco de progressão em ambas as configurações de triagem e de rastreamento primário (GUPTA *et. al.*, 2010).

O uso de alguns biomarcadores como p16 INK4a, Ki 67 e ProEx C (BD), tem sido mencionado na literatura para facilitar a detecção de células anormais através de amostras citológicas convencionais baseado em ensaio imunocitoquímico (BROWN *et al.*, 2016). A figura 5 mostra a expressão de biomarcadores em lesões intraepiteliais cervicais através da imunohistoquímica.

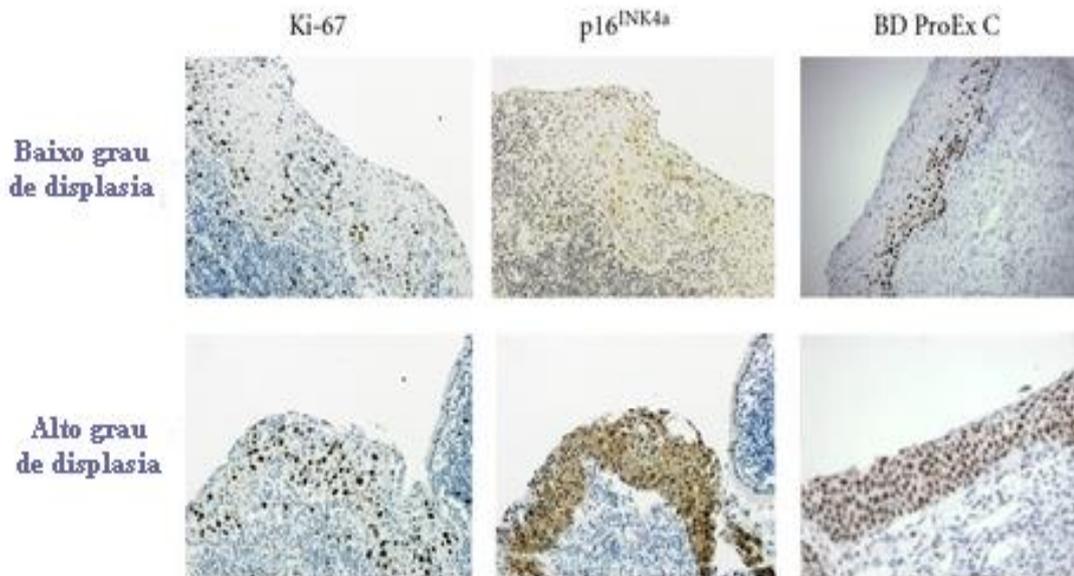


Figura 5 - Expressão de Biomarcadores em Lesões Intraepiteliais Cervicais (BROWN, 2012)

(ADAPTADO)

2.4.1 Anti-KI-67

O anti-Ki-67 é um anticorpo monoclonal, que tem o poder de identificar o antígeno nuclear Ki-67, uma proteína não-histona, com peso molecular de 345 a 349 Kd, presente na maioria das células que se encontram em proliferação (FIGURA 6). Esse antígeno está presente praticamente em todo o ciclo celular, do início de G1 a G2 e M, não sendo expresso em G0, e por possuir tempo de meia vida curto, sendo degradado em até uma hora após a mitose, pode ser usado para medir a fração de crescimento celular (FITZGIBBONS *et. al.*, 2000). Partes recombinantes do antígeno de Ki-67 foram utilizadas como imunógenos, onde se podem produzir novos anticorpos monoclonais, os quais se denominam: MIB-I, II e III. Vale salientar que MIB-I e MIB-III detectam o mesmo epítipo que o anti-Ki-67 (IQBAL, 2002; HAZAN, 2002).

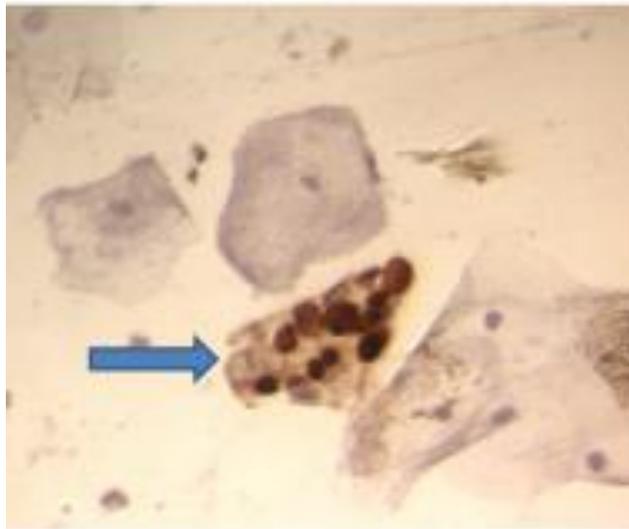


Figura 6 – Células Intraepiteliais Cervicais Positivas para KI 67 através de Imunocitoquímica (PERES, 2016)

Estudos como o de Torp (2002), que trabalharam com neoplasias astrocitárias, e o de Motta e colaboradores (2009), que usaram o anti-Ki-67 para o diagnóstico e prognóstico e carcinoma da cavidade oral e língua, associam o alto índice de Ki – 67 com um pior prognóstico da doença. Vários outros trabalhos apontam o Ki-67 como ferramenta clínica do padrão de comportamento das neoplasias malignas, pois ocorre o aumento da síntese do DNA da neoplasia resultando no aumento no número de células marcadas com este antígeno (TORP, 2002).

O anti-Ki-67, detectado através de biópsias, objetiva principalmente a determinação do percentual de células tumorais que se dividem originando mais células cancerosas. Esses dados são importantes no momento de escolher qual o melhor tratamento para o paciente (SOUZA, 2009).

O anti-Ki-67 é tido como marcador de proliferação celular de maior confiabilidade, utilizado em muitos casos como ferramenta no fator prognóstico em tumores cuja evolução é de difícil previsão quando baseada somente em critérios histológicos (SCHOLZEN; GERDES, 2000).

2.4.2 Anti-DNA Topoisomerase II A

O Anti-DNA Topoisomerase II A detecta a DNA topoisomerase II Alfa (TOP II A) que é uma enzima responsável pela separação das cadeias de DNA durante a replicação. Essa enzima tem sua elevação no final da fase G1 e anáfase, vindo a ter uma queda drástica no início de G1 por ação de alguns fatores que regulam sua atividade, como a via de degradação ubiquitina-proteossoma. Visto a importância na regulação da replicação, se a TOP II A está com altos índices de expressão, considera-se uma indução aberrante (FIGURA 7) (BROWN *et al.*, 2016), com exceção de alguns tecidos com alto índice mitótico como timo, medula óssea e testículos. Sua expressão aumentada está associada significativamente com a progressão de NIC-I para NIC-III (BECCATI *et al.*, 2008).

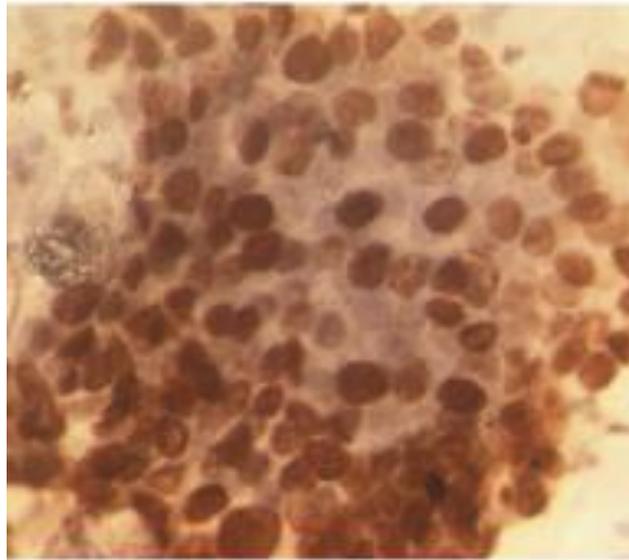


Figura 7- Células Intraepiteliais Cervicais Positivas para TOP II A através de Imunocitoquímica (PERES, 2016)

Alguns estudos realizados nos últimos anos mostram o Anti-TOPII A, em associação a outros marcadores, usados como marcadores de prognóstico em pacientes com câncer de mama (MUKHERJEE, 2010).

2.5 QUIMILUMINESCÊNCIA

Uma técnica utilizada nos laboratórios como metodologia viável para a detecção de marcadores de proliferação celular, a quimiluminescência consiste na produção de uma radiação luminosa eletromagnética (podendo ser ultravioleta ou infravermelho) por uma reação química (ROSSI, FERREIRA, 2002). A quimiluminescência é aplicada nas áreas de análise por injeção em fluxo, química analítica, cromatografia de coluna líquida, imunoensaios e sistemas de separação por eletroforese capilar (GARCIA-CAMPAÑA *et al.*, 2003).

Os primeiros compostos a serem utilizados como marcadores na quimiluminescência foram o luminol e o isoluminol, entretanto, foram ultrapassados por um composto de maior sensibilidade, o éster de acridina (EA) (KRICKA, 2003). Sua quimiluminescência é desencadeada pelo ataque do peróxido de hidrogênio a ligação éster do carbono nove em

fortes condições alcalinas, onde não requer um catalisador, pois causaria interferências de fundo (BROWN *et al.*, 1997). A concentração desconhecida da amostra vai ser proporcional à emissão total de luz ou a um parâmetro físico ligado a luminescência, como a cor polarização da luz que foi emitida (CAMPBELL *et al.*, 1985).

Diversas análises em laboratório, baseadas nos princípios da quimiluminescência, foram desenvolvidas para métodos que necessitam de alta sensibilidade, como a determinação do fator de crescimento epidérmico, de citocinase de crescimento endotelial vascular. Vários testes já são disponíveis comercialmente, como por exemplo na avaliação de função tireoidiana, marcadores tumorais, hepatite, proteínas específicas dosagem de PSA e esteroides (KRICKA, 2003).

É possível identificar na quimiluminescência várias vantagens, dentre elas, limites de detecção baixos (na faixa de fentomoles), sistema ópticos simplificado, não havendo necessidade de uma fonte de radiação externa; substituição aos radioisótopos, os quais se tornaram poucos populares devido à sua curta meia vida; ao possível dano à saúde e são ensaios que possuem um curto tempo de execução e fácil manuseio (GAMIZ-GRACIA *et al.*, 2009). Além do que, representa um sistema frio onde a energia na forma de luz é produzida diretamente de uma reação química, não passando por algum processo intermediário que envolva calor (CATALANI, 1986).

3. JUSTIFICATIVA

Atualmente, tem-se tido uma grande preocupação em relação ao rastreamento para o câncer de colo uterino, que acontece através da triagem citológica e que tem por objetivo reduzir a incidência do câncer cervical. Entretanto, o método apresenta limitações no que diz respeito a sua sensibilidade em denotar a existência de lesões pré-malignas

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Evidenciar a expressão de marcadores moleculares Ki-67 e TOP II A em amostras cervicais de pacientes com lesões intraepiteliais escamosas, utilizando o método imunoquimiluminescente.

4.2 Objetivos Específicos

- Estabelecer protocolo para imunocitoquímica por quimiluminescência em amostras cervicais;
- Detectar, através deste protocolo, as proteínas Ki 67 (MIB-1) e TOP IIA celular em pacientes com lesões intraepiteliais escamosas;
- Correlacionar o padrão de expressão das proteínas em amostras celulares cervicais com os resultados do exame citopatológico de rotina.

5. METODOLOGIA

5.1 Tipo de estudo

Trata-se de um estudo observacional, analítico e transversal.

5.2 Amostras e Local do estudo

As amostras utilizadas neste trabalho foram provenientes das coletas de material cervical de pacientes atendidas no CENTRO DE REFERENCIA EM SAÚDE DA MULHER MARIA DE LOURDES LOPES LEMOS, situado no Município de Jaboatão-PE. As coletas ocorreram entre julho de 2015 e janeiro de 2016 formando uma população de 31 pacientes com idade entre 18 e 52 anos.

Os estudos citológicos e histopatológico foram realizados em laboratórios privados conveniados ao município no momento do estudo. O estudo imunocitoquimiluminescente foi realizado no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA-UFPE) nos setores de Patologia e Bioquímica. O projeto foi aprovado pelo comitê de ética da Associação Caruaruense de Ensino Superior – ASCES (ANEXO A).

5.3 Critérios de inclusão e exclusão

Este estudo teve como critério de inclusão: todas as pacientes que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE A) e cujo exame citológico foi positivo para lesão intraepiteliaiil escamosa. Os critérios de exclusão se aplicaram a todas as pacientes atendidas fora do período do estudo, pacientes que não atenderam as contraindicações da coleta, como, por exemplo, o uso de cremes vaginais, uso do DIU e pacientes histerectomizadas.

5.4 Coleta de material cervical

A coleta foi realizada da ectocérvice e endocérvice, simultaneamente, utilizando a espátula e a escova endocervical, fazendo giros de 360°, percorrendo o contorno cervical externo e interno, onde posteriormente foi depositado o material dentro do recipiente contendo meio líquido específico do sistema Liqui-PREP™. Foi feita uma contagem das células através do microscópio para se verificar a significância da amostra coletada. 50 microlitros da amostra previamente agitada foram espalhados uniformemente na lâmina e observou-se uma média de 1.000 células por campo.

5.5 Conjugação do Anticorpo ao Éster de Acridina

Foi testada a imunoreatividade do anticorpo monoclonal anti-Ki-67 e anti-TOP II a, utilizando o protocolo desenvolvido por Ponce e colaboradores (2006).

O éster de acridina (EA) foi conjugado ao anticorpo de acordo com o protocolo desenvolvido por Weeks e colaboradores (1986). O conjugado (anticorpo-EA) foi submetido a uma coluna de Sephadex G-25, equilibrada previamente com tampão fosfato pH 7,2. Em seguida, alíquotas foram coletadas e a quantidade de proteína resultante da conjugação foi determinada através de espectrofotometria. A quimiluminescência das amostras coletadas foi mensurada no luminômetro Modulus Single Tube 9200-001 (Turner BioSystems) e a intensidade da emissão foi determinada em Unidade Relativa de Luz (URL).

5.6 Estudo Imunoquimiluminescente

Para a execução dos testes, seguiu-se um protocolo desenvolvido pelo grupo de pesquisa, usado para imunocitoquímica (LIMA, 2013) onde as amostras coletadas, contendo 2 ml, foram agitadas e separadas em ependorfs, submetidas a uma rotação de 5.000 RPM/4°C por 15 minutos, em seguida passando por 3 lavagens com 50 microlitros de tampão PBS,

sendo descartados a cada lavagem, sob as mesmas condições de rotação. Após a lavagem, o sobrenadante foi descartado, foram adicionados 50 microlitros do anticorpo conjugado e seguiu-se o processo de incubação de 2 horas. Após isso, as amostras passaram por mais 3 lavagens com 500 microlitros de PBS, em seguida, o sobrenadante foi descartado e adicionado 50 microlitros de PBS novamente e assim passando as amostras no vórtex resuspendendo as células cervicais. Por fim, foi feita a leitura no luminômetro.

5.7 Análise dos Dados

A análise dos resultados obtidos das amostras foi feita através do software estatístico livre R, versão 3.3.1. Foi aplicado o teste ANOVA para análise da associação dos grupos, como também foram aplicados os testes T de Student e Tukey estabelecendo a significância ($p < 0,05$).

6. ARTIGO ORIGINAL

Perfil Imunoquimiluminescente das proteínas Ki-67 e Top IIA em Lesões Intraepiteliais Cervicais

Ledson Gláucio Olinto Braga¹; Catharine de Araújo Crisóstomo Pontes¹; Adrya Lúcia Peres Bezerra de Medeiros²; Carlos Eduardo de Queiroz Lima¹; Mário Ribeiro de Melo-Júnior¹.

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

ABSTRACT

Introduction: Cervical cancer is a worldwide public health problem that affects mainly developing countries like Brazil. The Human Papilloma Virus is the main cause of this cancer and is present in 99% of cases. The primary method of screening today is the Pap smear, but it has some limitations and in recent years have been developed methodologies that aim to minimize these limitations to the use of cell proliferation markers. The Ki-67 and TOP Iia markers when they have very high expression levels indicate aberrant induction were used. The measurement of these markers can be made by some methods such as Imunochemiluminescence. **Objectives:** To detect the Ki-67 and TOP Iia markers in cervical lesions and relate to conventional cytological results. **Methods:** 31 women participated in the study forming five groups: NILM, ASC US, ASC H, LSIL and HSIL. **Results:** Data analysis showed that the Ki expression 67 the LSIL groups - NILM (0.0208905) and LSIL - ASC (0.0208905) and expression TOP Iia the NILM groups - LSIL (0.0126204) were significant at the 5% significance. **Conclusions:** The Ki-67 and TOP II markers are effective in screening and monitoring of cervical lesions, but are needed depth studies with a larger sample.

Keywords: Imunoquimioluminescência, antibodies, Cervical Cancer, Anti Ki-67, Anti TOP Iia.

INTRODUÇÃO

O câncer do colo do útero é um problema de saúde pública mundial, que afeta principalmente países em desenvolvimento. Suas altas taxas de incidência e mortalidade acometem, em sua maioria, mulheres que se encontram na fase reprodutiva e de baixo nível socioeconômico (INCA, 2016).

A estimativa da OMS é de aproximadamente 500 mil casos novos por ano no mundo, causando a morte de aproximadamente 230 mil mulheres por ano. O número de novos casos estimados para o Brasil no ano de 2016 é de 16.340, com um risco de 16 casos para cada 100 mil mulheres (BRASIL, 2016).

O principal causador desse tipo de câncer é o HPV (Papiloma Vírus Humano), estando presente em 99% dos casos. Os subtipos mais comuns para essa neoplasia são o 16 e 18. Podem-se apontar outros cofatores predisponentes para o aparecimento dessa doença como uso de contraceptivos orais, multiplicidade de parceiros sexuais, baixa condições socioeconômicas, higiene íntima inadequada e tabagismo (PARKIN et al., 2005; TROTTIER; FRANCO, 2006).

Para o rastreio do câncer cervical, atualmente, o método indicado como o principal é o exame de Papanicolaou, realizado principalmente em mulheres que já tenham vida sexual ativa ou que estejam na faixa etária de 25 a 64 anos de idade, onde se diagnostica as lesões de alto grau (INCA, 2016).

Existem algumas limitações desse teste, mesmo com seu vasto uso, que prejudicam a sua sensibilidade e especificidade como: resultados falso-negativo devido a erros de coleta, como também falta de experiência profissional, dentre outros (TAVARES, 2007).

Para reduzir esses problemas nos últimos anos vem sendo desenvolvidos novos testes visando melhorar o rastreio e prognóstico da doença, dentre eles, o uso de marcadores de proliferação celular. O uso de alguns marcadores como Ki 67, p16 INK4a e ProEx C (BD), tem sido reportado para facilitar a detecção de células anormais através de amostras citológicas convencionais baseado em ensaio imunocitoquímico (BROWN *et al.*, 2016).

O Antígeno nuclear Ki-67 encontra-se em todas as fases do ciclo celular, com exceção da fase G₀. Sua expressão varia de acordo com a fase do ciclo, sendo alcançado o pico nas fases G₂ e M. A Topoisomerase IIa (Top IIa) é uma enzima do núcleo participante de etapas do metabolismo do DNA (ENGELSTAEDTER, 2012). Quando essa proteína está super-expressa considera-se uma indução aberrante (BROWN *et al.*, 2016).

A atividade dessas proteínas pode ser medida através de técnicas como a quimiluminescência que possui alta sensibilidade e seletividade, sendo assim, uma ferramenta bastante atraente (COELHO, 2002).

Assim, no presente trabalho, objetivou-se avaliar o perfil dos marcadores Anti-Ki-67 e Anti-TOP IIa utilizando o método imunoquimiluninescente visando um rastreio precoce das lesões cervicais utilizando amostras em meio líquido

METODOLOGIA

Tipo de estudo, Amostras e Local do estudo

Trata-se de um estudo observacional, analítico e transversal. As amostras utilizadas neste trabalho foram provenientes das coletas de material cervical de usuárias do CENTRO DE REFERENCIA EM SAÚDE DA MULHER MARIA DE LOURDES LOPES LEMOS, situado no Município de Jaboatão-PE. As coletas ocorreram entre julho de 2015 e janeiro de 2016 formando uma população de 31 pacientes.

Os estudos citológicos e histopatológico foram realizados em laboratórios privados conveniados ao município no momento do estudo. O estudo imunocitoquimiluminescente foi realizado no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA-UFPE) nos setores de patologia e bioquímica.

Considerações Éticas

O projeto foi aprovado pelo comitê de ética da Associação Caruaruense de Ensino Superior – ASCES, nº 1.050.262

Critérios de inclusão e exclusão

Este estudo teve como critério de inclusão: todas as pacientes que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e cujo exame citológico foi positivo para lesão intraepitelial escamosa. Os critérios de exclusão se aplicaram a todas as pacientes hysterectomizadas e que foram atendidas fora do período do estudo.

Coleta de material cervical

A coleta foi realizada da ectocérvice e endocérvice, simultaneamente, utilizando a espátula de Ayre e a escova endocervical, movimentadas em giros de 360°, percorrendo o contorno cervical externo e interno, sendo posteriormente realizado o depósito do material dentro de recipiente contendo meio líquido específico do sistema Liqui-PREP™. Foi feita uma contagem das células através do microscópio para se verificar a significância da amostra coletada. 50 microlitros da amostra previamente agitada foram espalhados uniformemente na lâmina e observou-se uma média de 1.000 células por campo.

Exame citopatológico

Após a coleta, as células foram fixadas, submetidas ao processo de coloração citológica e encaminhadas para a leitura em microscópio óptico para serem classificadas de

acordo com a nomenclatura: Negativo para Lesão Intraepitelial Maligna (NILM), Atipia de Significado Indeterminado (ASC US), Lesão de baixo Grau (LSIL), Atipia de significado Indeterminado não excluindo Lesão de Alto Grau (ASC H) e Lesão de Alto Grau (HSIL) para posteriormente serem comparadas com os resultados da Imunoquimiluminescência.

Estudo Imunocitoquimiluminescente

Foi testada a imunoreatividade do anticorpo monoclonal anti-Ki-67 e Anti-TOP II A, utilizando o protocolo desenvolvido por Ponce e colaboradores (2006).

O éster de acridina (EA) foi conjugado ao anticorpo de acordo com o protocolo desenvolvido por Weeks e colaboradores (1986). O conjugado (anticorpo-EA) foi submetido a uma coluna de Sephadex G-25, equilibrada previamente com tampão fosfato pH 7,2. Em seguida, alíquotas foram coletadas e a quantidade de proteína resultante da conjugação foi determinada através de espectrofotometria. A quimiluminescência das amostras coletadas foi mensurada no luminômetro Modulus Single Tube 9200-001 (Turner BioSystems) e a intensidade da emissão foi determinada em Unidade Relativa de Luz (URL).

Análise Estatística

A análise dos resultados obtidos das amostras foi feita através do software estatístico Livre R versão 3.3.1. Foi aplicado o teste ANOVA para análise da associação dos grupos, como também foram aplicados os testes T de Student e Tukey estabelecendo a significância $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o período de coletas foram obtidas 31 amostras de pacientes com idade entre 18 e 52 anos. Após a leitura das lâminas citológicas, 11 amostras apresentaram normalidade (NILM), 13 amostras apresentaram LSIL, 2 pacientes com HSIL, 3 amostras com citologia ASC-US e 2 pacientes apresentaram ASC-H como mostra a tabela I.

Tabela I – Citologias coletadas entre julho de 2015 e janeiro de 2016.

CITOLOGIA	NÚMERO DE AMOSTRAS	PERCENTUAL %
------------------	---------------------------	---------------------

NILM	11	35,6%
LSIL	13	41,5 %
HSIL	2	6,5 %
ASC-US	3	9,7 %
ASC-H	2	6,5 %

Após a coleta, as amostras foram submetidas ao teste de Imunoquimiluniescencia para a detecção de Anti-Ki-67 e Anti-TOP II a.

Foi aplicado o teste T de Student para amostras independentes como o objetivo de comparar os resultados entre os grupos para os dois marcadores considerando amostras significativas com p valor <0,05. O grupo ASC é composto pelas amostras ASC US e ASC H e o grupo HSIL não pôde ser analisado por esse teste por não ter um número significativo para ser comparado. Em nenhuma das análises foi encontrada significância para esse teste como visto na tabela II.

Tabela II – Comparação dos grupos NILM, ASC e LSIL para expressão de Anti-Ki-67 e posteriormente para Anti-TOP II a através do teste T de Student.

Grupos (Expressão Ki – 67)	P – Valor
NILM – ASC	0.5821
ASC - LSIL	0.1816
Grupos (Expressão TOP II A)	P – Valor
NILM – LSIL	0.6358

Para a expressão Anti-Ki-67 foi aplicada a análise de variância (ANOVA) sendo observado que há diferença significativa entre as lesões (P-valor 0.0165), visto que as diferenças entre as médias dos grupos foram significantes (P valor < 0,05).

A tabela III mostra as diferenças entre as médias dos pares de amostras através do teste de TUKEY. Apenas LSIL – NILM e LSIL – ASC foram significativas ao nível de 5% de significância.

Tabela III– Médias de expressão de Anti Ki- 67 dos grupos pelo teste TUKEY.

Grupos	P – Valor
NILM-ASC	0.9104332
NILM-LSIL	0.0208905
ASC-LSIL	0.0437539

A figura I mostra os valores das amostras que apresentaram diferenças significativas. O grupo NILM apresentou uma leitura da RLU menor que a leitura da RLU grupo LSIL. O mesmo aconteceu com a leitura do grupo ASC comparado a leitura do grupo LSIL, sendo que o valor é referente a uma amostra ASC-US.



Figura I – Valores das amostras de Anti-Ki 67 significativas pelo teste de Tukey.

Para a expressão da TOP II A também foi aplicado o teste de análise de variância (ANOVA) e foi concluído que há diferença significativa entre as lesões (P-valor 0.0159), visto que as diferenças entre as médias dos grupos foram significantes (P valor < 0,05).

Os pares com diferenças significativas são aqueles com o P-valor <0,05. Como visto na tabela IV, apenas a comparação LSIL – NILM foi significativa ao nível de 5% de significância.

Tabela IV – Médias de expressão de Anti-TOP II A dos grupos pelo teste TUKEY.

Grupos	P – Valor
--------	-----------

NILM-ASC	0.3525189
NILM-LSIL	0.0126204
ASC-LSIL	0.1550407

Na figura II é possível observar os valores das amostras que apresentaram diferenças significativas para o teste de Tukey. O grupo NILM mostra uma leitura da RLU bem inferior a leitura da RLU grupo LSIL.

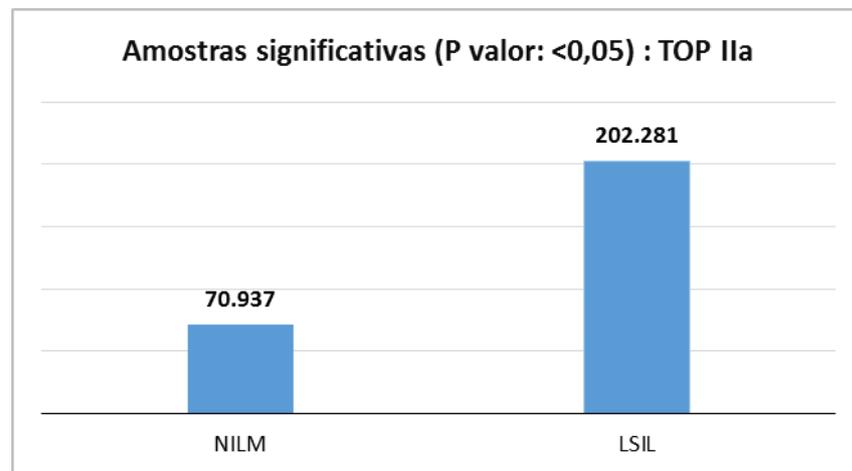


Figura II – Valores das leituras das amostras de Anti-TOP II A significativas ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Considerando positivas as amostras acima da média calculada para cada grupo, a tabela V apresenta a positividade das amostras para Ki 67, positivas para TOP II A e positivas para ambos os marcadores, observando, por exemplo, que no grupo NILM das 11 amostras, 4 foram positivas para os dois marcadores e no grupo LSIL das 13 amostras, 5 apresentaram-se acima da média.

Tabela V – Perfil Imunoquimiluminescente dos grupos citológicos para Ki-67 e TOP II A.

<i>Citologia</i>	<i>Número de Amostras</i>	<i>Imunoquimiluminescência</i>		
		<i>Ki 67</i>	<i>TOP II A</i>	<i>Ki 67/TOP II A</i>
<i>NILM</i>	11	4	5	4
<i>ASC-US</i>	3	2	1	1
<i>LSIL</i>	13	5	6	5
<i>HSIL</i>	2	1	1	1
<i>ASC-H</i>	2	1	1	1

Quando dispostas as médias de RLU dos grupos, foi notado que houve comportamentos diferenciados. Na expressão Ki 67, as médias não se comportaram de forma exponencial de acordo com o grau de lesões como mostra a figura III.

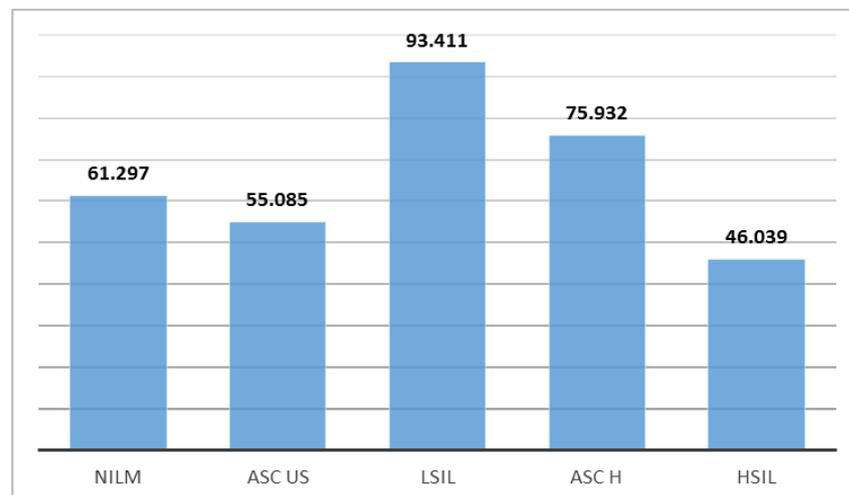


Figura III – Médias da expressão Imunoquimiluminescente de Anti-Ki 67 nos grupos NILM, ASC US, LSIL, ASC H e HSIL

Já as médias de expressão TOP II A aumentaram de forma gradual. Quanto maior o grau da lesão, maior a média do grupo como visto na figura IV.

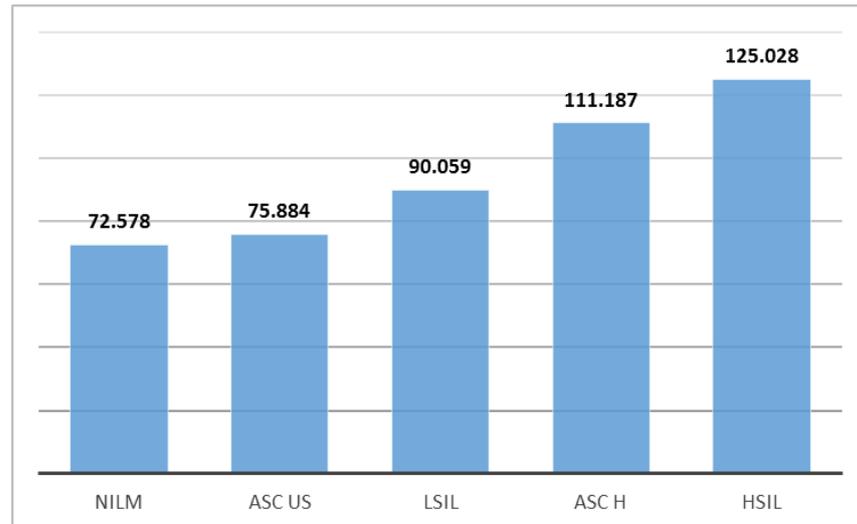


Figura IV – Médias da expressão Imunoquimiluminescente de Anti-TOP II A nos grupos NILM, ASC US, LSIL, ASC H e HSIL.

Um estudo de Peres e Colaboradores (2016) com amostras de 110 mulheres de um serviço público utilizando a técnica de imunocitoquímica, fez o uso dos marcadores celulares Ki 67 e Top IIa para o rastreamento do câncer cervical. Mesmo usando técnicas diferentes, nos dois trabalhos foi possível observar que houve uma maior positividade de TOP II a para HSIL e Ki 67 LSIL, assim confirmando a eficácia da combinação desses dois biomarcadores de rastreamento e prognóstico e da técnica imunoquimiluminescente.

Em concordância com o presente estudo, Brustmann e Naudé (2002) realizaram um estudo usando os marcadores Ki 67, TOP II A, P 53 e NOR em lesões escamosas de vulva ressaltando excelentes resultados na associação de TOP II A e Ki 67, classificando como úteis no rastreamento de lesões e mostrando também a importância do uso de marcadores em associação para uma maior eficácia dos resultados.

Um estudo onde foi analisado o perfil de expressão de Ki 67 no Bócio Colóide em comparação com o Carcinoma Papilífero (SOUZA, 2009) onde a média de marcação para o bócio foi de 13,9% e do carcinoma foi de 38,3% mostrando, assim como no presente estudo, onde a expressão de Ki no grupo NILM foi menor que no grupo LSIL, que quanto maior o grau de lesão, maior a expressão do marcador, o que ocorreu também com a expressão de TOP IIA. O estudo de Terzian e colaboradores (2007) mostrou o comportamento dos marcadores Ki 67 e Caspase 3 em neoplasias mamárias em cadelas associando também sua maior expressão a um pior prognóstico da doença.

Em contrapartida, o estudo de Davidson e colaboradores (2000) usando os marcadores Ki 67 e TOP II A em 64 amostras de lesões cervicais não encontrou relação significativa entre a expressão dos marcadores e a sobrevida das pacientes com carcinoma escamoso.

Quanto ao ensaio quimiluminescente, é notória sua eficácia pela sua sensibilidade e especificidade corroborando com estudos como o de Lima (2013) que aplicou essa técnica para detecção de lecitinas em tumores cutâneos. Em concordância com o nosso trabalho também Araújo-Filho e Colaboradores (2013) usaram a quimiluminescência para detecção de Galectina-3 em adenocarcinoma de próstata. Demonstrando resultados significativos, afirmam que esta técnica é específica e sensível que pode ser usada como ferramenta no diagnóstico precoce por sua detecção a nível molecular.

Este estudo é pioneiro no uso dos marcadores Ki 67 e TOP II A em amostras providas de meio líquido. Uma limitação deste estudo foi a quantidade de amostras relativamente pequena como também a ausência de casos de carcinoma escamoso para que houvesse uma melhor comparação do perfil de expressão dos marcadores.

Diante do exposto, conclui-se que os marcadores Anti-Ki 67 e Anti-TOP II A são ferramentas eficientes no rastreamento e acompanhamento das lesões cervicais, porém são necessários estudos aprofundados, com uma amostragem maior para que haja uma maior significância estatística. Conclui-se também que o método imunoquimiluminescente é eficaz no rastreamento das lesões cervicais por possuir alta especificidade, alta sensibilidade, fácil execução e curto tempo de realização.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. *Estimativa: incidência de câncer no Brasil*. Rio de Janeiro, 2016. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf>>. Acesso em: 10 maio de 2016;
2. PARKIN, D. M.; BRAY, F.; FERLAY, J.; PISANI, P. *Global cancer statistics*. CA A Cancer Journal for Clinicians, v. 55, 2005;
3. TROTTIER, H.; FRANCO, E. L. *Human papillomavirus and cervical cancer: burden of illness and basis for prevention*. American Journal Managed Care. v.12, n. 11, 2006;

4. ENGELSTAEDTER, V; BODA, J; VÖLKLEIN, C; ENGEL, J; JESCHKE, U; KIRCHNER, T; MAYR, D. **Lack of prognostic relevance of Her-2/neu, topoisomerase II α and EGFR in advanced ovarian carcinoma.** *Experimental and therapeutic medicine* v. 3, 2012;
5. TAVARES, S. B. do N.; AMARAL, R. G.; MANRIQUE, E. J. C.; SOUSA, N. L. A.; ALBUQUERQUE, Z. B. P.; ZEFERINO, L. C. **Quality Control in Cervical Cytopathology: a Literature Review.** *Revista Brasileira de Cancerologia.* v. 53, n. 3, 2007;
6. BROWN, C. A. **Role of protein biomarkers in the detection of high-grade disease in cervical cancer screening programs.** *J. oncology*, New York, Jan. 2012. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/jo/2012/289315/>>. Acesso em: 15 de julho. 2016;
7. COELHO, R.; JAQUES, G.A.; BARBOSA, A.D.; VELÁSQUEZ, G.; MONTENEGRO, S. M. L.; AZEVEDO, W.M.; CARVALHO JR, L. B. **Magnetic polysiloxane-polyvinyl alcohol composite as solid-phase in chemiluminescent assays.** *Biotechnol Letters.* v. 24, 2002;
8. PONCE, M.; WYSOCKI, A. D.; PAVARINO, B.; GOLONI, B. **Análise imunocitoquímica do padrão celular de neurofibromas em neurofibromatose tipo 1 (NFI).** *Arq. Ciênc. Saúde.* v. 13, n. 2, 2006;
9. WEEKS, J.; STURGESS, M. L.; BROWN, R. C.; WOODHEAD, J. S. **Immunoassay Using Acridinium Esters.** *Meth Enzymology.* v. 133, 1986;
10. PERES, A. L.; SILVA, K. M. P.; ARAÚJO, R. F.; LIMA FILHO, J. L.; MELO-JÚNIOR, M. R.; MARTINS, D. B. G., PONTES FILHO, N. T. **Immunocytochemical study of TOP2A and Ki-67 in cervical smears from women under routine gynecological care.** *Journal of Medical Science.* v. 23, n. 42, 2016;
11. BRUSTMANN, H.; NAUDÉ, S. **Expression of topoisomerase II α , Ki-67, proliferating cell nuclear antigen, p53, and argyrophilic nucleolar organizer regions in vulvar squamous lesions.** *Gynecol Oncol.* v. 86, n. 2, 2002;
12. SOUSA, G. D.; CZECZKO, N. G.; MOREIRA, H.; RIBAS FILHO, J. M.; MALAFAIA, O.; ZECZKO, L. E. A.; THIELE, E. S.; AGUIAR, L. R. F. **Citophotometric expression of the factor of cellular proliferation ki-67 in the goiter colloid and in the papillary carcinoma of the thyroid.** *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões.* v. 36, n. 2, 2009;

13. TERZIAN, A. C. B.; ZUCCARI, D. A. P. de C.; PEREIRA, R. S.; PARVAM, M. V.; RUIZ, C. M.; SUEIRO, F. A. R.; COELHO, J.. *Avaliação da Caspase-3 e Ki-67 como Marcadores Prognósticos nas Neoplasias Mamárias em Cadelas*. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science. v. 42, n. 2, 2007;
14. DAVIDSON, B.; GOLDBERG, I.; LERNER-GEVA, L.; GOTLIEB, W. H.; BENBARUCH, G.; NOVIKOV, L.; KOPOLOVIC, J. *Expression of topoisomerase II and Ki-67 in cervical carcinoma — clinicopathological study using immunohistochemistry*. Acta Phatologica, Microbiologica et Innologica Scandinavica. v. 108, n. 3, 2000;
15. LIMA, L. R. A.; BEZERRA, M. F.; ALMEIDA, S. M. V.; SILVA, L. P. B. G.; BELTRÃO, E. I. C.; CARVALHO-JÚNIOR, L. B. *Glycophenotype Evaluation in Cutaneous Tumors Using Lectins Labeled with Acridinium Ester*. Disease Markers. v. 35, n. 3, 2013;
16. FILHO, J. L. A.; MELO-JUNIOR, M. R.; BELTRÃO, E. I. C.; LIMA, L. R. A.; ANTUNES, C. B. L.; CARVALHO-JÚNIOR, L. B. *Immunochemiluminescent detection of galectin-3 in tumoral tissue from prostate*. International Journal of Clinical and Experimental Pathology. v. 3, n. 9, 2013;
17. BRASIL, Ministério da Saúde. *Colo do Útero*. Rio de Janeiro, 2016. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colo_uterio/hpv-cancer-perguntas-mais-frequentes>. Acesso em: 25 de janeiro de 2016;

7. CONCLUSÕES

- A associação dos marcadores tumorais Anti-Ki 67 e Anti-Topoisomerase II A mostrou-se significativa no rastreio das lesões do câncer do colo do útero, sendo que a Topoisomerase II A apresentou mais especificidade de acordo com o grau da lesão, podendo ser considerada um excelente marcador de proliferação celular.
- São necessários mais estudos com uma maior amostragem para obtenção de mais informações e a elaboração de estratégias para a melhoria do protocolo. Também é necessária a comparação com dados epidemiológicos e dados da colposcopia.
- A técnica de Imunoquimiluminescência apresentou eficácia na detecção das lesões cervicais, podendo ser uma ferramenta no rastreio e acompanhamento das lesões por se mostrar altamente sensível e específica.

REFERÊNCIAS

APGAR, B. S.; ZOSCHNICK, L.; WRIGHT, T. C. Jr. *The 2001 Bethesda System terminology*. American Academy of Family Physicians. 68(10), 2003;

BAGARELLI, L. B.; OLIANI, A. H. **Tipagem e estado físico de papilomavírus humano por hibridização in situ em lesões intra-epiteliais do colo uterino**. RBGO, 26 (1): 59-64, 2004.

BECCATI, M. D.; BURIANI, C.; PEDRIALI, M.; ROSSI, S.; NECI, I. **Quantitative Detection of Molecular Markers ProEx C (Minichromosome Maintenance Protein 2 and Topoisomerase IIa) and MIB-1 Liquid-based Cervical Squamous Cell Cytology**. American Cancer Society, v 114, 2008;

BONARDI, Luiz Henrique; SILVA, Fábio Rosa; SOUZA, Meriene Viquetti; SOMBRIO, Stefanie Normanton; SILVA, Bruno Rosa; ROSA, Maria Inês. *Epidemiological analysis of patients with Cervical cancer in public service of oncology Criciúma-SC*. Arquivos Catarinenses de Medicina. 39(3), 2010;

BRASIL, **Manual de Procedimentos Técnicos e Administrativos. Coleta do Papanicolaou e ensino do auto-exame da mama**. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer e Secretaria de Estado da Saúde, 2004. Disponível em: <<http://pesquisa.bvsalud.org/brasil/resource/pt/ses-303>>. Acesso em 18 de março de 2016.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Colo do Útero**. Rio de Janeiro, 2016. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colo_uterio/hpv-cancer-perguntas-mais-frequentes>. Acesso em: 25 de janeiro de 2016;

BRENNA, S. M. F.; HARDY, E.; ZEFERINO, L. C. **Conhecimento, atitude e prática do exame de Papanicolaou em mulheres com câncer de colo uterino**. Cad Saúde Pública, 17 (4): 909-914, 2001.

BRITO, C. M. S.; NERY, I. S.; TORRES, L. C. Sentimentos e expectativas das mulheres acerca da citologia oncológica. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 60, n. 4, p. 387-390, 2007.

BROWN, C. A. **Role of protein biomarkers in the detection of high-grade disease in cervical cancer screening programs.** J. oncology, New York, Jan. 2012. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/jo/2012/289315/>>. Acesso em: 15 de Julho de 2016.

BROWN, RC; WEEKS, I; FISHER, M; HARBRON, S; WOODHEADS JS. **Employment of a phenoxy-substituted acridinium ester a long-lived chemiluminescent indicator of glucose oxidase activity and its application in an alkaline phosphatase amplification cascade immunoassay.** Anal.Biochem. 259: 142-151, 1997.

CAMPBELL, A. K.; HALLET, M. B.; WEEKS, I. **Chemiluminescence as na analytical tool in cell biology and medicine.** Methods in Biochemical Analysis. 31, 1985.

CASARIN, M. R. PICCOLI, J. C. E. Educação em Saúde para Prevenção do Câncer de Colo do Útero em Mulheres do Município de Santo Ângelo/RS. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 16, n. 9, p. 3925–3932, 2011.

CATALANI, Luiz H.; WILSON, T. **Electron transfer and chemiluminescence. Two inefficient systems: 1,4-dimethoxy-9,10-diphenylanthracene peroxide and diphenoyl peroxide.** Journal American Chemical Society. v. 111, n. 7, 1989;

COELHO RAL, JAQUES GA, BARBOSA AD, VELÁSQUEZ G, MONTENEGRO SML, AZEVEDO WM, CARVALHO JR LB. **Magnetic polysiloxane-polyvinyl alcohol composite as solid-phase in chemiluminescent assays.** Biotechnol Letters. 24: 1704-1708, 2002.

DERCHAIN, S. F. M.; FILHO, A. L.; SYRJANEN, K. J. **Neoplasia intra-epitelial cervical: diagnóstico e tratamento.** RBGO, 27 (2): 425-433, 2005.

DIOGENES, M. A. R.; REZENDE, M. D. S.; PASSOS, N. M. G. **Prevenção do câncer: Atuação do enfermeiro na consulta de enfermagem ginecológica-** aspectos éticos e legais da profissão. Fortaleza: Pouchain Ramos, 106 páginas, 2001.

ENGELSTAEDTER, V; BODA, J; VÖLKLEIN, C; ENGEL, J; JESCHKE, U; KIRCHNER, T; MAYR, D. **Lack of prognostic relevance of Her-2/neu, topoisomerase II α and EGFR in advanced ovarian carcinoma.** Experimental and therapeutic medicine v. 3, 2012;

FERREIRA, M. L. S. M. Motivos que influenciam a não realização do exame de Papanicolaou segundo a percepção de mulheres. **Escola Anna Nery Revista de Enfermagem**; v. 13, n. 2, p. 378-384, 2009.

FITZGIBBONS, P. L. et al. *Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus statement 1999*. Archives of Pathology e laboratory Medicine, v. 124, p. 966-978; 2000;

GAMEIRO, Ana; ALVES, João; SANTO, Irene; AZEVEDO, Jacinta. **Anogenital Warts in a Major Venereology Clinic: Centro de Saúde da Lapa - Lisbon, 2008 to 2014**. Acta Médica Portuguesa. 29(2), 2016;

GÁMIZ-GRACIA, L.; GARCÍA-CAMPAÑA, A. M.; HUERTAS-PÉREZ, J.F.; LA, F. J. **Chemiluminescence detection in liquid chromatography: applications to clinical, pharmaceutical, environmental and food analysis--a review**. Anal Chim. Acta. v 7, n 28, 2009;

GARCIA-CAMPAÑA, A. M.; BAEYENS, . R. G. **Derivatization of biomoléculas for chemiluminescent detection in capillary electrophoresis**. Journal of Chromatography B, v. 793, 2003.

GUPTA N., SRINIVASAN R., RAIWANSHI A. **Functional biomarkers in cervical precancer: an overview**. Diagn Cytopathol, Vol. 38(8), pag. 618-23, 2010;

HAZAN, C.; MELZER, K.; PANAGEAS, K.S. **Evaluation of the proliferation marker MIB-1 in the prognosis of cutaneous malignants melanoma**. Cancer, Hagerstown, 95 (3): 634-640, 2002.

HO, C-M.; YANG, S-S.; CHIEN, T-Y. ET AL. **Detection and quantitation of human papillomavirus type 16, 18 and 52 DNA in the peripheral blood of cervical cancer patients**. GynecolOncol, 99: 615-621, 2005.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2016. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa201221_11.pdf>. Acesso em: 10 maio de 2016.

IQBAL, S.; ANDERSON, T.J.; MARSON, L.P. **MIB-1 assessments in breast cancers.** Breast, Edinburg, 11 (3): 252-256, 2002.

JANICEK, M.F.; AVERETTE, H.E. **Cervical cancer: prevention, diagnosis and therapeutics.** CA Cancer J Clin, 51: 92-114, 2001.

JUNG, W. W.; CHUN, T.; SUL, D. **Strategies against human papillomavirus infection and cervical cancer.** J Microbiol, 42 (4): 255-266, 2004.

KELLY D., KINCAID E., FANSLER Z. ROSENTHAL D.L., CLARK D.P. **Detection of cervical high-grade squamous intraepithelial lesions from cytology samples using a novel immunocytochemical assay (ProEx™ C).** Cancer, Vol. 108 (6), pag. 494-500, 2006;

KULASINGAM, S. L.; KIM, J.J.; LAWRENCE, W.F.; MANDELBLATT, J.S.; MYERS, E. R.; SCHIFFMAN, M.; *Cost-effectiveness analysis based on the atypical squamous cells of undetermined significance/low-grade squamous intraepithelial lesion triage study. (ALTS).* JNCI Journal of the National Cancer Institute. 98(2): 92-100.2006;

KRICKA, L.J. **Clinical applications of chemiluminescence.** Anal.Chim.Acta. 500: 279–286, 2003.

LARI S.A., KUERER H. M. **Biological markers in DCIS and Risk of Breast recurrence: A Systematic Review.** Journal of Cancer, Vol. 2, pag. 232-261, 2011;

MOTTA, Rafael Da Ros; ZETTLER, Claudio Galeano; CAMBRUZZI, Eduardo; JOTZ, Geraldo Pereira; BERNI, Renata Brutti. **Ki-67 and p53 correlation prognostic value in squamous cell carcinomas of the oral cavity and tongue.** Brazilian Journal of Otorhinolaryngology. 75 (4), 2009

MUKHERJEE, A.; SHEHATA, M.; MOSELEY, P.; RAKHA, E; ELLIS; CHAN, S. **Topo2a protein expression predicts response to anthracycline combination neo-adjuvant chemotherapy in locally advanced primary breast cancer.** British Journal of Cancer. v 103, n 12, 2010;

NEVES, L, R, O; OSHIMA, C, T, F; ARTIGIANI-NETO, R; YANAGUIBASHI, G; LOURENÇO, L, G; FORONES, N, M. **Ki67 AND p53 IN GASTROINTESTINAL STROMAL TUMORS – GIST.** Arquivo Gastroenterol, v.46, n. 2, 2009;

PAPACONSTANTINO, H. T.; LEE, A. J.; SIMMANG, C. L.; ASHFAQ, R.; GOKASLAN, S. T.; SOKOL, S.; HUBER, P. J. JR.; GREGORCYK, S. G.; **Screening methods for high-grade dysplasia in patients with anal condyloma.** *J. Surg. Res.*, 127: 8-13, 2005.

PARKIN D. M.; BRAY F.; FERLAY J.; PISANI P. Global cancer statistics. *CA A Cancer Journal for Clinicians*, 55, 2005.

PERES, Adrya Lúcia; SILVA, Keila Maria Paz; ARAÚJO, Rosângela Ferreira; LIMA FILHA, José Luiz; MELO-JÚNIOR, Mário Ribeiro, MARTINS, Danyelly Bruniska Gondim, PONTES FILHO, Nicodemos Teles. **Immunocytochemical study of TOP2A and Ki-67 in cervical smears from women under routine gynecological care.** *Journal of Medical Science*. 23(42), 2016;

PONCE, MAS; WYSOCKI, AD; PAVARINO-BERTELLI, EC; GOLONI-BERTOLLO, EM. **Análise imunocitoquímica do padrão celular de neurofibromas em neurofibromatose tipo 1 (NF1).** *Arq. Ciênc. Saúde*. 13 (2): 82-86, 2006.

ROSSI, AV; FERREIRA, EC. **A quimioluminescência como ferramenta analítica: do mecanismo a aplicações da reação do luminol em métodos cinéticos de análise.** *Quim. Nova*. 25(6): 1003-1011, 2002.

SALLES, M. A.; CÚRCIO, V. S.; PEREZ, A. A.; GOMES, D. S.; GOBBI, H.; **Contribuição da imuno-histoquímica na avaliação de fatores prognósticos e preditivos do câncer de mama e no diagnóstico de lesões mamárias.** *J. Bras. Patol. Med. Lab.*[online]., vol.45, n.3, p.213-222; 2009;

SCHOELL, W. M.; JANICEK, M. F.; MIRHASHEMI, R. **Epidemiology and biology of cervical cancer.** *SeminSurgOncol*, 16 (3): 203-211, 1999.

SCHOLZEN Thomas, GERDES Johannes. **The Ki-67 protein: From the known and the unknown.** *Journal of Cellular Physiology*. 128 (3), 2000;

SHI, B.; LIANG, J.; YANG, X.; WANG, Y.; ZHAO, Y.; WU, H.; SUN, L.; ZHANG, Y.; CHEN, Y.; LI, R.; **Integration of estrogen and Wnt signaling circuits by the polycomb group protein EZH2 in breast cancer cells.** *Mol Cell Biol*. 27: 5105–5119; 2007;

SOUSA, Gleim Dias, CZECHKO, Nicolau Gregori; MOREIRA, Hamilton; RIBAS FILHO, Jurandi Marcondes; MALAFAIA, Osvaldo; CZECHKO, Leticia Elizabeth Augustin;

SOUTO, Rafael; FALHARI, Júlio Pedro Borgo; CRUZ, Aparecido Divino. **The Human papillomavirus: a factor related with the formation of neoplasias.** Revista Brasileira de Cancerologia. 51(2): 155-160, 2005;

STOFLER, M. E. C. W.; NUNES, R. D.; SCHNEIDER, I. J. C. *Evaluation of factors Associated with HPV-induced lesions of the cervix.* Arquivos Catarinenses de Medicina. 40(3), 2011;

TAVARES, Suelene Brito do Nascimento; AMARAL, Rita Goreti; MANRIQUE, Edna Joana Cláudio; SOUSA, Nadja Lindany Alves; ALBUQUERQUE, Zair Benedida Pinheiro; ZEFERINO, Luiz Carlos. *Quality Control in Cervical Cytopathology: a Literature Review.* Revista Brasileira de Cancerologia. 53(3), 2007;

TORP, S. H.; *Diagnostic and prognostic role of Ki 67 Immunostaining in human astrocytomas using four different antibodies.* Clinical Neuropathology. V. 21, 252-257, 2002;

TROTTIER H.; FRANCO E. L. Human papillomavirus and cervical cancer: burden of illness and basis for prevention. *American Journal Managed Care.* 12(11), 2006;

WEEKS, J.; STURGESS, M. L.; BROWN, R. C.; WOODHEAD, J. S. **Immunoassay using acridinium esters.** Meth Enzymology. 133: 366-387, 1986.



Associação Caruaruense de Ensino Superior e Técnico - ASCES

Avenida Portugal, 584, Bairro Universitário- Caruaru - PE - Brasil - CEP 55016-400

Tel.: +55 (81) 2103.2000 / Fax: +55 (81) 2103.2053

e-mail: ascres@ascres.edu.br - www.ascres.edu.br

APÊNDICE A

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-Preptm).

Com este trabalho, pretendemos testar alguns biomarcadores em amostras citológicas de cérvix uterina processadas em citologia em base líquida, contribuindo para melhor diagnóstico e prognóstico das lesões intraepiteliais cervicais e câncer, contribuindo na prevenção do câncer cervical e conseqüentemente 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 espécúlo 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 as dúvidas 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-Preptm).

Nome: _____

Assinatura do Participante ou Responsável Legal

Adrya Lúcia Peres Bezerra

Professora Responsável

Contato dos Pesquisadores

Adrya Lúcia: 81 – 9633-2414

Catharine Crisóstomo: 81-9232-1809

Ledson Braga: 83 99621-6996

Carlos Eduardo: 81 -

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 Keizo Asami)-UFPE. Para o qual se espera detectar expressão das proteínas KI-67 e TOP IIa nas amostras citológicas com anormalidades (atípicas, 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: 55.016-910
 UF: PE Município: CARUARU
 Telefone: (81)2103-2000 Fax: (81)2103-2053 E-mail: cep@aces.edu.br

ASSOCIAÇÃO CARUARUENSE DE ENSINO SUPERIOR -



Continuação do Parecer: 1.050.263

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/quimioluminescência;
- 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 cêrvico-vaginal após introdução do espécúlo 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.

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

Endereço: Avenida Portugal, 584		CEP: 55.016-910
Bairro: Universitário		
UF: PE	Município: CARUARU	
Telefone: (81)2103-2090	Fax: (81)2103-2053	E-mail: cep@aces.edu.br

**ASSOCIAÇÃO CARUARUENSE
DE ENSINO SUPERIOR -**



Continuação do Parecer: 1.050.202

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 Papanicolaou. 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 (líqui-prep™). 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 Aprovação da CONEP:

Não

CARUARU, 05 de Maio de 2015

**Assinado por:
ROSIEL JOSÉ DOS SANTOS
(Coordenador)**

Endereço: Avenida Portugal, 584		
Bairro: Universitário		CEP: 55.016-010
UF: PE	Município: CARUARU	
Telefone: (01)2103-2090	Fax: (01)2103-2053	E-mail: cep@assoc.edu.br

