

# ASSOCIAÇÃO ENTRE A CARGA VIRAL DE HPV DE ALTO RISCO, EXPRESSÃO DE p16<sup>INK4a</sup> E LESÕES INTRA-EPITELIAIS ESCAMOSAS DO COLO UTERINO

JOSE ELEUTÉRIO JUNIOR\*, PAULO CÉSAR GIRALDO, DIANE ISABELLE MAGNO CAVALCANTE, ANA KATHERINE GONÇALVES, RENATA MIRIAN NUNES ELEUTÉRIO

Trabalho realizado no Departamento de Tocoginecologia – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP

## RESUMO

**OBJETIVO.** Determinar a carga viral do HPV de alto risco em lesões intra-epiteliais escamosas do colo uterino e sua associação com a expressão da proteína p16<sup>INK4a</sup>.

**MÉTODOS.** Foram analisadas 109 amostras de biópsias de colo uterino (57 de tecido normal, 26 de lesões intra-epiteliais escamosas de baixo grau –LSIL, e 26 de lesões intra-epiteliais escamosas de alto grau – HSIL). A determinação da presença do HPV de alto risco e sua carga viral foi feita por biologia molecular, com captura de híbridos, por meio de coleta de células de colo uterino previa à biópsia. O material histológico foi preparado e testado por imunohistoquímica, utilizando p16<sup>INK4a</sup> kit (clone E6H4).

**RESULTADOS.** Encontrou-se 57,8% de positividade para HPV de alto risco nos 109 casos estudados, sendo 29,8% nos casos normais, 80,8 % nos casos com LSIL e 96,1% nos casos de HSIL. A expressão da proteína p16<sup>INK4a</sup> ocorreu em 23,8 % do total casos com SIL (15,4% dos casos com LSIL e 84,6% dos casos com HSIL), porém não houve qualquer caso positivo nos tecidos sem lesão intra-epitelial. A carga viral foi significativamente superior para os casos positivos para p16<sup>INK4a</sup>, sendo a média de 669,9 RLU/PCB (9,47 a 2814,9), em relação aos casos negativos em que a média foi de 253,94 RLU/PCB (1.07 a 1882,21) ( $p < 0.05$ ). Mas, analisando apenas as HSIL, a diferença não foi significativa.

**Conclusão.** No presente estudo, embora a carga viral de HPV de alto risco tenha demonstrado uma diferença significativa entre casos positivos e negativos para p16, nos casos de HSIL isto não foi confirmado. Novos estudos, com maior número de casos, são necessários para conclusões mais consistentes.

UNITERMOS: HPV. Câncer de colo uterino. Biomarcadores do câncer cervical. p16. Carga viral

## \*Correspondência

Rua Tenente Benévolo, 1560 Apto  
202 - Meireles – Fortaleza - CE  
Cep 60160-041  
prof.eleuterio@gmail.com

## INTRODUÇÃO

A evidente associação entre o *Papillomavirus humano* (HPV) e as lesões pré-invasoras e invasoras do colo de útero tem motivado muitos estudos. Assim, hoje se sabe que o tipo 16 é o mais prevalente em todo o mundo<sup>1</sup>, independentemente da gravidade da lesão escamosa, e, de maneira geral, os HPV identificados como de alto risco estão presentes em mulheres imunocompetentes em cerca de 20% dos quadros histológicos negativos, em 70% dos casos de lesões intra-epiteliais escamosas de baixo grau (LSIL), em mais de 90% das lesões intra-epiteliais escamosas de alto grau (HSIL) e em mais de 95% dos casos de carcinoma escamoso<sup>2, 3, 4</sup>.

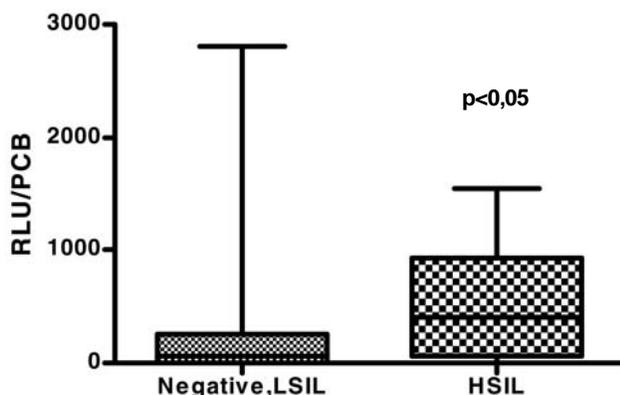
O mecanismo pelo qual o HPV de alto risco influi no ciclo celular, levando a sua desregulação e progressão da lesão, inclui fatores inerentes ao vírus e à sua inter-relação com a célula hospedeira. Tais interferências no metabolismo celular poderão causar modificações, promovendo o aparecimento de biomarcadores que, uma vez identificados, serviriam para orientar o prognóstico de evolução da doença. Assim, a persistência de vírus de alto risco<sup>5</sup>, alta carga viral<sup>2, 6-15</sup>, persistente alta carga viral<sup>16,17,18</sup>, expressão do marcador de proliferação MIB-1<sup>19</sup> e, finalmente, a expressão do marcador de supressão tumoral p16<sup>INK4a</sup><sup>4, 20, 21</sup>, estão sendo apontados como prováveis marcadores de diagnóstico de lesões escamosas de alto grau e de seu prognóstico.

Vários pesquisadores defendem a idéia de que a alta carga viral de HPV de alto risco teria uma importante relação com lesões intra-epiteliais escamosas e sua maior gravidade<sup>6, 7, 8, 10, 12, 15, 18, 22</sup>. Outros pesquisadores enfatizam a importância da persistência da alta carga viral por longo tempo, e não simplesmente uma medida isolada, assim como só teria valor a alta carga viral do HPV tipo 16, sem considerar os demais tipos<sup>2, 3, 9, 13, 14, 16, 17</sup>. Por outro lado, alguns pesquisadores discordam deste fato por não haver uma relação suficientemente clara entre intensidade e persistência da carga viral do HPV de alto risco e gravidade da lesão epitelial do colo uterino. Afirmam que os achados não são suficientes para utilizá-los como parâmetro útil na predição do diagnóstico morfológico e do prognóstico<sup>23, 24</sup>, mesmo considerando-se apenas o HPV 16<sup>5</sup>.

Na prática clínica, tem sido defendido o uso de kits de detecção de HPV de alto risco utilizando-se sondas para 13 tipos diferentes de HPV, e não simplesmente o HPV 16<sup>25</sup>. Parece que o teste de captura híbrida de 2ª geração (ch2) daria uma estimativa de carga viral global, de forma que mulheres com mais baixa carga viral seriam mais propensas a eliminar espontaneamente o vírus, enquanto altos níveis dos vírus se associam com a persistência<sup>15</sup>.

Ao mesmo tempo, a proteína de supressão tumoral p16<sup>INK4a</sup> tem sido estudada em casos de lesões escamosas do colo uterino, mostrando uma boa concordância com lesões de maior gravidade

**Gráfico 1 - Carga viral de casos com diagnóstico histológico de HSIL e casos não HSIL (LSIL e normal) em conjunto**



Não HSIL (média = 324.7 +/- 760.8 RLU/PCB) (teste de Mann Whitney)  
 HSIL (média = 545.6 +/- 541 RLU/PCB)  
 LSIL: lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau  
 HSIL: lesão intra-epitelial escamosa de alto grau

(HSIL). A p16<sup>INK4a</sup> tem sido apontada como uma possível marcadora prognóstica das lesões pré-invasivas<sup>4,20,21</sup>. A associação de diferentes marcadores de gravidade da lesão talvez possa aumentar a sensibilidade e especificidade para diagnosticar lesões de alto grau do colo uterino. Parece, portanto, interessante verificar se há alguma associação entre a intensidade da carga viral e a expressão do marcador p16<sup>INK4a</sup> em mulheres com lesão intra-epitelial escamosa. Talvez a associação destes dois marcadores possa trazer informações mais confiáveis para que se possa prever os casos que teriam maior risco de persistência ou evolução para a malignidade.

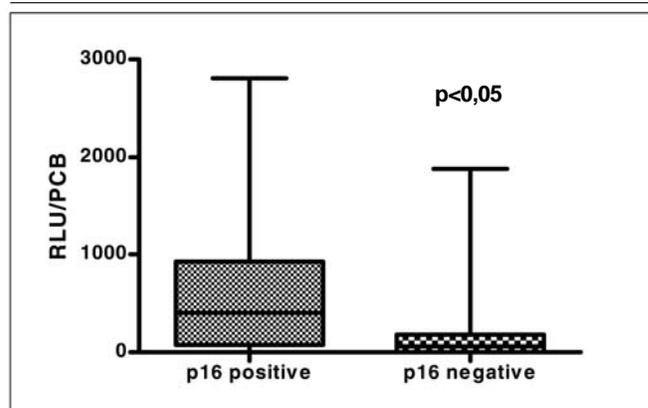
## MÉTODOS

Foi realizado estudo transversal, não intervencional, analisando 109 casos de amostras de biópsias de colo uterino, sendo 57 casos de tecido normal, 26 casos de lesões intra-epiteliais escamosas de baixo grau (LSIL) e outros 26 casos de lesões intra-epiteliais escamosas de alto grau (HSIL). O diagnóstico histológico foi considerado após revisão e concordância cega de dois patologistas experientes. O material foi preparado e testado para identificação do p16<sup>INK4a</sup> por técnica de imunohistoquímica. Com a finalidade de detectar a presença do DNA-HPV de alto risco, foram colhidas amostras de escovados cervicais previamente à realização da biópsia de colo uterino, para teste qualitativo e quantitativo, por técnica de Captura Híbrida 2 (ch2).

### Biópsias

Os blocos de tecido embebidos em parafina foram processados para cortes de 5 µm e corados em hematoxilina-eosina, para diagnóstico morfológico, por dois patologistas independentes, de forma cega. Os casos foram categorizados como tecido normal ou negativo, LSIL e HSIL. Casos com diagnósticos discordantes, ou com material insatisfatório para avaliação, não entraram no estudo.

**Gráfico 2 - Carga viral em casos com expressão de p16<sup>INK4a</sup> e sem expressão de p16<sup>INK4a</sup>**



(teste de Mann Whitney).  
 p16<sup>INK4a</sup>(+)(média = 669.9 +/- 678.1 RLU/PCB)  
 p16<sup>INK4a</sup>(-)(média = 253.94 +/- 473.1 RLU/PCB)

## Imunohistoquímica para p16<sup>INK4a</sup>

Dos blocos de parafina, foram feitos cortes histológicos, de 4 µm de espessura, para realização da reação de imunohistoquímica com a finalidade de identificar a p16<sup>INK4a</sup>. Foi utilizado o p16<sup>INK4a</sup> kit (clone E6H4, DakoCytomation, Carpinteria, CA). Primeiramente, as secções de tecido foram desparafinizadas em xileno e reidratadas, por meio de gradientes de álcool até água destilada. Em seguida, procedeu-se a recuperação antigênica, em forno de micro-ondas à cerca de 100° C. As lâminas foram resfriadas à temperatura ambiente e a peroxidase endógena foi bloqueada por 7,5 minutos na solução bloqueadora de peroxidase. Foram então incubadas com anticorpo primário, por 30 minutos, e com anticorpo de camundongo anti-p16<sup>INK4a</sup> humano por mais 30 minutos, para então serem lavadas em solução tampão fosfato (PBS). Em seguida, as lâminas foram incubadas com solução cromógena de diaminobenzidina (DAB), lavadas em água, contra-coradas em hematoxilina, desidratadas e montadas. As amostras foram consideradas positivas somente quando se observou presença de coloração intensa e difusa nos núcleos e citoplasma das células das camadas basal e parabasal do tecido epitelial escamoso. Casos que expressaram a proteína de maneira focal ou fraca, ou que não a expressaram, foram considerados negativos. Todos os testes foram corridos em paralelos com o cuidado de ter, em cada bateria, um controle reconhecidamente positivo e um controle negativo para a p16<sup>INK4a</sup>.

## Teste de DNA-HPV

A pesquisa do DNA-HPV de alto risco foi realizada pela técnica de captura híbrida de 2ª geração (Digene®), em amostra preservada em meio fixador (Universal Medium Collection - UCM Digene®). O intervalo entre a coleta do material cervical para o teste de captura híbrida e a biópsia foi sempre inferior a um mês. O material foi processado conforme orientações do fabricante para

identificação de DNA-HPV de alto risco, que compreende HPV dos tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68. A análise foi qualitativa e quantitativa, sendo a última expressa em unidade relativa de luz (RLU), que sugere a carga viral. Cada teste foi processado com controles positivos e negativos em triplicata. O teste foi considerado positivo quando a taxa de unidade de luz relativa para vírus do grupo B (RLU/PCB) (RLU do espécimen/média da RLU de dois controles positivos) foi igual ou maior que 1 pg/ml.

### Análise estatística

A correlação entre a carga viral de HPV de alto risco e a expressão de p16<sup>INK4a</sup>, bem como com a gravidade da lesão, foi realizada pelo método de Mann-Whitney, com aplicação de curva ROC ("Receiver-operator curves"), quando houve significância estatística. O projeto foi analisado e aprovado pelo comitê de ética e pesquisa da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

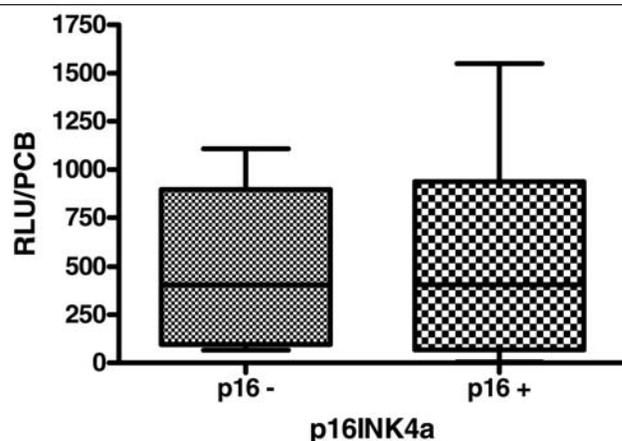
### RESULTADOS

Considerando os três grupos de mulheres (normal, LSIL e HSIL), a média de idade foi de 30,5 ( $\pm 9,9$ ), 29 ( $\pm 7,1$ ) e 38,4 ( $\pm 11,7$ ), respectivamente. Já o número de gestações foi, respectivamente, de 1,5 ( $\pm 1,6$ ), 0,9 ( $\pm 1,1$ ) e 3 ( $\pm 3,9$ ).

Dos 109 casos estudados, em 63 (57,8 %) foram positivos para HPV de alto risco pela captura híbrida de 2ª geração. Esta positividade ocorreu em 29,8% dos casos com tecido cervical normal, em 80,8% dos casos com LSIL, e em 96,1% dos casos com HSIL. A variação da carga viral nos casos positivos para o HPV com diagnóstico histológico de tecido normal e LSIL variou de 1,07 a 1882,21 RLU/PCB (média=328,5  $\pm$  522,5) e 1,23 a 2814,9 RLU/PCB (média=321,7  $\pm$  695,2), respectivamente, e não houve diferença significativa ( $p=ns$ ). No entanto, a carga viral dos casos com diagnóstico de HSIL variou de 9,47 a 1549,11 RLU/PCB (média=545,6  $\pm$  541), mostrando uma diferença considerada estatisticamente significativa ( $p<0,05$ ) em relação aos casos de LSIL e casos de tecido normal (Gráfico 1). O uso da curva ROC confirmou esta diferença com uma área sob a curva de 0,6995 e o melhor balanço entre sensibilidade e especificidade em 152 RLU/PCB (sensibilidade = 60% e especificidade = 68%).

A expressão da proteína p16<sup>INK4a</sup> ocorreu em 26 dos 109 casos estudados (23,8 %). Não houve expressão de p16<sup>INK4a</sup> nos tecidos sem lesão intra-epitelial, contudo foi positiva em 15,4% dos casos de LSIL e em 84,6% dos casos de HSIL. Apenas dois casos dos 26 positivos para p16<sup>INK4a</sup> eram negativos para HPV de alto risco (7,7%). A carga viral foi significativamente superior nos casos positivos (9,47 a 2814,9 RLU/PCB, média=669,9  $\pm$  678,1), em relação aos casos negativos (1,07 a 1882,21 RLU/PCB, média=253,94  $\pm$  473,1) ( $p<0,05$ ) (Gráfico 2). Aplicando-se os valores em uma curva ROC, a área sob a curva foi 0,7265 (IC=95%), com melhores estimativas ocorrendo em valores superiores a 214 RLU/PCB, em que houve uma sensibilidade de 62.5% e especificidade de 79.49%. Quando se comparou carga

Figura 1 - Carga viral especificamente entre casos de HSIL p16<sup>INK4a</sup> positivos e negativos



(teste de Mann-Whitney)

p16<sup>INK4a</sup>(+)(média = 545,6  $\pm$  523,5 RLU/PCB)

p16<sup>INK4a</sup>(-)(média = 619,64  $\pm$  493,9 RLU/PCB)

HSIL: lesão intra-epitelial escamosa de alto grau

viral apenas dentro das HSIL, com expressão e sem expressão de p16<sup>INK4a</sup>, não houve diferença significativa entre os quatro casos negativos para expressão do marcador e os 22 positivos (Figura 1). Deve-se ressaltar que os quatro casos negativos eram todos de neoplasia intra-epitelial cervical grau 2.

### DISCUSSÃO

O aumento da possibilidade de identificar mulheres com lesão intra-epitelial escamosa de maior gravidade, ou mesmo de prognóstico pior, é bastante interessante do ponto de vista clínico. Este é um bom motivo para que sejam estudados os biomarcadores e, principalmente, as suas associações com a morfologia e com o HPV. Trabalhos prospectivos de coorte seriam os mais apropriados para determinar o valor prognóstico dos biomarcadores associados as SIL, contudo demandam estudos de longo tempo e que eticamente não podem respeitar a evolução natural da doença.

A carga viral de HPV de alto risco não foi considerada, baseando-se nos cálculos estatísticos, como um indicador da presença de lesão intra-epitelial, muito embora as HSIL tenham tido cargas virais significativamente superiores quando comparadas as LSIL e ao conjunto LSIL e normalidade, com uma curva ROC de boa correlação. Deve ser tomado cuidado com a possibilidade de quadros de latência levarem a falsos positivos e, portanto, sobrediagnóstico. A possibilidade de diferença entre a carga viral e o diagnóstico da lesão tem sido estabelecida em vários estudos<sup>6,7,8,10,12,13,15,18,22</sup>, embora contestados por outros<sup>23,24</sup>. De fato, o "cutoff" que permite uma melhor performance do teste no diagnóstico de HSIL tem sido bastante variável. Em estudos realizados por comparação com a citologia, e não com a histologia, a presença de vários tipos virais na sonda, a falta de controle sobre a celularidade, dentre outros, são variáveis não controladas que impedem conclusões definitivas<sup>25</sup>.

Até o presente, em pesquisa no banco de dados do MEDLINE, não se encontrou nenhum estudo fazendo a correlação da presença do HPV de alto risco, sua carga viral e a expressão da proteína p16<sup>INK4a</sup>. Aqui foi possível constatar uma carga viral maior nos casos que expressaram a proteína, mesmo com as óbvias limitações citadas acima. A carga viral acima de 214 RLU/PCB apresentou o melhor balanço entre sensibilidade e especificidade para a positividade da proteína em biópsias, independente do diagnóstico morfológico. No entanto, esta visão é dada por uma análise geral, sem se levar em conta o tipo morfológico da lesão, e tão somente a positividade ou não para o p16<sup>INK4a</sup>. Quando se fez uma comparação de casos positivos e negativos para o marcador apenas entre a HSIL, a carga viral não demonstrou ser diferente de forma significativa. Sem dúvida, o reduzido número de casos de HSIL com p16<sup>INK4a</sup> negativo (quatro) é um fator que impede uma conclusão definitiva sobre a importância da correlação dos dois marcadores, muito embora devemos ressaltar que todos estes casos eram de NIC 2.

### CONCLUSÃO

O presente trabalho sugere que a carga viral de alto risco por captura híbrida ainda enseja controvérsias no que diz respeito à morfologia, na sua relação com a presença de lesão intra-epitelial e seu grau histológico. O mesmo tende a ocorrer com relação à proteína de supressão tumoral p16<sup>INK4a</sup>, em que se observa maior carga viral nos casos positivos para o marcador, mesmo nas LSIL, com um provável potencial maior de evolução. Mas esta mesma carga viral pode estar em níveis maiores em casos de HSIL p16 negativo, no entanto do tipo NIC 2. Estudos maiores, e com variáveis controladas com abordagem de seguimento, deverão completar estes achados para definir ou afastar uma provável associação da carga viral com a positividade de p16<sup>INK4a</sup>.

**Conflito de interesse:** não há.

### SUMMARY

#### ASSOCIATION BETWEEN HIGH RISK HPV VIRAL LOAD, p16<sup>INK4a</sup> EXPRESSION AND INTRA-EPITHELIAL CERVICAL LESIONS

**OBJECTIVE.** To determine the (HR-HPV) high risk HPV viral load in squamous intra-epithelial lesions and association with p16<sup>INK4a</sup> expression.

**METHODS.** A series of 109 cervical biopsies were studied (57 normal tissue, 26 low grade squamous intra-epithelial lesions [LSIL] and 26 high grade squamous intra-epithelial lesions [HSIL]). Detection of high risk HPV and viral load in cervical cells was made by molecular biology using hybrid capture 2nd generation collected before the biopsy. The p16<sup>INK4a</sup> was identified by immunohistochemistry using the p16<sup>INK4a</sup> kit (clone E6H4).

**RESULTS.** High risk HPV was positive in 57.8% of all cases (29.8% in normal tissue, 80.8% in LSIL and 96.1% in HSIL). Protein p16<sup>INK4a</sup> was expressed in 23.8 % of squamous intra-epithelial lesions (15.4% in LSIL and 84.6% in HSIL). In normal

tissue all cases were negative to p16<sup>INK4a</sup>. The viral load was higher in p16 positive cases than in negative cases (positive p16<sup>INK4a</sup> mean of 669.9 RLU/PCB [9.47 - 2814.9] and negative p16<sup>INK4a</sup> mean of 253.94 RLU/PCB [1.07 - 1882.21] ( $p < 0.05$ ). However when studying just the HSIL cases differences were not significant.

**CONCLUSION.** In this study although the HR-HPV viral load had shown a significant difference between p16 positive and negative cases, in HSIL cases this finding was not confirmed. New studies with a larger number of cases are necessary for consistent conclusions. [Rev Assoc Med Bras 2007; 53(6): 530-4]

**Key words:** HPV. Cervical cancer. Biomarkers of cervical cancer. p16. Viral load

### REFERÊNCIAS

- Schifman M, Castle PE. Human papillomavirus: epidemiology and public health. Arch Pathol Lab Med. 2003;127:930-4.
- Wu Y, Chen Y, Li L, Yu G, Zhang Y, He Y. Associations of high risk HPV types and viral load with cervical cancer in China. J Clin Virol. 2006;35:264-9.
- Andersson S, Safari H, Mints M, Lewensohn-Fuchs I, Gyllensten U, Johansson B. Type distribution, viral load and integration status of high risk human Papillomaviruses in pre-stages of cervical cancer (CIN). Br J Cancer. 2005;91:2195-200.
- Eleutério J Jr, Giraldo PC, Gonçalves AK, Cavalcante DI, de Almeida Ferreira FV, Mesquita SM, Morais SS. Prognostic markers of high-grade squamous intraepithelial lesions: the role of p16<sup>INK4a</sup> and high-risk human papillomavirus. Acta Obstet Gynecol Scand. 2007;86:94-8.
- Castle PE, Schiffman M, Wheeler CM for the ALTS Group. Hybrid capture 2 viral load and the 2-year cumulative risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 or cancer. Am J Obstet Gynecol. 2004;191:1590-7.
- Santos ALF, Derchain SFM, Martins MR, Sarian LOZ, Martinez EZ, Syrjanen KJ. Human Papillomavirus viral load in predicting high grade CIN in women with cervical smears showing only atypical squamous cells or low-grade squamous intraepithelial lesion. São Paulo Med J. 2003;121:238-43.
- Sarian LOZ, Santos ALF, Derchain SFM, Figueiredo PG, Morais SS. Carga viral do Papilomavirus humano na predição da gravidade de lesões cervicais em mulheres com atipias celulares na colpocitologia oncótica. Rev Bras Ginecol Obstet. 2003;25:365-70.
- Flores R, Papenfuss, Klimecki WT, Giuliano AR. Cross-sectional analysis of oncogenic HPV viral load and cervical intraepithelial neoplasia. In J Cancer. 2005; 118:1187-93.
- Zerbini M, Venturoli S, Cricca M, Gallinella G, De Simone P, Costa S, et al. Distribution and viral load of type specific HPVs in different cervical lesions as detected by PCR-ELISA. J Clin Pathol. 2001;54:377-80.
- Schlecht NF, Trevisan A, Duarte-Franco E, Rohan TE, Ferenczy A, Villa LL, et al. Viral load as a predictor of the risk of cervical intraepithelial neoplasia. In J Cancer. 2003;103:519-24.
- Sun CA, Lai HC, Chang CC, Neih S, Yu CP, Chu TY. The significance of human Papillomavirus viral load in prediction of histologic severity and size of squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix. Gynecol Oncol. 2001;83:95-9.
- Moberg M, Gustavsson I, Gyllensten U. Type-specific associations of human Papillomavirus load with risk of developing cervical carcinoma in situ. Int J Cancer. 2004;112:824-9.
- Moberg M, Gustavsson I, Wilander E, Gyllensten U. High viral loads of human Papillomavirus predict risk of invasive cervical carcinoma. Br J Cancer. 2005;92:891-4.
- Abba MC, Mouron SA, Gomez MA, Dulout FN, Golijow CD.

- Association of human Papillomavirus viral load with HPV 16 and high-grade intraepithelial lesion. *Int J Gynecol Cancer*. 2003;13:154-8.
15. Dalstein V, Riethmuller D, Pretet JL, Carval KLB, Sautiere JL, Carbillet JP, et al. Persistence and load of high-risk HPV are predictors for development of high-grade cervical lesions: a longitudinal French cohort study. *Int J Cancer*. 2003;106:396-403.
  16. Ylitalo N, Sorensen P, Josefsson AM, Magnusson PK, Andersen PK, Ponten J, et al. Consistent high viral load of human Papillomavirus 16 and risk of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. *Lancet*. 2000;355:2194-8.
  17. Josefsson AM, Magnusson PK, Ylitalo N, Sorensen P, Qwarforth-Tubbin P, Andersen PK, et al. Viral load of human Papillomavirus 16 as a determinant for development of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. *Lancet*. 2000; 355:2189-93.
  18. Sun CA, Liu JF, Wu DM, Nieh S, Yu CP, Chu TY. Viral load of high risk human Papillomavirus in cervical squamous intraepithelial lesions. *Int J Gynecol Obstet*. 2002;76:41-47.
  19. Pirog EC, Baergen RN, Soslow RA, Tam D, DeMattia AE, Chen YT, et al. Diagnostic accuracy of cervical low-grade squamous intraepithelial lesions is improved with MIB-1 immunostaining. *Am J Surg Pathol*. 2002;26:70-5.
  20. Keating JT, Cviko A, Riethdorf S, Quade BJ, Sun D, Duesing S, et al. Ki-67, Cyclin E and p16<sup>INK4a</sup> are complimentary surrogate biomarkers for Human papilloma virus-related cervical neoplasia. *Am J Surg Pathol*. 2001;25:884-91.
  21. Guimaraes MCM, Goncalves MAG, Soares CP, Bettini JS, Duarte RA, Soares EG. Immunohistochemical expression of p16<sup>INK4a</sup> and bcl-2 according to HPV type and to the progression of cervical squamous intraepithelial lesions. *J Histochem Cytochem*. 2005;53:509-16.
  22. Bigras G, Marval F. The probability for a Pap test to be abnormal is directly proportional to HPV viral load: results from a Swiss study comparing HPV testing and liquid-based cytology to detect cervical cancer precursors in 13,842 women. *Br J Cancer*. 2005;93:575-81.
  23. Wensveen CW, Kagie MJ, Nagelkerke RW, Veldhuizen RW, Trimbos JB. Can viral load, semi-quantitatively evaluated, of human Papillomavirus predict cytological or histological outcome in women with atypical squamous or glandular cells of undetermined significance cytology? *Eu J Gynaecol Oncol*. 2005;26:393-7.
  24. Eleutério Jr J, Cavalcante DIM, Teixeira FM, Eleutério RMN. Carga viral de HPV de alto risco por captura híbrida e lesões intra-epiteliais escamosas cervicais. *Rev Bras An Clin*. 2002;34:193-4.
  25. Gravitt PE, Burk RD, Lorincz A, Herrero R, Hildesheim A, Sherman ME, et al. A comparison between real-time polymerase chain reaction and hybrid capture 2 for human Papillomavirus DNA quantification. *Can Epidemiol Biomarkers Prev*. 2003;12:477-84.

---

Artigo recebido: 02/06/07  
Aceito para publicação: 15/08/07

---