

# **Cancro do Colo do Útero numa População de Moçambique**

**Factores de Causalidade:**

**Vírus do Papiloma Humano e Schistosomíase**

**Factores envolvidos**

**na transformação e progressão neoplásicas:**

**Mucinas e carboidratos associados a mucinas**

MESTRADO DE ONCOBIOLOGIA DA  
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DO PORTO

1994-1997

CARLA MARIA EUGÉNIA ZAMITH DE FRANCO CARRILHO

# **Cancro do colo do útero numa população de Moçambique**

**Factores de causalidade:  
Vírus do papiloma humano e schistosomíase**

**Factores envolvidos  
na transformação e progressão neoplásicas:  
Mucinas e carboidratos associados a mucinas**

PORTO, 1998

DISSERTAÇÃO DE  
CANDIDATURA  
AO GRAU DE MESTRE  
APRESENTADA À FACULDADE  
DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DO PORTO

Artigo 48º, § 3º - A Faculdade não responde pelas doutrinas expendidas na dissertação. (Regulamento da Faculdade de Medicina do Porto – Decreto-Lei nº 19 337, de 29 de Janeiro de 1931).

## AGRADECIMENTOS

Quero expressar ao Professor Manuel Sobrinho-Simões o meu profundo reconhecimento pelo empenhamento, motivação e disponibilidade que sempre proporcionou para que esta etapa da minha formação se concretizasse. Com ele aprendi a ter objectivos e a importância de os alcançar, mesmo quando me parecia que não era capaz.

À Professora Leonor David, agradeço a orientação e o incentivo no decurso dos trabalhos, determinantes que possibilitaram a concretização dos objectivos que me propus alcançar. O entusiasmo, disponibilidade, amizade e paciência permanentes que demonstrou, em particular nos momentos mais críticos, foi indispensável para que este trabalho tivesse lugar.

À Lic. Patrícia Gouveia pelo apoio na parte técnica de biologia molecular. O empenhamento, disponibilidade, persistência e bom senso sempre presentes foram indispensáveis à resolução de vários problemas no decurso dos trabalhos e permitiu criar laços de amizade.

A todos os colegas do IPATIMUP agradeço o apoio técnico, científico e a amizade demonstradas durante a realização deste trabalho. Em especial quero agradecer aos Técnicos Matos Alberto e Dina Leitão o apoio concedido na parte técnica e ao Dr Geovanni Cassali, pela amizade e incentivo na resolução de vários problemas que foram aparecendo.

Ao IPATIMUP, agradeço o acolhimento e a disponibilização de todos os meios necessários à realização deste trabalho.

À Fundação Calouste Gulbenkian, à Universidade do Porto/Faculdade de Medicina e ao Capacity building project da Universidade Eduardo Mondlane pelas bolsas, concedidas em diferentes períodos, para a realização deste mestrado.

Ao IPO do Porto, em particular ao Professor Carlos Lopes, pelo apoio no alojamento durante todo o decurso deste trabalho.

Ao Dr Carlos Gonzalez, que apesar de fisicamente ausente, estará sempre presente na nossa memória, pelo desenvolvimento do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Central de Maputo e grande impulsionador para a formação dos seus quadros.

A todos os colegas do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Central de Maputo agradeço o incentivo e o entusiasmo demonstrados.

À minha família, pelo incentivo e acarinamento que sempre demonstraram.

AO TINO,  
AOS MEUS PAIS

# ÍNDICE

PREFÁCIO -----	7
I. INTRODUÇÃO	
1. Epidemiologia -----	9
2. Aspectos morfológicos -----	10
3. Etiologia - o HPV -----	12
4. Progressão das lesões <i>in situ</i> para lesões invasoras -----	15
5. Mucinas e carboidratos associados a mucinas no colo do útero -----	16
6. Schistosomíase e cancro do colo do útero -----	20
7. Objectivos específicos -----	21
II. MATERIAL E MÉTODOS	
1. Material -----	22
2. Métodos -----	22
2.1. Estudo histológico -----	22
2.2. Estudo imunocitoquímico -----	22
2.3. Estudo molecular -----	24
III. RESULTADOS -----	27
1. Idade -----	27
2. Morfologia -----	27
3. HPV e schistosomíase -----	29
4. Expressão de antígenos simples das mucinas e gp 230 -----	32
IV. DISCUSSÃO -----	41
V. CONCLUSÕES PRINCIPAIS -----	54
VI. PROPOSTAS PARA ESTUDOS A CURTO PRAZO -----	55
VII. BIBLIOGRAFIA -----	56
RESUMO -----	65

## PREFÁCIO

---

### FUNDAMENTOS E JUSTIFICAÇÕES

O cancro do colo do útero é a neoplasia maligna mais comum do aparelho genital feminino e a segunda neoplasia maligna mais comum na mulher em todo o mundo (incidência estimada de 440 mil novos casos por ano), apesar da diminuição da incidência nos países em que foram implementados programas de rastreio populacional por citologia cervical. Oitenta por cento dos casos provêm de países em desenvolvimento (incluindo Moçambique), onde os programas de rastreio ainda não estão disponíveis.

Os factores que consistentemente têm sido apontados como sendo de risco para o cancro do colo do útero estão em regra ligados ao comportamento sexual da mulher. Este facto sugere o envolvimento na etiopatogénese do cancro do colo uterino de um (ou mais) agente(s) transmitido(s) sexualmente.

Apesar de haver vários factores implicados na oncogénese do cancro do colo uterino (tais como vírus Herpes, hábitos tabágicos, uso de contraceptivos orais, multiparidade, etc), só o vírus do papiloma humano (HPV) se considera directamente envolvido no processo de cancerização, estando presente em quase 100% dos carcinomas cervicais (Braly, 1996; Meijer et al, 1998). A identificação do vírus a partir de técnicas cada vez mais sensíveis (das quais a técnica de PCR – “Polimerase Chain Reaction” é a mais sensível) reduz os casos de carcinomas cervicais HPV-negativos a menos de 5% (Bosch et al, 1993; Meijer et al, 1998).

O carcinoma do colo do útero é assim uma das raras neoplasias humanas em que se consideram satisfeitos os critérios de causalidade por um agente vírico (Franco, 1995). Acredita-se que as proteínas E6 e E7 do vírus, que interactivam com dois produtos de genes oncosuppressores nas células (a proteína p53 e o produto do gene do retinoblastoma), serão responsáveis pelo efeito oncogénico do vírus quando ocorre infecção das células epiteliais do colo uterino (interferindo com o processo de controlo normal da proliferação e diferenciação celulares).

Dos cerca de 70 tipos de HPV até agora identificados só alguns parecem possuir efeito oncogénico (tipos de alto risco). Na maioria dos estudos são os tipos HPV 16 e HPV 18 os que mais frequentemente se encontram em carcinomas invasores (Bosch et al, 1993; Meijer et al, 1998).

A caracterização epidemiológica da infecção por HPV em diferentes áreas geográficas não está totalmente feita, o que dificulta a identificação dos “HPV-de-risco” através de processos de rastreio de massas. Esta informação é indispensável para elaboração de estratégias não só de prevenção como também de intervenção terapêutica, que sejam ao mesmo tempo eficazes, mais económicas e adequadas ao local onde vão ser implementadas. Recentemente, a utilização de vacinas profiláticas e/ou terapêuticas contra a infecção por HPV tem sido apontada como a forma mais promissora de erradicar ou pelo menos controlar a elevada incidência de cancro do colo do útero. Em países desenvolvidos e com programas de rastreio bem estabelecidos, as vacinas terapêuticas e profiláticas reduziram o custo não só do rastreio de massas como também do tratamento, já que a terapêutica existente é extremamente cara e na maior parte das vezes de eficácia limitada.

Nos países em desenvolvimento, com pobres recursos e com um baixo nível socioeconómico, a utilização de vacinas profiláticas é ainda mais aliciante, já que pode mesmo servir de alternativa eficaz aos programas de rastreio populacionais incomportáveis pelo seu elevado custo (Braly, 1996; Schiller e Lowy, 1996).



Oitenta por cento das infecções por HPV regridem e apenas 12,5% dos carcinomas *in situ* progridem para carcinomas invasores. Continuam por esclarecer as razões que determinam essa progressão das lesões *in situ* para o estadiu invasor.

Acredita-se que a integração do vírus no genoma celular será determinante, mas desconhecem-se as modificações daí resultantes, nomeadamente na estrutura de glicoproteínas da superfície das células. A experiência em outros modelos sugere que as mucinas e os antígenos a elas associados (Tn, Sialosil -Tn ou STn, T e Sialosil -T ou ST) são marcadores tumorais e poderão ter um papel central no processo de invasão e metastização. Poucos estudos estão descritos em relação à acumulação destes "antígenos precursores" no colo do útero. Num estudo recente sobre a expressão destes antígenos das mucinas no epitélio cervical normal e em neoplasias cervicais, demonstrou-se a existência de uma associação significativa entre a expressão de Tn e STn e parâmetros clínicos de agressividade das neoplasias (Terasawa et al, 1996). Por outro lado, foi recentemente identificada uma glicoproteína de membrana (gp230), provavelmente uma mucina, cuja expressão está diminuída nas fases iniciais da invasão neoplásica (Nielsen et al, 1997).

Finalmente, não é claro o papel desempenhado por agentes parasitários como factor de risco para o cancro do colo do útero. Outros modelos, tais como a bexiga e a próstata, têm mostrado um papel importante da schistosomíase na iniciação e/ou progressão do carcinoma pavimentoso da bexiga e do carcinoma da próstata (Badawi et al, 1995; Cohen et al, 1995; Cooper et al, 1997; Bedwani et al, 1998). Alguns autores referem uma associação entre a schistosomíase e o cancro do colo do útero (Schwartz e Hyg, 1984), embora outros estudos não tenham encontrado tal associação, mesmo em áreas onde a schistosomíase é endémica (Szela et al, 1993; Moubayed et al, 1994 e 1995).

Dados do Registo do Cancro do Serviço de Anatomia Patológica (SAP) do Hospital Central de Maputo (HCM) indicam que o cancro do colo do útero em Moçambique é a segunda neoplasia mais frequente da população em geral e a neoplasia maligna mais frequente na mulher adulta, representando mais de um quarto de todos os cancros diagnosticados em doentes do sexo feminino. A grande maioria dos casos apresenta-se em estádios muito avançados.

Neste trabalho, procuramos avançar no conhecimento dos factores envolvidos na etiopatogenia do carcinoma do colo do útero em Moçambique, complementando o estudo histológico com os estudos molecular (PCR) e imunocitoquímico, nomeadamente para avaliar a presença de HPV e sub-caracterizar os seus diferentes tipos e para caracterizar o perfil de expressão dos antígenos simples das mucinas no processo de transformação e progressão neoplásica. Pretendemos ainda comparar estes parâmetros nas neoplasias do colo do útero em mulheres com e sem schistosomíase.

O trabalho está organizado nos seguintes capítulos: I – Introdução; II – Material e Métodos; III – Resultados; IV – Discussão; V – Conclusões; VI – Propostas para estudos futuros a curto prazo; VII – Bibliografia; Resumo.

# I. INTRODUÇÃO

## 1. EPIDEMIOLOGIA

O carcinoma do colo do útero é a neoplasia maligna mais frequente do aparelho genital feminino e a segunda neoplasia maligna mais frequente na mulher em todo o mundo, sendo responsável por elevadas taxas de morbidade e mortalidade. A incidência mundial estimada em cada ano é de 440 mil novos casos, e a mortalidade de 200 mil casos por ano. Estima-se para o ano 2000 uma mortalidade de 276 mil casos (Parkin et al, 1993). Cerca de 80% dos casos ocorrem em países em desenvolvimento (Parkin et al, 1993).

A incidência do cancro do colo do útero é variável em diferentes áreas geográficas (Tabela 1). As menores incidências registam-se na América do Norte, na Europa e em algumas áreas da Ásia, onde a estimativa anual de novos casos é de 10, 9 e 8 casos por 100 000 habitantes, respectivamente. As áreas de maior incidência registam-se na África Sub-Sahariana e América Central e do Sul, onde atinge respectivamente os 36 e 26,5 novos casos/ano/100000 habitantes (Parkin et al, 1993).

**Tabela 1. Cancro do colo do útero:  
Incidência anual por 100.000 habitantes (ajustada por idade)**

<b>País</b>	<b>Incidência</b>	<b>Referência</b>
<b>Europa</b>		
Suécia	8,7	a
França	7,6	a
Reino Unido	11,9	a
Espanha (Zaragosa)	4,8	a
Portugal (Gaia)	17,8	a
<b>Ásia</b>		
Tailândia	29,2	a
Índia	19,3	a
China (Shangai)	4,3	a
Israel (judeus)	4,2	a
Filipinas	25,8	a
<b>América</b>		
Brazil (Goiânia)	48,9	a
Colômbia (Cali)	42,2	a
Perú (Trujillo)	54,6	a
Estados Unidos (SEER)		
Negros/brancos	11,7/7,3	a
<b>África</b>		
Guiné Conakry	46,0	b
Gâmbia	10,5	a
Uganda	43,6	c
Zimbabwe (Harare)	67,0	d
Moçambique	18,5	e

a-Parkin et al, 1992; b-Koulily et al, 1997; c-Wabinga et al, 1995; d-Basset et al, 1995; e-Torres, 1969

Estas diferenças na distribuição geográfica estão em grande parte relacionadas com a instituição de programas de rastreio de massa por citologia exfoliativa cervico-vaginal (o teste de Papanicolau).

Nos países desenvolvidos, onde os programas de rastreio por citologia estão bem estabelecidos, a incidência de carcinoma invasor diminuiu significativamente. Nos países em desenvolvimento, onde os programas de rastreio de massa ainda não estão disponíveis, o carcinoma do colo do útero representa um problema de saúde pública, sendo responsável por cerca de um quarto de todas as neoplasias malignas da mulher adulta.

### Situação em Moçambique

Moçambique situa-se entre os países com elevada incidência de cancro do colo do útero. Os poucos estudos realizados na década de 60 apontam para uma incidência de 18,5 a 40 por 100 mil mulheres africanas, sendo de longe a neoplasia maligna mais frequente da mulher adulta (Prates, 1961; Torres, 1969).

Dados do Registo do Cancro indicam que o cancro do colo do útero é a segunda neoplasia maligna mais frequente na população em geral, seguindo apenas o carcinoma hepatocelular, e a neoplasia maligna mais frequente na mulher adulta, com frequências entre 18,5% e 26,8% (Tabela 2).

No período entre 1970 e 1990 o carcinoma do colo do útero representa mais de um quarto de todos os cancros diagnosticados em doentes do sexo feminino (Tabela 2). Neste período, a frequência média de carcinomas do colo do útero diagnosticados foi de 1 caso em cada 6 dias. Esta frequência de carcinoma do colo uterino está no entanto subestimada, uma vez que contempla apenas os casos com diagnóstico anátomo-patológico no Hospital Central de Maputo, que possui o único Serviço de Anatomia Patológica do país. Adiciona-se a estes aspectos a inexistência de um programa de rastreio de massa por citologia cervico-vaginal em Moçambique, o que condiciona o baixo número deste tipo de análise (cerca de 3000 em 1997).

**Tabela 2. Frequência do cancro do colo uterino  
em relação ao total de cancros no sexo feminino (HCM)**

Período	Nº de casos	Frequência (%)
1944 - 56	58	19,8
1956 - 61	122	19,4
1961 - 65	95	20,0
1965 - 66	26	18,5
1970 - 90	1163	26,8

## 2. ASPECTOS MORFOLÓGICOS (Kurman et al, 1992; Fu e Sherman, 1997).

O colo ou cérvix, representa o segmento mais inferior do útero da mulher. É dividido em *exocervix* e *endocervix*. O exocervix exterioriza-se no terço superior da vagina e por isso é de fácil acesso e evidente à inspecção. É separado anatomicamente do endocervix pelo orifício externo. O endocervix é uma cavidade fusiforme também designada por canal endocervical. Estas duas partes são revestidas por diferentes tipos de epitélio:

o exocervix é revestido por epitélio pavimentoso estratificado não queratinizado constituído por 4 camadas: basal (mais profunda), parabasal, intermediária e superficial. O endocervix é revestido por epitélio colunar, constituído por uma camada única de células cilíndricas altas, secretoras de muco, que também revestem as glândulas endocervicais.

A junção entre os dois epitélios é designada de junção escamocolunar e a sua localização anatómica é dependente da idade, função hormonal, paridade e forma do colo uterino. Na vida fetal e neonatal o epitélio colunar está presente no exocervix. Na infância a junção escamocolunar situa-se próximo ao orifício externo cervical. Na adolescência, o tecido endocervical exterioriza-se e pode envolver o exocervix (ectropion). Com o início da actividade sexual, o epitélio colunar é substituído por epitélio escamoso metaplásico e esta área é designada de **zona de transformação**. Esta zona é da maior importância, já que ali se originam as lesões préneoplásicas intraepiteliais e as lesões invasoras.

A grande maioria dos cancros do colo do útero são epiteliais (**carcinomas**) e têm origem na zona de transformação. De acordo com esta origem a maioria dos carcinomas cervicais (cerca de 80%) são carcinomas pavimentosos, representando os adenocarcinomas e os carcinomas adenoescamosos apenas uma pequena parte. Outros tipos de neoplasia maligna que não carcinomas (ex: sarcomas; linfomas) são extremamente raros no colo uterino.

### **Lesões precursoras – Lesões intraepiteliais (Gombel e Silverberg, 1994; Neto, 1998)**

Há evidências epidemiológicas e patológicas apontando no sentido de que a maioria dos casos de cancro invasivo do colo do útero é precedida por uma fase intraepitelial. A caracterização destas lesões tem sido no entanto difícil. As lesões intraepiteliais são caracterizadas morfológicamente por desorganização da arquitectura e da maturação do epitélio, bem como por alterações nucleares. Estas lesões foram inicialmente designadas genericamente por **displasia**, que foi classificada por Papanicolau em cinco graus, desde lesões benignas até às lesões malignas invasoras. A **classificação de Papanicolau** foi usada durante muito tempo no rastreio do cancro do colo do útero por citologia cervico-vaginal (teste de Papanicolau), não tendo, no entanto, paralelismo com o estudo histológico, razão pela qual veio a ser abandonada.

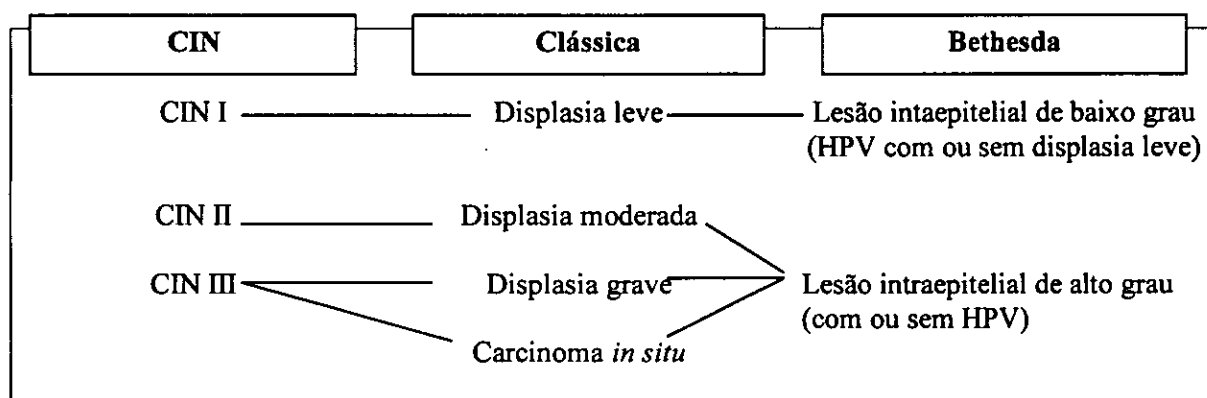
Estas lesões foram posteriormente categorizadas como **lesões intraepiteliais**, em dois grupos – as **displasias** (caracterizadas por vários graus de maturação epitelial anormal) e o **carcinoma in situ** (quando as anomalias atingiam toda a espessura do epitélio, representando um carcinoma confinado à mucosa). A maioria das displasias tendia a regredir, enquanto o carcinoma *in situ* frequentemente progredia. Estudos epidemiológicos prospectivos mostraram que algumas displasias leves progrediam para carcinoma *in situ* (Ambros e Kurman, 1990).

Estudos moleculares posteriores evidenciaram que tanto as lesões intraepiteliais como as invasoras eram frequentemente monoclonais, com factores de risco semelhantes, representando, portanto, um contínuo da mesma doença. Daí a introdução do termo **neoplasia intraepitelial cervical (CIN)**, por Richart e Barron, para designar este grupo de lesões, considerando assim a displasia também como uma entidade neoplásica (Ambros e Kurman, 1990).

Esta classificação é dividida em três graus: **CIN I** (displasia leve), quando a lesão é limitada ao terço inferior do epitélio; **CIN II** (displasia moderada), quando ocupa os dois terços inferiores e **CIN III**, quando envolve toda a espessura do epitélio. Nesta classificação a displasia grave é colocada junto com o carcinoma *in situ* no grau III. Esta classificação foi adoptada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) na classificação histológica das lesões intraepiteliais (Scully et al, 1994).

Mais recentemente foi introduzida a **classificação de Bethesda** para citologia cervical (National Cancer Institute Workshop, 1989) que divide as lesões atrás descritas em **lesões escamosas intraepiteliais de baixo grau** (correspondendo histologicamente à displasia leve da classificação de CIN; este grupo inclui as alterações colócíticas associadas ao HPV) e **lesões escamosas intraepiteliais de alto grau** (que correspondem às lesões classificadas com os graus II e III da classificação de CIN) (Figura 1).

Para efeitos práticos, a classificação de CIN é frequentemente usada no estudo histológico. A classificação de Bethesda é usada mais frequentemente no estudo citológico, substituindo assim a anterior classificação de Papanicolau, embora também seja usada no estudo histológico.



**Figura 1. Correlação das várias classificações de lesões escamosas intraepiteliais** (adaptado de Gombel e Silverberg, 1997)

### 3. ETIOLOGIA – O HPV

Vários factores têm sido referidos como sendo de risco para o desenvolvimento do cancro cervical: factores socio-económicos (baixo nível sócio-económico e baixo índice de escolaridade), idade, raça, factores ginecológicos e obstétricos (o estado hormonal e a multiparidade), uso de contraceptivos orais, hábitos tabágicos, deficiências nutricionais e estado de imunossupressão (Neto et al, 1994; Petry et al, 1994; Schiffman e Brinton, 1995; Braly, 1996; Chichareon et al, 1998; Ho et al, 1998; Ngelangel et al, 1998; Parazzini et al, 1998).

No entanto, os factores mais consistentemente apontados como sendo de risco para o desenvolvimento do cancro cervical, estão geralmente ligados ao comportamento sexual da mulher (Schiffman e Schatzkin, 1994; Franco, 1995).

Desses factores salientam-se a idade mais jovem do primeiro contacto sexual e o número de parceiros sexuais. O risco é duas vezes mais alto em mulheres que iniciaram a actividade sexual antes dos 16 anos, comparado com as que a iniciaram após os 20 anos. Adicionalmente o risco é três ou mais vezes superior em mulheres com mais de 6 parceiros sexuais (Schiffman e Brinton, 1995).

Tem sido apontada ainda como factor de risco a presença de doenças de transmissão sexual tendo como vector o parceiro sexual masculino (Baken et al, 1995; Bosch et al, 1996; Muñoz et al, 1996).

Estes factos sugerem o envolvimento na etiopatogénese do cancro do colo uterino de um (ou mais) agente (s) transmitido (s) sexualmente. Apesar de terem sido descritos vários agentes potencialmente implicados na oncogénese do cancro do colo uterino (tais como vírus Herpes simples-2 e Chlamídea trachomatis), só o vírus do papiloma humano (HPV) se considera directamente envolvido no processo de cancerização.

A presença de HPV está descrita em 75 a 100% dos carcinomas cervicais e suas lesões precursoras (Bosch et al, 1993; Neto et al, 1994; Bosch et al, 1995; Suzuk et al, 1997; Zehbe e Wilander, 1997; Chichareon et al, 1998; Ngelangel et al, 1998). Adicionalmente tem-se demonstrado que mulheres com HPV têm maior risco de ter um esfregaço cervical anormal, e que a persistência de infecção por HPV precede em 67% dos casos o desenvolvimento de carcinoma do colo do útero e em 75% o desenvolvimento das suas lesões precursoras (Muñoz et al, 1992; Chua e Hjerpe, 1996; Richart et al, 1998). Estudos in vitro demonstram que o HPV em combinação com outros factores é capaz de imortalizar ou transformar células em cultura. Referências a estudos serológicos descrevem que anticorpos que reconhecem antigénios de HPV geralmente estão ausentes em mulheres virgens e aparecem com a actividade sexual (Sherman et al, 1998).

O desenvolvimento de técnicas moleculares cada vez mais sensíveis e específicas para a detecção do HPV, das quais a técnica de PCR ( reacção da polimerase em cadeia) parece ser a mais sensível, demonstra a presença de HPV em virtualmente todos os carcinomas do colo do útero (Franco, 1995; Braly, 1996; Walboomers e Meijer, 1997; Meijer et al, 1998).

O carcinoma do colo do útero é assim uma das raras neoplasias humanas em que se consideram satisfeitos os critérios de causalidade por um agente vírico (Howley, 1991; Franco, 1995; Richart et al, 1998).

### **A descrição do HPV**

O HPV é um Papilomavírus pertencente à família Papovaviridae, e é um vírus icosaédrico não capsulado. O genoma viral é uma molécula de ADN circular de cadeia dupla, contendo 7800 a 7900 pares de bases. As proteínas da cápside dos papilomavírus são antigenicamente similares e por isso eles não são divididos em serotipos com base nos antigénios estruturais. A classificação é feita em génotipos e subtipos e é baseada no grau de homologia dos seus ácidos nucleicos.

Até à data são conhecidos mais de 75 tipos. Considera-se um novo tipo de HPV quando a sequência de nucleotídeos dos genes L1, E6 e E7 difere em mais de 10% dos tipos conhecidos. Quando as diferenças são menores que 2%, o novo isolado é designado variante do mesmo tipo. Os subtipos virais correspondem a genomas cuja sequência de nucleotídeos nessas regiões génicas difere entre 2 a 10% relativamente aos tipos já descritos (Villa, 1998).

O genoma viral contém três regiões: URR ("upstream regulatory region"), região precoce ("early") e região tardia ("late"). A URR é a região não codificante do vírus, cuja principal função é a regulação da replicação viral e a transcrição de sequências na região precoce. As regiões precoce e tardia são regiões codificantes conhecidas por "open reading frames" (ORF). A região precoce codifica proteínas não estruturais críticas para o ciclo de vida precoce do vírus. Estas proteínas interagem com o genoma celular e programam as células hospedeiras a produzir novo ADN viral.

A região tardia é activada após ter lugar a replicação do ADN viral e codifica proteínas estruturais que vão formar a cápside do vírus, produzindo-se assim o virião completo. Importância particular reside em genes da região precoce (E1, E2, E4, E5, E6 e E7), já que estão associados com o desenvolvimento neoplásico. Estes genes controlam não só a replicação viral como codificam proteínas responsáveis pela regulação de genes de transcrição (os quais produzem proteínas que em situações normais reprimem a transformação das células epiteliais normais em células neoplásicas – proteínas oncosupressoras).

O ciclo de vida do HPV está intimamente ligado à diferenciação escamosa cervical. A infecção é transmitida sexualmente e inicia-se nas células basais. A formação das proteínas estruturais que formam a cápside é regulada por proteínas presentes nas camadas superficiais mais diferenciadas do epitélio pavimentoso, a partir das quais são libertadas as partículas virais formadas de novo. Esta infecção pode permanecer latente ou progredir para a síntese de novas partículas virais infecciosas. Sob certas circunstâncias, quando ocorre infecção, o genoma viral integra-se no genoma da célula hospedeira, resultando na falência de transcrição de genes tardios e na transcrição descontrolada de E6 e E7 (Ambros e Kurman, 1990).

A integração do genoma viral no genoma celular está associada à transformação maligna. Acredita-se que uma vez que o genoma vírico é integrado nas células, as proteínas E6 e E7 do vírus interactuam com dois produtos de genes oncosupressores – a proteína p53 e o produto do gene do retinoblastoma – inactivando estes genes celulares, e portanto, inibindo as suas funções como genes reguladores do crescimento. Ao interferir com o processo de controlo normal da proliferação e diferenciação celulares, as proteínas E6 e E7 serão as responsáveis pelo efeito oncogénico do HPV (Park et al, 1995; Hulbreztse e Beaudenon, 1996).

Dos cerca de 75 tipos de HPV já caracterizados, apenas 23 têm sido descritos em associação com infecções do aparelho genital feminino. No colo do útero só alguns tipos parecem possuir efeito oncogénico. Estes tipos são designados de “alto risco” em oposição aos de “baixo risco”, responsáveis por lesões benignas (Tabela 3). Na maioria dos estudos são os tipos HPV 16 e HPV 18 os que mais frequentemente se encontram em carcinomas invasores (Bosch et al, 1993; Neto et al, 1994; Bosch et al, 1995; Nonnenmacher et al, 1995; Suzuk et al, 1997; Chichareon et al, 1998; Ngelangel et al, 1998; Meijer et al, 1998). Outros tipos também têm sido associados com carcinomas invasores, embora menos frequentemente (Tabela 3).

**Tabela 3. Classificação dos papilomavírus humanos por risco oncogénico no colo do útero \***

<b>Categoria de risco</b>	<b>Tipo de HPV</b>	<b>Lesões associadas no colo uterino</b>
Baixo risco	6, 11, 26, 42, 44, 54, 70, 73	CIN I ; condiloma
Alto risco	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 55, 56, 58, 59, 66, 68	CIN II/CIN III; carcinoma invasor

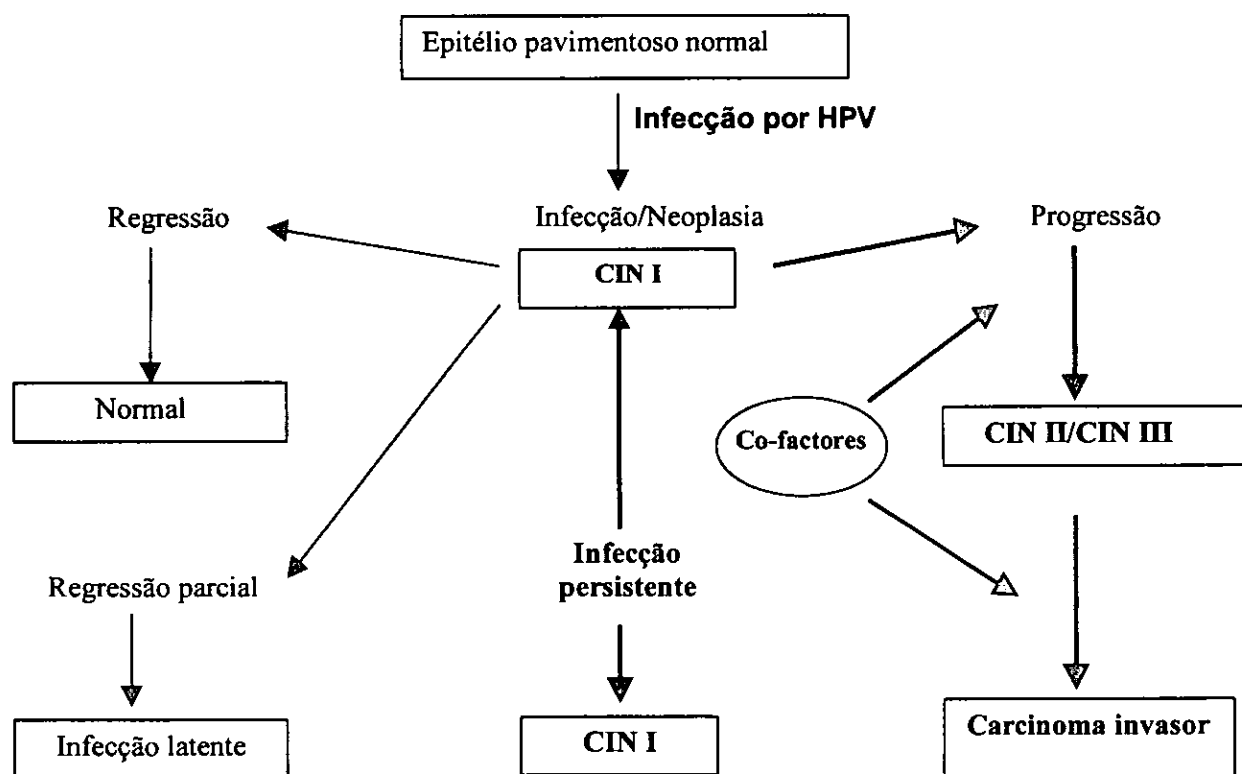
\* adaptado de Villa, 1998

Destacados a preto os tipos mais frequentes no colo uterino.

#### 4. PROGRESSÃO DAS LESÕES *IN SITU* PARA LESÕES INVASORAS

Para além dos aspectos etiopatogénicos que foram focados, continuam por esclarecer as razões que determinam a progressão das lesões *in situ* para uma fase invasora. Cerca de 80% das infecções por HPV são transitórias e as restantes 20% resultam em neoplasia intraepitelial (van Oortmarssen et al, 1991; Evander et al, 1995; Braly, 1996; Meijer, 1998). Apenas uma pequena percentagem das mulheres infectadas com tipos de alto risco de HPV apresenta neoplasia intraepitelial persistente e progride para carcinoma invasor. Por um lado a persistência das lesões *in situ* associa-se à persistência da infecção por HPV de alto risco (Ho et al, 1995). Por outro lado, o tempo de progressão do carcinoma *in situ* para o carcinoma invasor é longo, de 12 a 13 anos (Gustafsson e Adami, 1989).

Este facto documenta que a integração do vírus no genoma da célula é determinante, mas que são necessários co-factores adicionais e eventos celulares para a carcinogénese cervical (Figura 2). Alguns co-factores já foram atrás descritos, dos quais se destacam a persistência da infecção, alta carga viral e o aumento da idade (Ho et al, 1995), os hábitos tabágicos (Richart et al, 1998), resposta linfoproliferativa diminuída para proteínas E6 e E7 do HPV (Kadish et al, 1997), a imunodeficiência induzida por outros agentes infecciosos, destacando-se o vírus da imunodeficiência humana (HIV), a co-infecção por vírus Herpes simples (HSV) (ter Meulen et al, 1992; Petry et al, 1994; Olsen et al, 1998). Estes co-factores seriam responsáveis por mutações somáticas adicionais que se encontram associadas ao carcinoma invasor. Há referências a alterações cromossómicas (mais frequentemente no cromossoma 1 e menos frequentemente nos cromossomas 3, 5, 6, 11, 13, 17, 18 e 21). Igualmente estão referidas alterações em oncogenes celulares (c-myc e ras) associadas à progressão neoplásica (Park et al, 1995; Mullokandov et al, 1996).



**Figura 2. Mecanismo de carcinogénese por múltiplas etapas a partir do HPV como agente etiológico primário (modificado de Ambros e Kurman, 1990)**



Há evidência que as áreas de maior prevalência de carcinoma do colo uterino coincidem com as de maior prevalência de infecção por HPV (Bosch et al, 1995). No entanto esta caracterização epidemiológica da infecção por HPV em diferentes áreas geográficas, incluindo Moçambique, não está totalmente feita, o que dificulta a identificação dos "HPV-de-risco" através de processos de rastreio populacional.

Parece claro que sem esta informação não irá ser possível elaborar estratégias não só de prevenção como também de intervenção terapêutica, que sejam ao mesmo tempo eficazes, mais económicas e adequadas ao local onde vão ser implementadas. Recentemente, a utilização de vacinas profiláticas e/ou terapêuticas contra a infecção por HPV tem sido apontada como a forma mais promissora de erradicar ou pelo menos controlar a elevada incidência de cancro do colo do útero. Admite-se que a grande maioria dos cancros cervicais poderia ser prevenida com a utilização de uma vacina para os principais tipos oncogénicos de HPV (Schiller e Lowy, 1996; Sherman et al, 1998).

Em países desenvolvidos e com programas de rastreio bem estabelecidos, as vacinas profiláticas e terapêuticas poderiam reduzir o custo não só do rastreio de massas como também do tratamento, já que a terapêutica existente é extremamente cara e na maior parte das vezes de eficácia limitada. Nos países em desenvolvimento, com pobres recursos, com um baixo nível socioeconómico, e com altas taxas de mortalidade por cancro, a utilização de vacinas profiláticas é ainda mais aliciante, já que poderia servir de alternativa eficaz aos programas de rastreio populacional inoportáveis pelo seu elevado custo (Brady, 1996; Schiller e Lowy, 1996).

Por outro lado desconhecem-se as alterações resultantes da integração do genoma vírico nas células epiteliais, nomeadamente em relação à estrutura dos carboidratos, nas lesões préneoplásicas e neoplásicas.

## **5. MUCINAS E CARBOHIDRATOS ASSOCIADOS A MUCINAS NO COLO UTERINO**

O desenvolvimento e a progressão neoplásicas no colo do útero são um processo de múltiplas etapas. Assim, além das alterações descritas no genoma celular, ocorrem também alterações nas estruturas moleculares das células, em particular na estrutura dos carboidratos presentes na sua superfície. Dois grupos de alterações são reconhecidos: 1) a síntese incompleta de cadeias de carboidratos existentes normalmente, com consequente acumulação dos seus precursores; e 2) a neossíntese de estruturas normalmente ausentes nos tecidos normais (Hakomori, 1985; Dennis, 1991; Ho et al, 1993). Estes "antígenos" são descritos como marcadores tumorais e têm sido utilizados no diagnóstico, prognóstico, monitorização e terapêutica do cancro, e são na sua maioria carboidratos (Sell, 1990; Springer, 1984; Ho e Kim, 1995).

### **Aspectos da glicosilação normal**

A glicosilação é de suma importância em processos biológicos de natureza física e química no citoplasma, na membrana e na matriz pericelular e extracelular em geral (Hakomori, 1985). Nas células, estruturas reconhecíveis como "epítopes" de carboidratos, ligam-se aos lípidos e proteínas da membrana, bem como às proteínas das secreções, formando glicolípidos, glicoproteínas de membrana e mucinas.

Os açúcares importantes na construção dos oligossacáridos dos glicolípidos e glicoproteínas são a D-glucose, N-acetilglucosamina, D-galactose, N-acetilgalactosamina, manose, ácido siálico (ácido neuramínico) e L-fucose (Clausen e Hakomori, 1989; Sell, 1990).

Nas glicoproteínas, os monossacáridos ligam-se às proteínas através de uma ponte glicosamina entre a N-acetilglucosamina e a asparagina (ligações-N), ou entre o grupo hidroxil da N-acetilgalactosamina e o átomo de oxigénio dos resíduos de serina ou treonina (ligações-O) (Hakomori, 1985; Sell, 1990; Dennis, 1991).

Este processo é catalizado por numerosas enzimas específicas – as glicosiltransferases – promovendo a ligação de monossacáridos entre si e, portanto, o alongamento da cadeia de carboidratos. Outros factores que influenciam a biossíntese de carboidratos são: a competição de duas ou mais glicosiltransferases para um substrato comum; a cooperação entre enzimas (o produto de uma reacção enzimática é o substrato para a reacção enzimática subsequente); a localização das transferases e dos açúcares em compartimentos específicos do aparelho de Golgi e o seu transporte naquela região (Hakomori, 1985; Dennis, 1991).

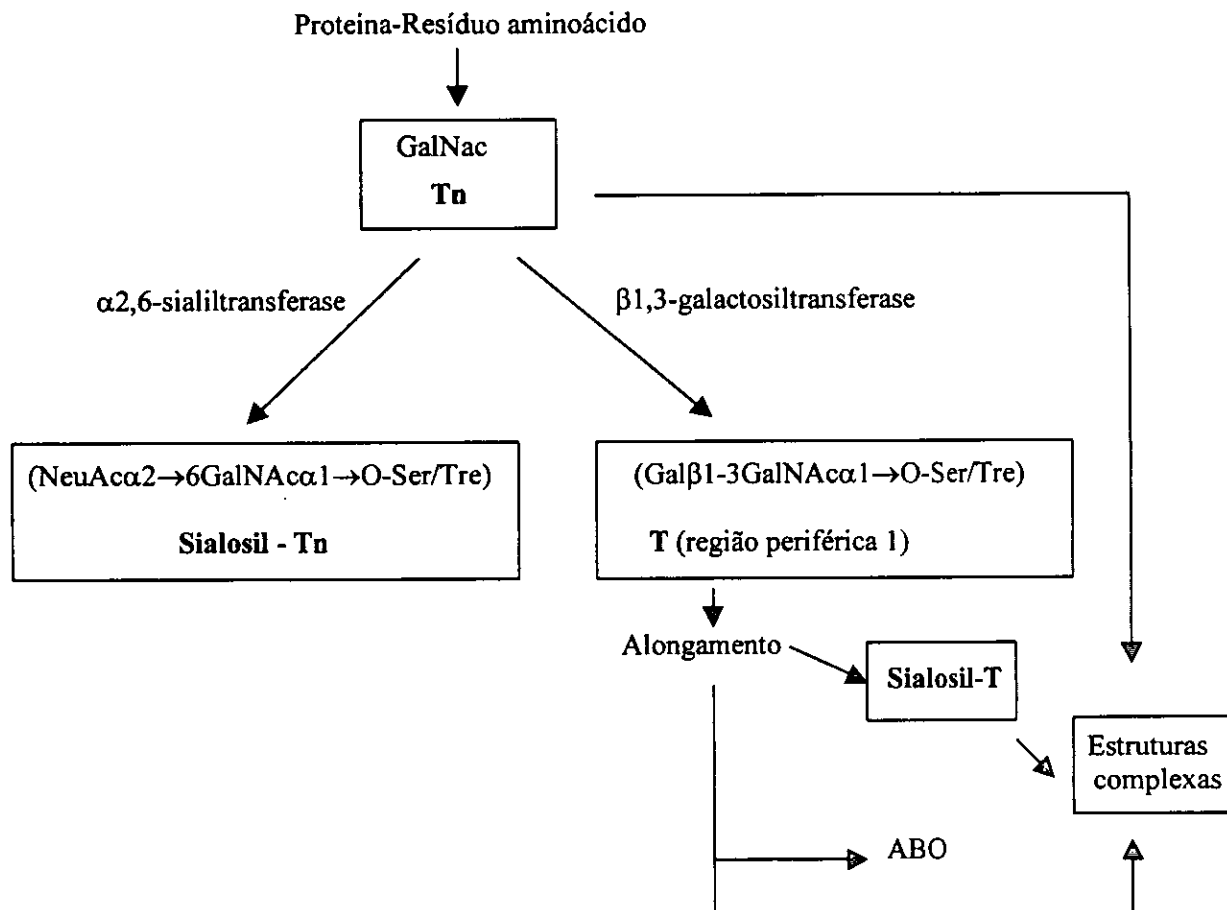
### **Antigénios simples das mucinas – ligações-O**

A glicosilação-O é encontrada predominantemente em mucinas (glicoproteínas de alto peso molecular com regiões altamente glicosiladas, cujo conteúdo em carboidratos varia de 50 a 80%), em glicoproteínas de membrana com o mesmo domínio das mucinas, ou esporadicamente em muitas outras glicoproteínas (Hakomori, 1985). A primeira etapa na síntese de oligossacáridos com ligações-O é a adição da N-acetilgalactosamina com ligação  $\alpha$  ao átomo de oxigénio do grupo hidroxil dos resíduos de serina e treonina presentes na região amino-terminal das proteínas, resultando na formação de um carboidrato de cadeia curta – o antigénio Tn ( $\text{GalNAc}\alpha 1 \rightarrow \text{O-Ser/Tre}$ ) – precursor mais imaturo dos carboidratos simples das mucinas (Springer, 1984).

Uma vez sintetizado, a glicosilação subsequente do antigénio Tn prossegue por diferentes vias, catalizadas por glicosiltransferases específicas (Figura 3). Na primeira via, a adição de um ácido siálico através de uma  $\alpha 2,6$ -sialiltransferase forma o antigénio Sialosil-Tn ou STn ( $\text{NeuAc}\alpha 2 \rightarrow 6\text{GalNAc}\alpha 1 \rightarrow \text{O-Ser/Tre}$ ). Esta estrutura não sofre subsequente glicosilação. Numa segunda via pode ocorrer alongamento da cadeia do antigénio Tn por ligação deste a uma galactose, sob acção duma  $\beta 1,3$ -galactosiltransferase, resultando na formação do antigénio de Thomsen-Friedenreich ou antigénio T ( $\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}\alpha 1 \rightarrow \text{O-Ser/Tre}$ ) (Kjeldsen et al, 1988; Clausen e Hakomori, 1989; Itzkowitz et al, 1989). Este dissacárido forma a parte mais periférica da cadeia dos carboidratos que pode prosseguir na glicosilação, ligando-se ou ao ácido siálico e formando o antigénio Sialosil-T (ST), ou por acção de fucosiltransferases ligando-se aos determinantes antigénicos do grupo sanguíneo ABO. Outras vias de glicosilação do Tn podem ocorrer (não representadas na figura) dando lugar a estruturas mais complexas e a cadeias mais longas (Itzkowitz et al, 1989).

Os antigénios Tn, STn, e T estão assim geralmente mascarados no tecido normal pelo ácido siálico e/ou alongados e ramificados devido à ligação covalente com outros resíduos de açúcares, tais como os determinantes antigénicos do grupo sanguíneo ABO, formando as cadeias de tipo 3 presentes na parte mais periférica dos carboidratos (Springer, 1984; Clausen e Hakomori, 1989). Assim, estes antigénios representam os produtos iniciais mais imaturos da glicosilação-O.

Já que estas estruturas são fortemente imunogénicas, o uso de anticorpos monoclonais específicos tem possibilitado o estudo do padrão de glicosilação normal e alterado em situações patológicas (Itzkowitz et al, 1989; Dennis, 1991).



**Figura 3. Esquema simplificado da biossíntese de mucinas e glicoproteínas de tipo mucinas** (modificado de Itzowitz et al, 1989)

O padrão de **glicosilação normal** nos epitélios está relacionado com a maturação e diferenciação. No epitélio normal do colo do útero, o padrão de glicosilação é diferente nas células escamosas metaplásicas da zona de transformação em relação ao epitélio escamoso nativo. Esta variação de expressão de carboidratos no epitélio metaplásico pode ser importante no desenvolvimento dos carcinomas nesta área. Adicionalmente, já que os carboidratos são importantes para a adesão de microorganismos, alterações nos carboidratos da superfície das células poderão facilitar a adesão e/ou penetração de vírus. Esta poderá ser uma das razões pela qual as células metaplásicas da zona de transformação do colo uterino são mais susceptíveis à infecção viral, nomeadamente à infecção por HPV (Teglbjaerg et al, 1991).

A **glicosilação aberrante** tem sido frequentemente associada à transformação neoplásica, resultando na síntese incompleta de cadeias de carboidratos e consequente acumulação dos seus precursores. A expressão dos determinantes antigénicos A e B do grupo sanguíneo ABO está significativamente diminuída ou ausente em lesões pré-neoplásicas e neoplásicas, particularmente em tecidos epiteliais tais como epitélio oral, laríngeo, endometrial e do colo do útero (Sakamoto et al, 1986; Dabelsteen et al, 1988; Mandel et al, 1991; Teglbjaerg et al, 1991; Sternesen et al, 1992).

Ultimamente tem sido depositado maior interesse no estudo dos antígenos do grupo TTn, (T, Tn e Sialosil-Tn) já que frequentemente estes antígenos são expressos em câncros e lesões pré-neoplásicas e fracamente expressos ou ausentes nos tecidos normais (Kjeldsen et al, 1988; Itzkowitz et al, 1989; Inoue et al, 1991; Inoue et al (b), 1991; Mandel et al, 1991; David et al, 1992; Langkilde et al, 1992; Stenersen e Dabelsteen, 1992; Ikeda et al, 1993; Osako et al, 1993; Carneiro et al, 1994; Schmitt et al, 1995 e 1998; Terasawa et al, 1996).

Poucos estudos têm sido feitos em relação à expressão dos antígenos de carboidratos das mucinas no câncro do colo uterino e ao seu papel na invasão e metastização. Yonezawa et al (1992) documentam que apenas em 1 de 17 casos houve expressão fraca de Sialosil-Tn (STn) no epitélio escamoso cervical normal. Um estudo posterior descreve o STn como um antígeno associado à cancerização no colo uterino, já que foi fracamente expresso no epitélio normal e fortemente expresso nas células neoplásicas do carcinoma pavimentoso (Ogawa et al, 1992). Em 1993, Hirao et al (1993) documentam uma associação significativa entre a expressão de Tn e o potencial metastático das neoplasias do colo uterino. Recentemente, observou-se que a expressão de Tn e STn se comportava como um “marcador” específico da progressão neoplásica do carcinoma *in situ* para o carcinoma invasor e do epitélio normal para o carcinoma *in situ*, respectivamente (Terasawa et al, 1996).

### **Glicoproteínas de membrana de tipo mucinas e colo do útero**

Os maiores “reservatórios” de carboidratos com ligações de tipo O são encontrados em mucinas e glicoproteínas com domínios de mucinas, em especial glicoproteínas de membrana. Na epiderme o maior reservatório são as isoformas de CD44, também descritas no epitélio da cavidade oral e na camada basal do exocervix (Nielsen et al, 1997). O MUC 1 (também designado por Episialina, EMA, PEM e antígeno MAM-6) é uma mucina ligada à membrana, expressa predominantemente em epitélios secretores (tal como o da mama) (Hilkens et al, 1992; Verma e Davidson, 1994), que é fracamente expressa no epitélio do colo uterino.

Já que no epitélio do exocervix a glicosilação-O é abundante nas camadas suprabasais é de acreditar que glicoproteínas adicionais com domínios de mucinas, que não o MUC1 e as variantes de CD44, possam existir neste epitélio (Nielsen et al, 1997).

Foi identificada recentemente por Nielsen et al (1997) através de anticorpos monoclonais, uma glicoproteína de alto peso molecular de tipo mucina (gp230), que parece ser o maior “reservatório” de glicanos-O no epitélio exocervical. Esta glicoproteína é expressa em tecidos concomitantemente com citoqueratinas 4/13. Nas lesões pré-malignas e malignas invasoras do colo do útero, a expressão de gp 230 encontra-se significativamente alterada, com diminuição ou mesmo ausência de expressão (Nielsen et al 1997).

Estes dados sugerem que a gp 230 é possivelmente um marcador tumoral e poderá ser útil no diagnóstico do câncro do colo do útero.

## 6. SCHISTOSOMÍASE E CANCRO DO COLO UTERINO

A schistosomíase tem sido apontada como candidata a co-factor adicional na carcinogénese no colo do útero em áreas onde é endémica (Schwartz e Hyg, 1984; Feldmeier e Krantz, 1993; Feldmeier et al, 1996). A schistosomíase é uma doença parasitária comum que ocorre em muitos países tropicais e subtropicais, e afecta cerca de 10% da população mundial. A schistosomíase é endémica na maior parte dos países do continente africano, incluindo Moçambique (Traquinho et al, 1994 e 1998).

A infecção é adquirida através da pele, a partir de águas contaminadas com cercárias de schistosoma. Três espécies predominantes têm sido descritas como responsáveis pela infecção no Homem. Destas três, a que mais consistentemente tem sido associada ao desenvolvimento neoplásico é a do *Schistosoma haematobium*, causador de lesão primária no aparelho genitourinário. Acredita-se que a infecção por *Schistosoma haematobium* está fortemente associada com o desenvolvimento do carcinoma pavimentoso da bexiga, predominantemente em áreas hiperendémicas (Feldmeier e Krantz, 1993; Parkin et al, 1994; Badawi et al, 1995; Bedwani et al, 1998) e eventualmente com o carcinoma da próstata em indivíduos com menos de 30 anos de idade (Cohen et al, 1995).

Sugere-se que o efeito oncogénico se relaciona com a irritação física contínua do epitélio, associada à inflamação crónica e aos produtos dela libertados, desencadeada pela presença dos ovos do parasita na bexiga. Estes factores estão associados a danos genéticos nas células, entre eles mutações da p53 e instabilidade de microssatélites, identificados em indivíduos com schistosomíase (Badawi et al, 1995; Cooper et al, 1997). Co-factores adicionais estão descritos, tais como produtos do tabaco e nitrosaminas libertadas na urina do paciente (Badawi et al, 1995; Bedwani et al, 1998).

A infecção do aparelho genital feminino ocorre em cerca de 50% das mulheres infectadas por *Schistosoma haematobium*, das quais cerca de 75% envolvem a vulva, a vagina e o colo do útero (Feldmeier e Krantz, 1993; Feldmeier et al, 1995).

Tem por isso sido levantada a possibilidade de uma associação da schistosomíase *haematobium* com o cancro do colo do útero, em áreas onde ela é endémica (Schwartz e Hyg, 1984; Feldmeier et al, 1995 e 1996), embora os resultados de vários estudos não tenham encontrado uma relação significativa entre estes dois factos (Szela et al, 1993; Moubayed et al, 1995 e 1994).

Adicionalmente tem sido levantada a possibilidade de uma associação patogénica entre o HPV e a schistosomíase no carcinoma do colo do útero (Feldmeier et al, 1996). No entanto nos poucos estudos realizados até hoje não se encontrou associação entre o HPV e a schistosomíase no carcinoma do colo do útero (Szela et al, 1993; Moubayed et al, 1995), como está descrito no carcinoma pavimentoso da bexiga (Cooper et al, 1997).

## **7. OBJECTIVOS**

Em resumo, tendo em conta que: 1) o carcinoma do colo do útero é a segunda neoplasia maligna mais frequente na mulher em todo o mundo; 2) o carcinoma do colo do útero é a neoplasia maligna mais frequente na mulher adulta em Moçambique; 3) o HPV parece ser o factor determinante na transformação neoplásica; 4) apesar de não haver qualquer estudo publicado em relação a Moçambique, há a convicção de que o carcinoma do colo do útero é diagnosticado em estádios avançados; 5) o carcinoma do colo do útero pode ser prevenido através de um rastreio de massas; pretendemos com este estudo contribuir para avançar no conhecimento da etiopatogenia do cancro do colo do útero em Moçambique.

### **Objectivos específicos**

1. Determinar a frequência de infecção por HPV nos carcinomas do colo do útero numa população de Moçambique; determinar a frequência relativa dos tipos oncogénicos mais comuns de HPV.
2. Determinar a frequência de schistosomíase nos carcinomas do colo do útero numa população de Moçambique.
3. Definir o perfil de expressão dos antígenos simples das mucinas (Tn, Sialosil-Tn, T, Sialosil-T) e da glicoproteína gp230 no epitélio do colo uterino normal e em lesões displásicas e neoplásicas, prestando particular atenção à eventual associação entre a expressão antigénica e a transformação e progressão neoplásicas.
4. Estudar a expressão dos antígenos referidos em 3. nos carcinomas invasores, no sentido de avaliar se as alterações de expressão destes antígenos se associam à infecção por HPV (ou por algum dos tipos específicos de HPV).
5. Comparar as características anátomo-patológicas, o perfil glicoproteico, a presença de infecção por HPV e a presença de schistosomíase em carcinomas invasores.

## II. MATERIAL E MÉTODOS

---

### 1. MATERIAL

Foram estudadas 57 amostras de neoplasias epiteliais do colo uterino, diagnosticadas no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Central de Maputo durante o ano de 1996. Estas amostras correspondiam a carcinomas invasores (n = 47) e a lesões displásicas graves/carcinomas *in situ* (n = 10). Procedeu-se ainda ao estudo de amostras de colo uterino normal (n = 10). Em 16 casos dispunhamos de peças operatórias (3 carcinomas invasores, 3 lesões displásicas graves/carcinomas *in situ* e 10 colos uterinos normais), e em 51 casos (44 carcinomas invasores e 7 lesões displásicas graves/carcinomas *in situ*) apenas dispunhamos de material de biópsia. Do total das 67 amostras estudadas, 63 pertenciam a pacientes de raça negra (44 carcinomas invasores, 10 lesões displásicas graves/carcinomas *in situ* e 10 colos uterinos normais). Dos restantes 4 casos (todos de carcinomas invasores), dois casos correspondiam a doentes de raça branca e mista, e não se conhecia a raça dos doentes nos outros dois casos.

### 2. MÉTODOS

Dados relativos às idades das doentes foram obtidos das requisições dos pedidos de exame anátomo-patológico.

#### 2.1. Estudo histológico

Todo o material estudado foi previamente fixado em formol a 10% , processado segundo os métodos de rotina e incluído em blocos de parafina. Os cortes obtidos (4 µm de espessura), foram corados com hematoxilina de Mayer e eosina. Nos 57 casos incluídos no presente trabalho o material biopsado continha tumor em quantidade suficiente para estudo histológico, imunocitoquímico e molecular.

Procedeu-se a:

*Classificação histológica* das lesões neoplásicas (invasoras e intraepiteliais), segundo as recomendações da Organização Mundial da Saúde - OMS (Scully et al, 1994).

*Graduação da diferenciação* das lesões neoplásicas invasoras, segundo critérios do Instituto de Patologia das Forças Armadas - AFIP (Kurman et al, 1992).

*Categorização do infiltrado inflamatório* em ausente/mínimo e moderado/marcado, e em linfocítico, neutrofílico e eosinofílico (consoante o tipo de célula predominante).

*Pesquisa de schistosomíase*, através da identificação de vermes adultos e/ou ovos de Schistosoma.

#### 2.2. Estudo imunocitoquímico

##### *Anticorpos*

Foram usados anticorpos monoclonais com especificidades bem definidas "para" os antígenos simples das mucinas, ligados aos grupos hidroxil dos amino ácidos serina e treonina (Tn, Sialosil-Tn, T e Sialosil-T), bem como "para" uma glicoproteína de membrana, provavelmente uma nova mucina, recentemente descrita no epitélio pavimentoso do colo uterino (gp230). As especificidades destes anticorpos, bem como os seus isotipos e a fonte de obtenção, encontram-se descritos na Tabela 4. Todos os anticorpos foram usados como sobrenadantes de culturas em diluições especificadas na Tabela 4. Para a detecção do antígeno Sialosil-T foi usado o anticorpo dirigido para o antígeno T após tratamento dos cortes com a enzima neuraminidase. Foi usada a presença de Sialosil-T nos eritrócitos como controlo positivo interno dos cortes pré-tratados com neuraminidase.

**TABELA 4. Estrutura dos epítopes e descrição dos anticorpos usados**

Antígeno	Estrutura	Anticorpo (isotipo)	Diluição	Fonte
Tn	GalNAc $\alpha$ 1→O-Ser/Tre	HB-Tn (IgM)	1:15	Dako (Copenhaga, Dinamarca)
Sialosil-Tn	NeuAc $\alpha$ 2→6GalNAc $\alpha$ 1→O-Ser/Tre	HB-STn (IgG1)	1:8	Dako (Copenhaga, Dinamarca)
T	Gal $\beta$ 1→3GalNAc $\alpha$ 1→O-Ser/Tre	HB-T (IgM)	1:10	Dako (Copenhaga, Dinamarca)
gp 230	Glicoproteína de membrana	PANH4 (IgM)	1:10	Nielsen et al, 1997

***Procedimento imunocitoquímico***

Foram feitos cortes seriados de 4 $\mu$ m de espessura do mesmo material usado para estudo histológico, previamente fixado em formol a 10% e incluído em parafina. Os cortes foram colocados em lâminas tratadas com gelatina, para evitar o seu descolamento.

O procedimento imunocitoquímico foi realizado segundo o método do complexo Avidina-Biotina-Peroxidase - ABC (Hsu et al, 1981):

***Desparafinação, hidratação e pré-tratamento com neuraminidase***

Todos os cortes foram desparafinados. Os cortes destinados ao pré-tratamento com neuraminidase foram lavados em água destilada e incubados com neuraminidase de *Clostridium perfringens* tipo VI (Sigma), diluído em tampão acetato de Sódio 0,2M, pH 5,5, para uma concentração final de 0,1U/ml. A incubação (em estufa a 37°C, durante duas horas) foi seguida de três lavagens em água destilada fria. Os cortes para os restantes anticorpos foram ainda rehidratados em álcool a concentrações decrescentes.

***Bloqueio da actividade da peroxidase endógena***, colocando os cortes numa solução de peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 3% em metanol absoluto, durante 10 minutos, e lavagem posterior duas vezes em solução salina tamponada de TRIS (TBS), pH 7,6.

***Incubação com soro normal não imune***, soro normal de coelho (Dako, Copenhaga, Dinamarca) com uma diluição de 1:5 em solução de albumina sérica bovina (BSA) a 10% em TBS, durante 20 minutos em câmara húmida à temperatura ambiente, para eliminar ligações inespecíficas. O excesso de soro foi removido soprando sobre as lâminas.

***Incubação com os anticorpos primários*** (descritos na Tabela 4), em câmara húmida a 4° C, durante cerca de 18 horas, seguida de duas lavagens em TBS.

***Incubação com anticorpo secundário biotinilado***, anticorpo de coelho anti-ratinho biotinilado (Dako, Copenhaga, Dinamarca) com uma diluição de 1:200 em solução de BSA a 5% em TBS, em câmara húmida a temperatura ambiente, durante 30 minutos, seguida de duas lavagens em TBS.

***Incubação com o complexo avidina-biotina-peroxidase*** (Dako, Copenhaga, Dinamarca), 1 $\mu$ l de avidina e 1 $\mu$ l de biotina-peroxidase em 100 ml de BSA a 5% em TBS, em câmara húmida durante 30 minutos, seguida de duas lavagens em TBS.

***Revelação da reacção com DAB (3,3' tetracloroeto de diaminobenzidina)***, numa concentração de 1 mg/ml, preparada com uma solução tamponada de Tris/HCl 0,05 M, pH 7,6 contendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 1%, em câmara húmida a temperatura ambiente, durante 7 minutos; o *contraste nuclear* foi feito com hematoxilina de Mayer durante 1 minuto.



*Desidratação*, com álcool a concentrações crescentes e *montagem* das lâminas.

Todas as séries incluíram controlos positivos. Controlos negativos foram obtidos usando anticorpo monoclonal de rato com especificidade irrelevante, da mesma subclasse e na mesma concentração que os anticorpos primários respectivos.

#### ***Avaliação da imunoreactividade***

Foram considerados positivos todos os casos com células imunorreactivas. Procedeu-se à classificação dos casos positivos de forma semi-quantitativa: + = raras células imunorreactivas (< 5%); ++ = áreas bem definidas mas mínimas de imunoreactividade (5-25%); +++ = áreas bem definidas de imunoreactividade ( $\geq 25 < 75\%$ ); ++++ = áreas extensas de células imunorreactivas ( $\geq 75\%$ ).

Procedeu-se também à classificação quanto à localização da imunoreactividade em citoplasmática (granular ou difusa) e membranar.

### **2.3. Estudo Molecular**

Foram estudadas as mesmas amostras descritas nos estudos histológico e imunocitoquímico (47 carcinomas invasores, 10 lesões de CIN III e 10 colos normais), incluídas em parafina.

#### ***Extracção de ADN***

Foram efectuados 2 a 4 cortes (5  $\mu\text{m}$  de espessura) de cada amostra, dependendo do seu tamanho. Foram tomadas precauções para minimizar a contaminação (limpeza da faca de micrótomo com xilol, após cada corte; cortes de casos alternados com cortes de parafina em branco). Estes cortes foram colocados em tubos eppendorf sob condições estéreis, aos quais foram adicionados 150  $\mu\text{l}$  de uma solução de digestão tamponada, contendo 0,01 M de Tris-HCl (pH = 8,0); solução detergente Tween 20 a 0,45%; e 0,1 mg/ml de proteinase K (10 mg/ml). Foi efectuada uma centrifugação inicial de 5 minutos a 14000 rotações/minuto (rpm). As amostras foram incubadas a 56°C durante a noite, seguida de inactivação da proteinase K a 96°C durante 10 minutos e nova centrifugação durante 4 minutos a 14000 rpm para remover resíduos. Para realizar a reacção de PCR foram retirados 10  $\mu\text{l}$  do preparado contido em cada tubo eppendorf.

#### ***PCR para actina***

Para testar a qualidade do ADN das amostras, foi realizada a reacção PCR com "primers" específicos para actina, para amplificar um produto final de 200 pares de bases (pb). Os "primers" foram usados a uma concentração de 50 pmol cada, em 25  $\mu\text{l}$  de uma solução de PCR contendo 500 mM KCl/ 15 mM MgCl<sub>2</sub>/ 100 mM Tris-HCl, (pH=9,0); 200  $\mu\text{M}$  de cada DNTP e 1U da enzima Taq DNA Polimerase (Pharmacia Biotech). A reacção de PCR foi realizada em 40 ciclos num processador Perkin-Elmer 2400 e correspondeu a 1 minuto de desnaturação a 94°C, 2 minutos de emparelhamento a 40°C e 1,5 minutos de extensão a 72°C. Uma etapa de desnaturação inicial foi feita a 4 minutos/ 94°C, e outra de extensão final a 10 minutos/72°C. Usou-se água destilada e ADN de placenta humana como controlos negativo e positivo, respectivamente. Os produtos de PCR foram corridos num gel de agarose a 2% contendo brometo de etídio (2  $\mu\text{g/ml}$ ) e visualizados num transiluminador com UV.

Apenas as amostras que amplificaram para actina foram submetidas a PCR para detecção de HPV.

### ***PCR para detecção de HPV***

Para a detecção de HPV por PCR foi usada uma combinação de dois “primers” universais GP5+/GP6+, este último biotinilado (bio-GP6+) (Eurogentec – Liege, Bélgica). Esta combinação de “primers” amplifica um fragmento de 150 pb da região L1 do vírus e permite detectar um largo espectro de tipos de HPV mucosotrópicos (14 tipos de alto risco e 6 de baixo risco) (Jacobs et al, 1997). As condições e o procedimento de PCR foram semelhantes aos descritos para a actina, à excepção da concentração dos “primers”, neste caso de 25 pmol cada um. Como controle positivo e negativo foi usado ADN extraído da linha celular SiHa infectada com HPV16 e água destilada, respectivamente. Para minimizar a contaminação e evitar falsos-positivos, controles negativos de cada amostra (obtidos de blocos de parafina em branco e cortados após cada uma das amostras) foram colocadas alternadamente entre cada caso. Os produtos obtidos foram corridos em gel de agarose a 2%, como atrás descrito. Foram posteriormente retirados 5 µl dos produtos de PCR para EIA (Enzyme immunoassay).

### ***EIA para detecção de tipos específicos de HPV***

O procedimento da EIA foi realizado segundo o descrito na literatura (Jacobs et al, 1996) e esquematizado na Figura 4. Resumidamente, a EIA foi realizada em microplacas revestidas por estreptavidina (Boehringer-Mannheim). Entre cada etapa foram realizadas lavagens manuais com solução tampão de hibridização (1 X SCC/0,5% de Tween 20). Foram adicionados às placas 5 µl de cada produto de PCR biotinilado obtido com “primers” universais, os quais foram *capturados* em poços revestidos por streptavidina. Em seguida adicionaram-se 50 µl de solução tampão de hibridização. As placas foram incubadas a 37°C durante 1 hora, seguida de 3 lavagens. Foi realizada uma etapa de *desnaturação* durante 15 minutos à temperatura ambiente, para a qual foram adicionados 100 µl de NaOH a 0,2 N em cada poço, seguida de mais 3 lavagens.

Para a *hibridização*, adicionaram-se sondas específicas para HPV 16 e 18 e um “cocktail” 31/33/35/45, marcadas com digoxigenina (Eurogentec – Liege, Bélgica). O “cocktail” 31/33/35/45 foi usado apenas nos casos negativos para HPV 16 e 18. Estes dois tipos foram pesquisados em todos os casos. As sondas foram usadas a uma concentração de 10 pmol/ml cada contidas em 50 µl de solução tampão de hibridização. Após 1 hora de hibridização a 37°C, os poços foram lavados 3 vezes. Realizou-se uma nova etapa de incubação com 50 µl do anticorpo anti-digoxigenina-11-ddUTP conjugado com alcalinafosfatase (Boehringer-Mannheim: 150 U/200 µl), numa diluição de 1:10000 µl em 1ml de solução tampão de hibridização. O excesso de anticorpo não ligado foi removido através de 5 lavagens. Foi seguidamente adicionado como substrato quimiofluorescente o p-nitrofenil fosfato (pNPP) (Sigma) numa concentração de 100 µl em 1 mg/ml de tampão TRIS a 0,2 M, seguida de nova incubação a 37°C durante uma hora e durante a noite.

Os resultados foram lidos num leitor de densidade óptica (Hyperion Micro Reader 3), como descrito na literatura (Jacobs et al, 1997).

### ***Análise estatística***

Os resultados foram expressos em percentagens ou médias  $\pm$  desvio padrão. A análise estatística foi feita no programa Epiinfo6, usando os testes do qui-quadrado com a correcção de Yates, Fisher, t de Student e análise de variância. Os valores foram considerados significativamente diferentes quando p foi menor que 0,05 e sugestivamente diferentes quando p foi menor que 0,10. Testes de sensibilidade e especificidade foram usados quando aplicáveis.

# ENZYME IMMUNOASSAY (EIA)

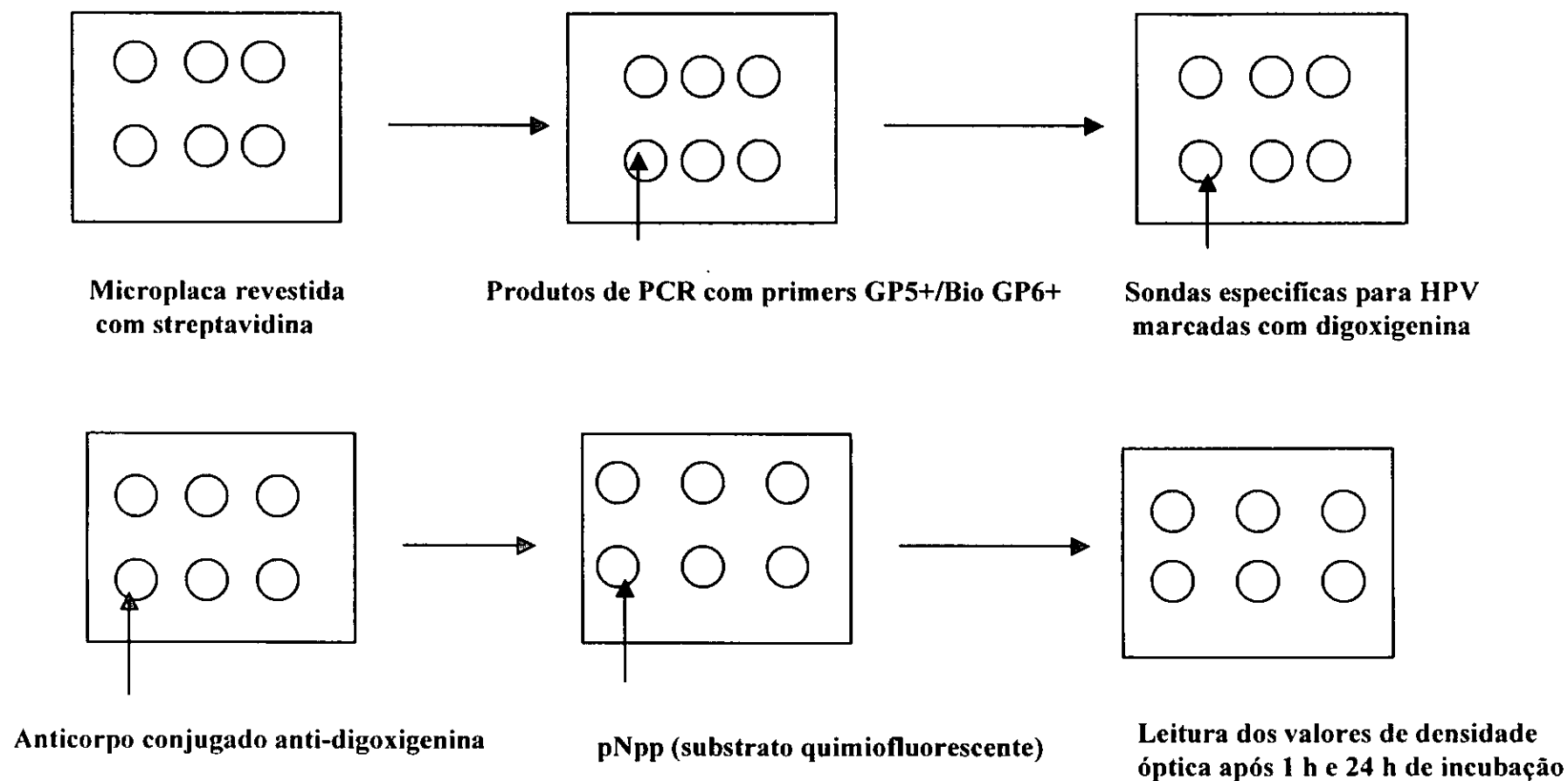


Figura 4 - Ilustração da técnica EIA (Enzyme immunoassay)

### III. RESULTADOS

#### 1. IDADE

Em três casos não foi possível obter informação sobre a idade (1 caso de colo uterino normal, 1 caso de CIN III (displasia grave/carcinoma *in situ*) e 1 caso de carcinoma invasor, respectivamente). Os resultados estão sumarizados na Tabela 5. As lesões de CIN III aparecem mais cedo que os carcinomas invasores, com um intervalo de cerca de 11 anos.

**Tabela 5. Distribuição das idades por histologia**

Descrição histológica	Idade média (anos)	Desvio padrão (anos)	Mediana (anos)	Total de casos
Colo uterino normal	39,9	7,5	40	9
CIN III <sup>a</sup>	37,7	6,8	37	9
Carcinoma invasor	49,1	13,1	47	46

<sup>a</sup> p= 0,014, quando comparada com a idade média das doentes com carcinoma invasor.

#### 2. MORFOLOGIA

##### 2.1. Carcinoma invasor em geral

###### Classificação histológica

No que se refere ao tipo histológico, a maior parte dos casos (n=44; 93,6%) é do tipo pavimentoso. Os restantes 3 casos correspondem a 2 carcinomas adenoescamosos (4,3%) e a 1 adenocarcinoma (2,1%).

###### Grau de diferenciação

Trinta e três dos 44 carcinomas pavimentosos eram moderadamente ou pouco diferenciados (75%), sendo os restantes 11 (25%) bem diferenciados. O adenocarcinoma era moderadamente diferenciado, enquanto os 2 carcinomas adenoescamosos eram moderadamente e pouco diferenciado, respectivamente.

###### Infiltrado inflamatório

Do total dos 47 casos, 35 (74,5%) tinham um infiltrado inflamatório de moderado a intenso, enquanto nos restantes 12 casos (25,5%) o infiltrado era ausente ou mínimo. Quanto ao tipo de infiltrado inflamatório, em 41 casos (87,2%) é linfóide, seguido de neutrofílico em 4 casos (8,5%). Em 2 casos (4,3%) o infiltrado é eosinofílico.

##### 2.2. Carcinoma pavimentoso – comparação dos subtipos histológicos com outras características morfológicas

Do total de 44 carcinomas pavimentosos, metade (n = 22, 50%) eram de grandes células não queratinizantes, 19 (43,2%) pertenciam ao subtipo de grandes células queratinizantes e os restantes 3 (6,8%) eram de pequenas células não queratinizantes.

Os aspectos morfológicos estão sumarizados na Tabela 6. Todos os carcinomas bem diferenciados eram do tipo pavimentoso de grandes células queratinizantes, enquanto a maioria dos carcinomas pouco diferenciados era do tipo grandes células não queratinizantes (82,4%). Todos os carcinomas de pequenas células não queratinizantes eram pouco diferenciados. Apenas os carcinomas queratinizantes eram bem diferenciados.

A maioria (cerca de ¾) dos carcinomas de grandes células queratinizantes ou não queratinizantes tinham infiltrado inflamatório moderado/intenso ao contrário do sucedido nos carcinomas de pequenas células não queratinizantes (2/3 com infiltrado mínimo) (Tabela 6).

Quase todos os casos com infiltrado linfóide predominante eram carcinomas de grandes células queratinizantes ou não queratinizantes (97,4%). Todos os casos com infiltrado inflamatório neutrofílico eram carcinomas não queratinizantes (2 carcinomas de grandes células não queratinizantes e 2 de pequenas células não queratinizantes) e o infiltrado estava associado à presença de necrose tumoral. O infiltrado inflamatório eosinofílico foi predominante em apenas dois casos, ambos do subtipo grandes células queratinizantes. Estes dois casos não apresentavam schistosomíase concomitante. Em nenhum dos carcinomas associados a schistosomíase (n=4) se observou infiltrado eosinofílico.

**Tabela 6. Carcinoma pavimentoso – características histológicas por subtipo histológico**

	GCQ	GCNQ	PCNQ
<b>Grau histológico *</b>			
Bem diferenciado	11 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
Moderad. Diferenciado	8 (50%)	8 (50%)	0 (0%)
Pouco diferenciado	0 (0%)	14 (82,4%)	3 (17,6%)
<b>Infiltrado Inflamatório</b>			
Ausente/mínimo	5 (41,7%)	5 (41,7%)	2 (16,7%)
Moderado/intenso	14 (43,8%)	17 (53,1%)	1 (3,1%)
Linfóide	17 (44,7%)	20 (52,7%)	1 (2,6%)
Neutrófilico	0 (0%)	2 (50%)	2 (50%)
Eosinofílico	2 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
<b>Schistosomíase</b>			
Presente	1 (25%)	3 (75%)	0 (0%)
Ausente	18 (45%)	19 (47,5%)	3 (7,5%)
Total de casos por subtipo	19 (43,2%)	22 (50%)	3 (6,8%)

GCQ – grandes células queratinizante; GCNQ – grandes células não queratinizante; PCNQ – pequenas células não queratinizante.

\*p = 0,00005, quando se compara o grau histológico com o subtipo de carcinoma pavimentoso.

### 3. HPV

Em dezassete casos de um total de 67 (25,4%) não houve amplificação do ADN com “primers” para a actina: 7/10 lesões de CIN III e 10/47 carcinomas invasores (9 carcinomas pavimentosos e o único adenocarcinoma). Estes casos não foram incluídos na análise dos resultados de HPV.

A presença de HPV foi pesquisada nos 50 casos cujo ADN foi amplificado com “primers” para a actina: 10 colos normais, 3 lesões de CIN III e 37 carcinomas invasores (26 carcinomas pavimentosos e 2 carcinomas adenoescamosos). Na Tabela 7 encontram-se resumidos os resultados da detecção de HPV pesquisada por PCR com “primers” GP5+/bio-GP6+.

**Tabela 7. Frequência de HPV em relação com a histologia**

Descrição histológica	HPV – Nº casos (%)	
	HPV-positivos	HPV-negativos
Colo normal (n=10)	0 (0,0)	10 (100,0)
CIN III (n=3)	3 (100,0)	0 (0,0)
Carcinoma invasor (n=37)	26 (70,0)	11 (30,0)

A frequência geral de HPV foi de 100% nas lesões de CIN III e de 70% nos carcinomas invasores. Os 10 colos normais foram HPV negativos. A frequência de HPV no grupo de lesões neoplásicas foi significativamente maior do que no colo normal ( $p < 0,0001$ ). A frequência de HPV foi também significativamente maior nas lesões de CIN III quando comparada com os colos normais ( $p = 0,003$ ), e nas lesões de carcinoma invasor quando comparada com os colos normais ( $p = 0,00007$ ). A frequência de HPV no carcinoma invasor foi menor que nas lesões de CIN III embora a diferença não tenha sido significativa.

Os três casos com lesões de CIN III que revelaram positividade para HPV com os “primers” GP5+/bio-GP6+ não foram positivos para HPV 16, 18 ou 31/33/35/45. Dado o seu reduzido número decidimos excluí-los da análise de tipos específicos de HPV.

#### **HPV e carcinomas invasores**

Os 26 casos positivos para ADN de HPV com GP5+/bio-GP6+ (70%), correspondiam a 25/35 carcinomas pavimentosos (71,4%) e a 1/2 carcinomas adenoescamosos (50%). Usando sondas específicas de tipo, 81% dos casos com HPV foram positivos para HPV 16, 18 ou 31, 33, 35 e 45. O HPV 16 foi o tipo mais frequente (14 casos, 54%), seguido de HPV 31/33/35/45 em 6 casos (23%). O HPV 18 foi positivo apenas em um caso (4%), que correspondeu a 1 carcinoma adenoescamoso. Cinco casos (19%) positivos com GP5+/bio-GP6+ não foram positivos para HPV16, 18 ou 31/33/35/45, e encontram-se descritos no nosso estudo como tipos “não classificados”. Não se observou dupla infecção com HPV 16 e 18.

A figura 5 mostra produtos de amplificação por PCR com “primers” GP5+/bio-GP6+ em gel de agarose, de alguns dos carcinomas invasores.

Resultados relativos aos carcinomas pavimentosos encontram-se resumidos na Tabela 8. Dos 25 carcinomas pavimentosos HPV-positivos, 9 (36%) eram carcinomas de grandes células queratinizantes, 14 (56%) eram de grandes células não queratinizantes e 2 (8%) eram de pequenas células não queratinizantes. Nenhum carcinoma pavimentoso foi positivo para HPV 18. Os carcinomas de grandes células queratinizantes e de pequenas células não queratinizantes foram apenas positivos para HPV 16 e HPV “não classificados”. Os carcinomas de grandes células não queratinizantes tinham os três grupos de HPV (Tabela 8). O grupo HPV 31/33/35/45 foi apenas detectado neste subtipo histológico (Tabela 8).

A idade média das doentes com carcinomas pavimentosos HPV-positivos ( $47,6 \pm 13,6$  anos) não é significativamente diferente da das doentes com carcinomas pavimentosos HPV-negativos ( $45,6 \pm 9,2$  anos). No grupo dos carcinomas HPV-negativos predominam os carcinomas de grandes células queratinizantes ( $n=7$ ) embora se tenham encontrado também alguns carcinomas de grandes células não queratinizantes ( $n=3$ ). Esta distribuição não se afasta no entanto de forma estatisticamente significativa ( $p=0,16$ ) da observada nos carcinomas HPV-positivos (Tabela 8).

Não se observou igualmente associação significativa entre a detecção de HPV (incluindo subtipos específicos) e o grau de diferenciação, nem entre a detecção de HPV e o infiltrado inflamatório (intensidade e tipo de infiltrado), em carcinomas invasores em geral e no grupo de carcinomas pavimentosos em particular.

**Tabela 8. Carcinoma pavimentoso:  
Correlação de aspectos morfológicos com tipos específicos de HPV.**

Características anátomo-patológicas	Tipo de HPV			Total de HPV Positivos
	16	31/33/35/45	Não classificados	
<b>Idade Média <math>\pm</math> desvio padrão (anos)*</b>	43,8 $\pm$ 13,1	57,6 $\pm$ 13,7	46,2 $\pm$ 10,9	47,6 $\pm$ 13,6
<b>Subtipo histológico**</b>				
GCQ	6 (66,7)	0 (0)	3 (33,3)	9
GCNQ	7 (50,0)	6 (42,6)	1 (7,1)	14
PCNQ	1 (50,0)	0 (0)	1 (50,0)	2
<b>Grau histológico</b>				
Bem diferenciado	4 (66,7)	0 (0)	2 (33,3)	6
Moder. diferenciado	6 (66,7)	2 (22,2)	1 (11,1)	9
Pouco diferenciado	4 (40,0)	4 (40,0)	2 (20,0)	10
<b>Schistosomíase</b>				
Presente	1 (100,0)	0 (0)	0 (0)	1
Ausente	13 (54,2)	6 (25,0)	5 (20,0)	24
<b>Total</b>	14 (56,0)	6 (24,0)	5 (20,0)	25

GCQ – carcinoma pavimentoso de grandes células queratinizante; GCNQ – carcinoma pavimentoso de grandes células não queratinizante; PCNQ – carcinoma pavimentoso de pequenas células não queratinizante.

\*  $p = 0,1$ , quando comparada a idade média entre os casos com HPV 16 e os casos com HPV 31/33/35/45.

\*\* Frequência de HPV 31/33/35/45 em carcinomas GCNQ *versus* carcinomas GCQ ( $p = 0,04$ ) ou PCNQ ( $p = 0,09$ ).

Os dois carcinomas adenoescamosos (positivo e negativo para HPV), estavam ambos associados a infiltrado inflamatório linfóide de moderado a intenso. O carcinoma adenoescamoso positivo para HPV (HPV18) era moderadamente diferenciado e o negativo para HPV era pouco diferenciado.

Apenas 1 caso associado à schistosomíase estava presente na série de 37 carcinomas invasores avaliados simultaneamente para a co-existência de schistosomíase e HPV, e correspondia a 1 carcinoma pavimentoso. Neste caso foi detectado HPV 16.



**Figura 5: Gel de agarose de produtos de PCR  
com “primers” GP5+/bio-GP6+ (produto de 150 pb):**  
M – marcador de peso molecular; 1 – SiHa (linha celular infectada com HPV 16 – controle positivo);  
2 – caso 98 (negativo); 3 – controle negativo; 4 – caso 99 (positivo); 5 – controle negativo; 6 – caso  
100 (positivo); 7 – controle negativo.



#### 4. SCHISTOSOMÍASE

Do total das 67 amostras, 11 (16,4%) revelaram presença de schistosomíase, correspondendo a 4 colos normais, 3 lesões de CIN III e 4 carcinomas invasores (Tabela 9). A presença de lesões de schistosomíase foi significativamente mais baixa ( $p=0,02$ ) nos carcinomas invasores do que nos colos "normais" (Tabela 9).

**Tabela 9. Frequência de schistosomíase em relação com a histologia**

Descrição histológica	Schistosomíase – Nº casos (%)	
	Presente	Ausente
Colo normal (n=10)	4 (40,0)	6 (60,0)
CIN III (n=10)	3 (30,0)	7 (70,0)
Carcinoma invasor (n=47)	4 (8,5)	43 (92,0)

#### 5. EXPRESSÃO DE ANTIGÊNIOS SIMPLES DAS MUCINAS E DE GP 230

A expressão dos antígenos Tn, Sialosil-Tn (STn), T, Sialosil-T (ST) e gp 230 encontra-se resumida na Tabela 10.

**Tabela 10. Expressão dos antígenos simples das mucinas e da gp 230 no colo normal, lesões de CIN III e carcinoma invasor – nº de casos positivos (%)**

Descrição histológica	Tn	STn	T	ST	Gp 230
Colo normal	1/10 (10%)	8/10 (80%)	0/10 (0%)	1/10 (10%)	10/10 (100%)
CIN III	3/10 (30%)	9/10 (90%)	0/10 (0%)	0/10 (0%)	5/10 (50%)
Carcinoma invasor	30/47 (63,8%)	31/47 (66%)	0/47 (0%)	24/47 (51,1%)	24/47 (51,1%)

##### 5.1. Epitélio pavimentoso do colo uterino normal (10 casos)

O antígeno Tn foi expresso em apenas 1 caso (10%), no citoplasma de raras células das camadas intermediária e superficial (Figura 6A).

O antígeno STn foi expresso na maioria dos casos ( $n = 8$ ; 80%). A expressão foi focal, em menos de 25% das células (em 4 casos a expressão ocorreu em menos de 5% das células). Em todos os casos a expressão ocorreu em células das camadas intermediária e superficial (Figura 6B). Em um caso houve também expressão em raras células da camada parabasal. A localização celular foi predominantemente membranar.

O antígeno T não foi expresso em nenhum dos casos. Após tratamento com neuraminidase, o antígeno T sialilado (ST) foi expresso no citoplasma de raras células intermediárias (<5%) de apenas 1 caso (10%).

A glicoproteína gp 230 foi forte e difusamente expressa em todos os casos, em pelo menos 75% das células. Esta expressão localizou-se em todas as células das camadas intermediária e superficial. Apenas as células basais e parabais não mostraram expressão em nenhum dos casos. A localização nas células foi exclusivamente membranar (Figura 6C).

### **5.2.CIN III – Displasia grave/carcinoma *in situ* (10 casos)**

O antígeno Tn foi expresso em 3 casos (30%), em menos de 25% das células ("score" ++). A positividade foi observada em células dispersas por todas as camadas, predominantemente em localização citoplasmática difusa. Ocasionalmente observou-se positividade citoplasmática granular em áreas paranucleares (Figura 6D).

O antígeno STn foi expresso em praticamente todos os casos (n = 9; 90%), com padrão focal. Quantitativamente a expressão variou entre 5% a 25% das células ("score" ++), localizando-se no citoplasma e na membrana. As células positivas estavam dispersas por todas as camadas mais homogeneamente que o Tn, predominando nas camadas intermediária e superficial (Figura 6E). A expressão em células parabasais e basais foi mais fraca e ocasional.

Os antígenos T e ST não foram expressos em nenhum dos casos.

A glicoproteína gp 230 foi focalmente expressa em 5 casos (50%), entre 5-25% das células das camadas intermediária e superficial. Como no colo normal, não houve expressão nas células basais e parabasais. O padrão de localização nas células foi também citoplasmática, além de membranar (Figura 6F).

### **5.3.Carcinoma invasor (47 casos)**

Todos os antígenos, à exceção do antígeno T, foram expressos em mais de metade dos casos (Tabela 9). O antígeno Tn foi expresso em 30 casos (63,8%), o STn em 31 casos (66%) e o antígeno ST e a glicoproteína gp 230 em 24 casos (51,1%). O grau de expressão destes antígenos foi no entanto variável, quer quantitativa quer qualitativamente.

O antígeno Tn foi predominantemente expresso em áreas focais, em cerca de 25% das células ("score" ++), quer no centro quer na periferia dos ninhos neoplásicos, com padrão citoplasmático forte e difuso e ocasionalmente também membranar (Figura 7A e B).

O antígeno STn distribuiu-se difusamente nos ninhos de células neoplásicas, predominando em alguns casos no centro. A imunoreactividade foi observada tanto na membrana como no citoplasma (Figura 7C). Na maior parte dos casos o número de células positivas situou-se no "score" ++ (5 - 25%). Em 8 casos, situou-se no "score" +++ ( $\geq 25\% < 75\%$ ) e em 4 casos no "score" ++++ ( $\geq 75\%$  das células).

O antígeno T, à semelhança do observado no colo normal e no CIN III, não foi expresso em nenhum dos casos. Após tratamento com neuraminidase, a distribuição da positividade foi semelhante à observada com o STn (Figura 7D). A maior parte dos casos expressou ST em 5%-25% das células ("score" ++).

A expressão de gp 230 foi sempre focal (em 5% - 25% das células), apenas nas células neoplásicas com melhor diferenciação situadas no centro dos ninhos de células neoplásicas, com padrão membranar e citoplasmático, e nas pérolas córneas dos carcinomas queratinizantes (Figura 7 E e F).

O adenocarcinoma expressou Tn, STn e ST difusamente nas membranas apicais e ocasionalmente no citoplasma das células neoplásicas. Nos dois carcinomas adenoescamosos, identificou-se expressão difusa de Tn e ST nas membranas apicais das áreas de diferenciação glandular, e muito focal nas áreas de diferenciação escamosa. Apenas 1 deles (50%) expressou STn. Nenhum destes três carcinomas com diferenciação glandular expressou gp 230, em contraste com os carcinomas pavimentosos (p = 0,00035).

**Figura 6 (A a F): Expressão de Tn, STn e gp 230 (colo uterino normal e CIN III):**

A – Colo uterino normal. Expressão do antígeno Tn no único caso positivo. Expressão focal nas camadas intermediária e superficial; padrão citoplasmático granular. 400x.

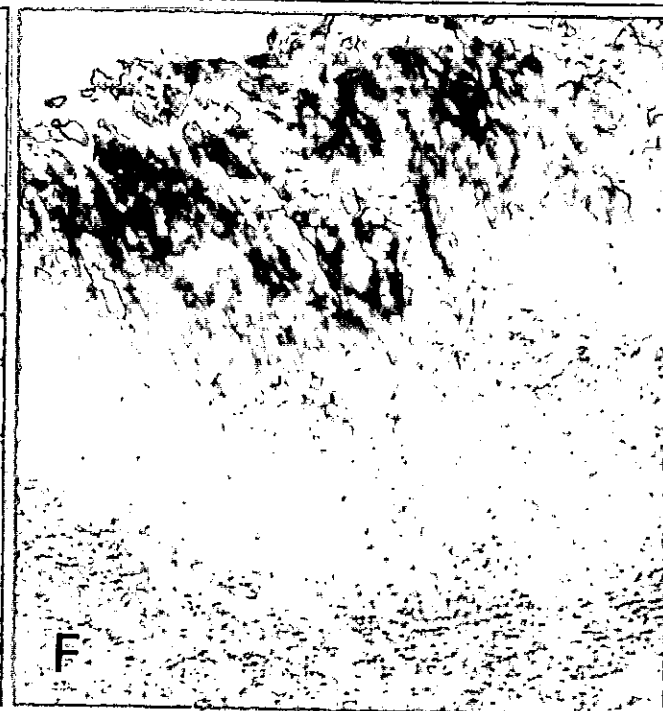
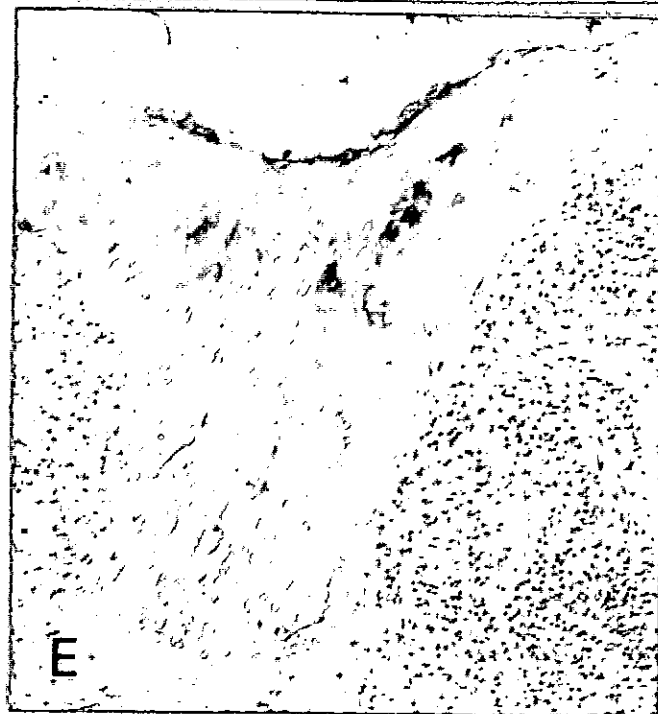
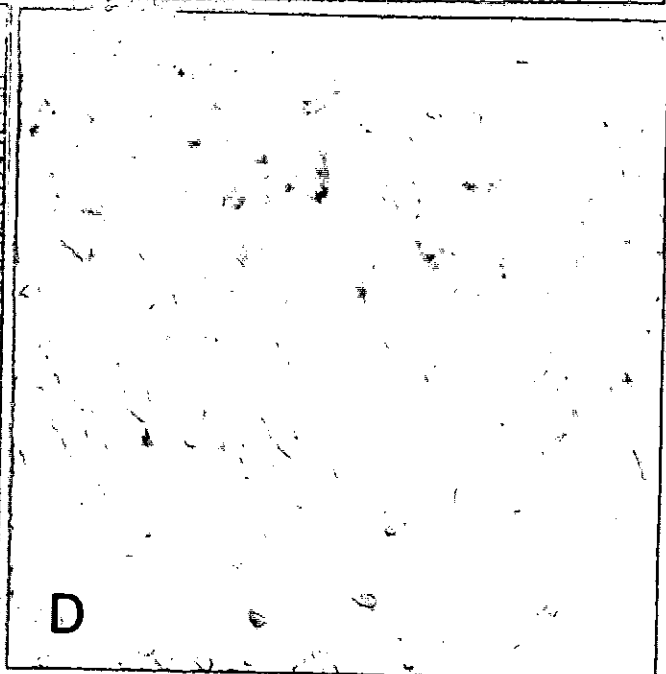
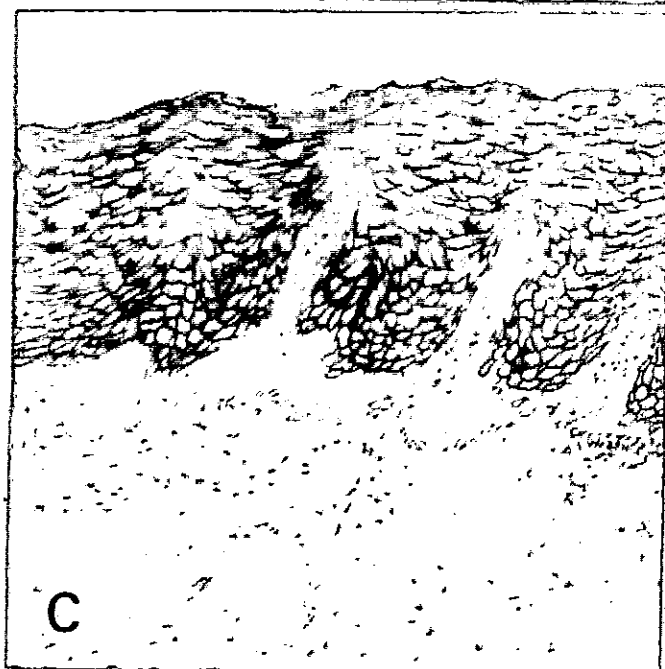
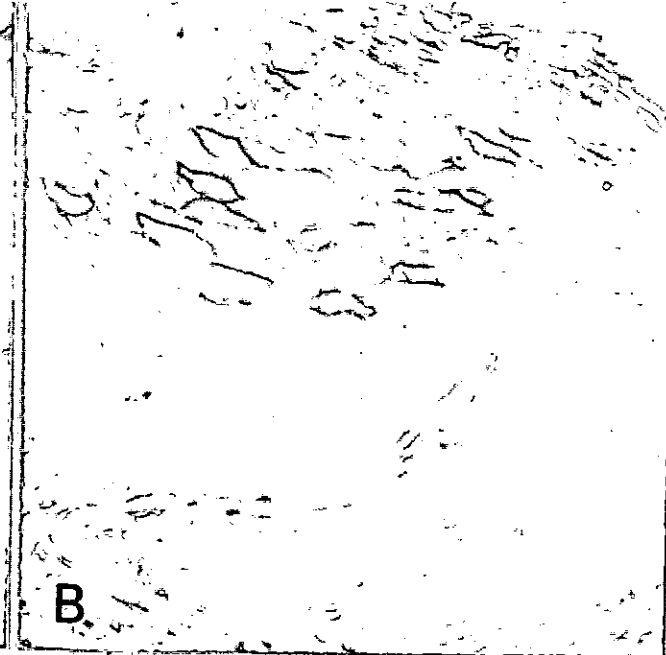
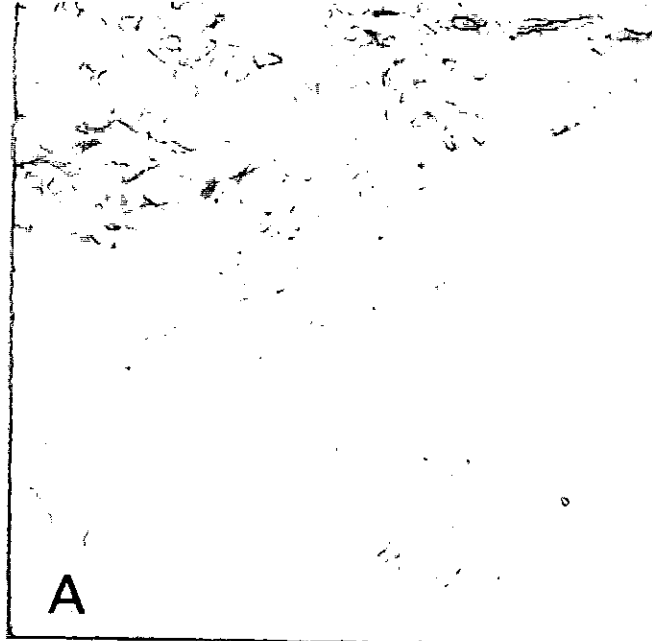
B – Colo uterino normal. Expressão membranar focal de STn nas camadas intermediária e superficial. Note-se a ausência de expressão na camada basal. 200x.

C – Colo uterino normal. Expressão difusa e exclusivamente membranar de gp 230 nas camadas suprabasais. 100x.

D – CIN III. Expressão de Tn dispersa por todas as camadas, num padrão citoplasmático granular perinuclear. 400x.

E – – CIN III. Expressão de STn dispersa por todas as camadas. Expressão membranar e citoplasmática. 100x.

F – CIN III. Expressão de gp 230 nas camadas suprabasais do caso de CIN III com maior expressão. Note-se a aquisição de expressão citoplasmática. 100x.



#### 5.4. Coexpressão dos antígenos simples das mucinas e de gp 230 no carcinoma invasor

24 casos (51,1%) coexpressaram Tn e STn, e 10 casos (21,2%) não expressaram STn e Tn; 7 casos expressaram apenas STn e 6 casos expressaram apenas Tn ( $p = 0,01$ ). Nunca se observou coexpressão de T e ST. A expressão dos diferentes carboidratos das mucinas (Tn, STn e ST) foi independente da presença ou ausência de expressão de gp 230 (Tabela 11).

**Tabela 11. Coexpressão dos antígenos simples das mucinas em carcinomas invasores com e sem expressão de glicoproteína gp 230 (nº casos)**

	NºCasos Tn +	NºCasos STn +	Nº Casos ST +
NºCasos gp 230 + (n=24)	15	18	14
NºCasos gp 230 - (n=23)	15	13	10

#### 5.5. Comparação da expressão dos antígenos simples das mucinas e de gp 230 no carcinoma pavimentoso invasor

Quando analisamos apenas o grupo dos carcinomas pavimentosos, observamos forte associação entre o subtipo histológico e a expressão de gp 230, que foi significativamente superior nos carcinomas de grandes células queratinizantes (89,5%) (Tabela 12). Não se observou imunoreactividade de gp 230 nos carcinomas de pequenas células não queratinizantes. A expressão dos restantes antígenos foi semelhante nos diferentes subtipos histológicos (Tabela 12).

Os resultados são semelhantes aos descritos na globalidade quando se comparam os carcinomas pavimentosos com diferentes graus de diferenciação. Apenas se observaram diferenças significativas para a expressão de gp 230: a expressão diminui quanto menor é o grau de diferenciação - 9/11 casos (90,9%) nos bem diferenciados, 11/16 casos (68,8%) nos moderadamente diferenciados e 3/17 casos (17,6%) nos pouco diferenciados, respectivamente ( $p = 0,0002$ ).

**Tabela 12. Carcinoma Pavimentoso - Expressão dos antígenos simples das mucinas e de gp 230 por subtipo histológico - nº de casos positivos (%)**

Subtipo histológico	Tn	STn	T	ST	Gp 230
GCQ	12/19 (63,2%)	15/19 (78,9%)	0/19 (0%)	11/19 (57,9%)	17/19 (89,5%)
GCNQ	14/22 (63,6%)	13/22 (59,1%)	0/22 (0%)	10/22 (45,5%)	7/22 (31,8%)
PCNQ	1/3 (33,3%)	1/3 (33,3%)	0/3 (0%)	0/3 (0%)	0/3 (0%)
Valor de p	ns	ns	ns	ns	$p = 0,0001$

GCQ – grandes células queratinizante; GCNQ – grandes células não queratinizante; PCNQ – pequenas células não queratinizante. Ns – valor de “p” não significativo

Não se encontrou associação entre a expressão dos diversos antígenos e o infiltrado inflamatório (quer na intensidade, quer no tipo de célula predominante) ou a presença de schistosomiase, nos casos de carcinomas invasores em geral e em casos de carcinomas pavimentosos em particular.

**Figura 7 (A a F): Expressão de Tn, STn, ST e gp 230 (carcinoma pavimentoso invasor):**

A – Expressão forte e difusa de Tn no ninho neoplásico; expressão predominantemente membranar. 200x.

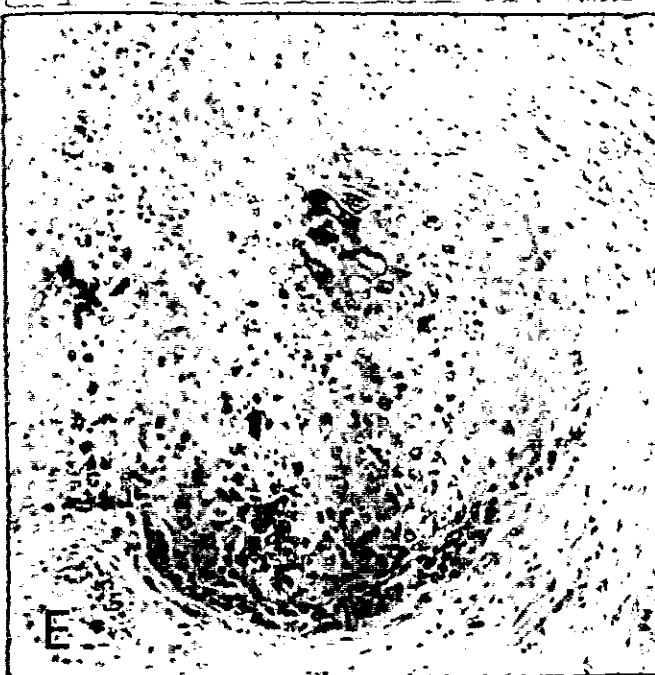
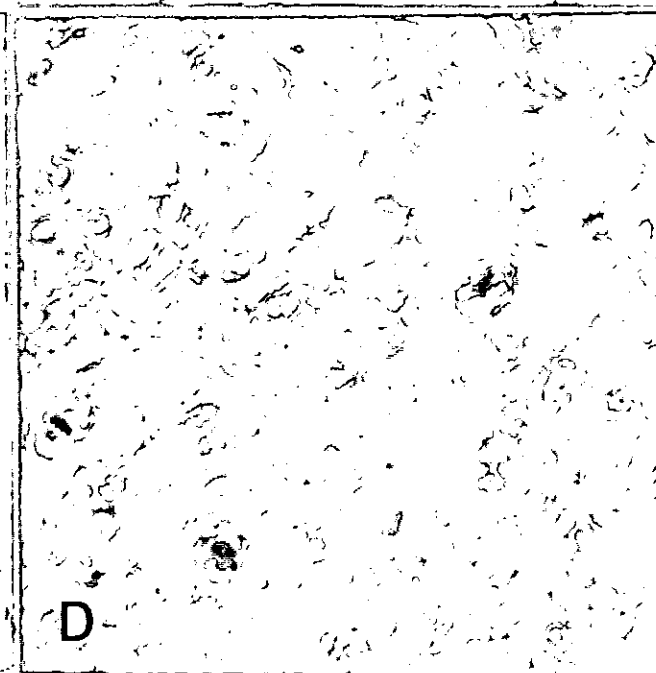
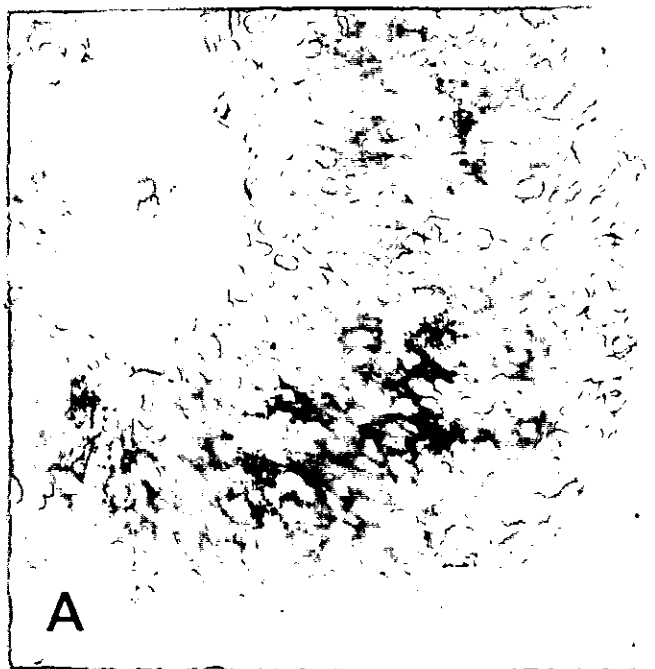
B – Expressão focal de Tn. Note-se a forte expressão citoplasmática. 400x.

C – Expressão difusa de STn no ninho neoplásico. Note-se a aquisição de expressão citoplasmática, além da membranar. 200x.

D – Expressão difusa de ST; padrão predominantemente membranar. 400x.

E – Perda de expressão de gp 230, observando-se positividade em raras células. 100x.

F – Expressão de gp 230 numa pérola córnea em células com queratinização individual, em oposição às áreas menos diferenciadas. Note-se a aquisição de expressão citoplasmática. 200x.



## 5.6. Comparação da expressão de antígenos simples das mucinas e gp 230 no colo normal, lesões de CIN III e carcinoma invasor

Os resultados estão resumidos nas Tabelas 10 e 13.

**Tabela 13. Comparação da expressão de antígenos simples das mucinas e gp 230 no colo normal, lesões de CIN III e carcinoma invasor**

Valores de p entre	Tn	STn	T	ST	Gp 230
Colo normal vs CIN III	ns	ns	ns	ns	0,03
Colo normal vs Carcinoma invasor	0,003	ns	ns	0,03	0,003
Colo normal vs (CIN III + Carcinoma invasor)	0,006	ns	ns	0,07	0,003
CIN III vs Carcinoma invasor	0,07	ns	ns	0,03	ns

ns – valor de “p” não significativo

A expressão do antígeno Tn é rara no colo uterino normal (10%) e aumenta com a gravidade das lesões. Este antígeno é expresso em 30% das lesões de CIN III e em mais de metade dos casos de carcinoma invasor (63,8%) (Tabela 10). A diferença de expressão entre os três grupos de lesões é significativa ( $p = 0,003$ ) (Tabela 10), assim como quando se compara o colo normal com o grupo de lesões neoplásicas ( $p = 0,006$ ) (Tabela 13). Embora não haja diferenças significativas entre a expressão de Tn nas lesões de CIN III e no carcinoma invasor, a expressão de Tn no carcinoma invasor é sugestivamente maior do que nas lesões de CIN III ( $p = 0,07$ ) (Tabela 13).

O STn é expresso em mais de metade dos casos de colo normal e de lesões neoplásicas, não sendo significativa a diferença de expressão (Tabelas 10 e 13).

O T nunca foi expresso em nenhuma das amostras (Tabelas 10 e 13). O ST foi expresso em apenas um caso de colo normal (10%), não é expresso nas lesões de CIN III e é positivo em cerca de metade dos casos de carcinoma invasor (Tabela 10). Esta diferença é significativa quando se compara a expressão de ST no colo normal e nos carcinomas invasores ( $p = 0,03$ ) e entre as lesões de CIN III e o carcinoma invasor ( $p = 0,03$ ) (Tabela 13).

A glicoproteína gp 230 é sempre expressa no colo do útero normal. Esta expressão diminui no grupo das lesões neoplásicas (CIN III e carcinoma invasor) para cerca de metade dos casos ( $p = 0,003$ ) (Tabelas 10 e 13). A expressão de gp 230 é também significativamente maior nos colos normais quando se compara apenas com as lesões de CIN III ( $p = 0,03$ ) (Tabela 13). A diferença de expressão de gp 230 entre as lesões de CIN III e o carcinoma invasor não é significativa (Tabela 13).

## 5.7. Especificidade e sensibilidade dos antígenos simples da mucinas e de gp 230 como marcadores tumorais

O antígeno Tn é expresso mais frequentemente em lesões de CIN III do que no colo normal. Apesar de não haver diferenças significativas na expressão de Tn das lesões de CIN III para o carcinoma invasor, há uma expressão sugestivamente maior nos carcinomas invasores. Quando se compara a expressão no colo normal e no carcinoma invasor, o Tn é um marcador de malignidade, com uma especificidade de 0,96 e uma sensibilidade de 0,34 (Tabela 14).



O antígeno ST é altamente específico como marcador de invasão, observando-se expressão significativamente maior no carcinoma invasor quando comparado com as lesões de CIN III (especificidade de 1 e sensibilidade de 0,30) (Tabela 14). A diminuição de expressão gp 230 inicia-se nas etapas mais precoces de transformação neoplásica, sendo um bom marcador de malignidade, com ou sem invasão (Tabela 14). A presença de gp 230 é ainda um marcador de diferenciação no colo normal e nos carcinomas pavimentosos, altamente específico e sensível. Todos os resultados estão resumidos na Tabela 14.

**Tabela 14. Grau de especificidade e sensibilidade dos antígenos estudados**

	<b>Significado</b>	<b>Especificidade</b>	<b>Sensibilidade</b>
<b>Tn como marcador de carcinoma invasor</b>	Ausência no colo normal e presença no carcinoma invasor	0,96	0,34
<b>ST como marcador de invasão</b>	Ausência no CIN III e presença no carcinoma invasor	1	0,30
<b>Ausência de gp 230 como marcador de malignidade</b>	Ausência no grupo de lesões neoplásicas e presença no colo normal	1	0,26
<b>Ausência de gp 230 como marcador de malignidade precoce</b>	Ausência no CIN III e presença no colo normal	1	0,66
<b>Gp 230 como marcador de diferenciação nos carcinomas pavimentosos</b>	Presença nos carcinomas bem diferenciados	0,43	0,95

#### **5.8. Comparação entre a frequência de HPV e a expressão de antígenos simples das mucinas e da gp 230 nos carcinomas invasores**

Não se observou associação entre a presença de HPV (HPV geral e tipos específicos) e a presença/ausência de expressão de antígenos simples das mucinas (Tn, STn, T e ST) e de gp230 (resultados não apresentados). Quanto à intensidade de imunoreactividade, também não se verificou qualquer associação (resultados não apresentados). No entanto, quanto à citolocalização, observou-se uma maior expressão citoplasmática dos antígenos Tn, STn e ST em casos HPV positivos: 18 dos 20 casos positivos para o Tn e para o HPV tinham expressão citoplasmática deste antígeno (90%); 21/21 casos (100%) para o STn, 14/16 casos (88%) para o ST ( $p=0,04$ ,  $p=0,01$  e  $p=0,07$ , respectivamente). Este achado não estava significativamente relacionado com um tipo específico de HPV (resultados não apresentados).

Não se observou qualquer associação entre a expressão de gp 230, quer com a frequência geral quer com os tipos específicos de HPV.

## IV. DISCUSSÃO

O cancro do colo do útero é a segunda neoplasia maligna mais frequente da mulher em todo o mundo. Oitenta por cento dos casos ocorrem em países em desenvolvimento, dos quais Moçambique faz parte. Dados do registo do cancro indicam que entre o período de 1970 e 1990 o cancro do colo do útero é a neoplasia maligna mais frequente da mulher adulta, responsável por mais de um quarto de todas as neoplasias do sexo feminino diagnosticadas no HCM. Poucos estudos foram realizados em Moçambique com relação ao cancro do colo uterino e documentam uma incidência de carcinomas invasores do colo do útero entre 18,5 e 40 por 100000 mulheres africanas (Prates, 1961; Torres, 1969). Neste estudo tentamos retomar o trabalho iniciado por Prates e Torres, utilizando material de arquivo, complementando o estudo histológico com o estudo imunocitoquímico e molecular, na tentativa de caracterizar factores de causalidade, de transformação e de progressão neoplásicas no colo do útero.

### 1. IDADE

No nosso estudo, a idade média das doentes com lesões de CIN III foi de  $37 \pm 6,8$  anos, menor que a idade média nos carcinomas invasores,  $49 \pm 13,1$  anos. Os nossos resultados são concordantes com os resultados encontrados na maioria dos estudos: as lesões de CIN III são diagnosticadas entre a 2ª e a 3ª décadas de vida (Bosch et al, 1993) enquanto o carcinoma invasor é diagnosticado mais tardiamente entre a 4ª e a 5ª décadas (Neto et al, 1994; Bosch et al, 1995; Koulibaly et al, 1997; Suzuk et al, 1997; Chichareon et al, 1998; Ngelangel et al, 1998). O intervalo de 12 anos entre o diagnóstico de lesões de CIN III e o diagnóstico de carcinoma invasor sugere uma evolução temporal lenta de lesões *in situ* para o estadio invasor.

### 2. MORFOLOGIA DO CARCINOMA INVASOR

De uma maneira geral, a caracterização histológica dos casos da nossa série é similar à caracterização dos carcinomas invasores de outras séries, em relação ao tipo histológico (maior frequência de carcinomas pavimentosos), subtipos histológicos de carcinoma pavimentoso (maior frequência do subtipo de grandes células não queratinizante), grau de diferenciação (predomínio dos graus moderadamente e pouco diferenciados) e presença de infiltrado linfóide (moderado a intenso na maioria dos casos). Estas características têm sido estudadas quanto ao seu significado no prognóstico dos carcinomas invasores do colo do útero. Crissman et al (1985) não encontraram associação entre o prognóstico e o infiltrado inflamatório, o grau de queratinização celular e o grau de diferenciação em 70 carcinomas pavimentosos no estadio Ib. No nosso estudo não pudemos avaliar o significado prognóstico dos vários parâmetros morfológicos por nós analisados devido à informação escassa obtida nos processos clínicos das doentes e devido ao facto de a maior parte das amostras dos nossos casos provir de material de biópsia.

Na nossa série o tipo histológico mais frequente foi o carcinoma pavimentoso (93,6%), representando os carcinomas com diferenciação glandular apenas 6,4%, resultados similares ao descrito na literatura (Fu e Sherman, 1997). A maior frequência de carcinomas pavimentosos está de acordo com a origem dos carcinomas invasores do colo do útero na zona de transformação (Fu e Sherman, 1997).

Frequências mais elevadas de carcinomas com diferenciação glandular foram recentemente referidas por Fu e Sherman (1997) e poderão não significar um verdadeiro aumento desse tipo de neoplasia mas sim uma diminuição da frequência relativa de carcinomas pavimentosos associada à implementação do rastreio por citologia cervico-vaginal.

No entanto, no grupo de carcinomas com diferenciação glandular observámos que a relação entre a frequência de adenocarcinomas e carcinomas adenoescamosos se inverte no nosso estudo. Nós obtivemos uma frequência maior de carcinomas adenoescamosos, em oposição à maioria dos autores, que documentam uma maior frequência de adenocarcinomas puros (Neto et al, 1994; Bosch et al, 1995; Suzuk et al, 1997; Chichareon et al, 1998; Ngelangel et al, 1998). O baixo número de casos da nossa série é a razão mais plausível para interpretar esta discrepância.

Quanto ao grau de diferenciação, a maioria dos carcinomas invasores da nossa série corresponde aos graus moderadamente e pouco diferenciados. Como era de esperar obviamente, o grau de diferenciação correlaciona-se significativamente com o subtipo histológico de carcinoma pavimentoso ( $p= 0,00005$ ). Todos os carcinomas bem diferenciados são queratinizantes, o que está de acordo com o conceito de que uma neoplasia é bem diferenciada quando as células neoplásicas se assemelham às células do tecido normal em morfologia e em função, sendo a função mais diferenciada no caso dos epitélios pavimentosos estratificados a produção de pérolas de queratina (Gombel e Silverberg, 1997).

A maioria dos carcinomas invasores estava associada a um infiltrado inflamatório moderado a intenso, de predomínio linfoide. Dois casos (4,3%) estavam associados a infiltrado eosinofílico predominante. Estes resultados são similares aos valores descritos noutros estudos em carcinomas invasores do colo do útero (van Nagell et al, 1978; Robert e Fu, 1990; Nakamo et al, 1992). A frequência de infiltrado linfoide na nossa série foi de 74,5%, valor maior do que o descrito por van Nagell et al (1978), de 56%. No entanto, tal como nós, este autor não encontrou associação entre a presença de infiltrado linfoide e todos os parâmetros histológicos por nós analisados (tipo histológico, grau de queratinização celular nos carcinomas pavimentosos e grau de diferenciação). Na nossa série a frequência maior de infiltrado linfoide poderá não estar associada a uma resposta imune maior do hospedeiro mas apenas representar uma resposta inespecífica no decurso de uma invasão tumoral eventualmente mais extensa (Davidson et al, 1997). A riqueza em infiltrado linfoide tem sido associada ao prognóstico de carcinomas invasores, em especial os linfócitos T e as células de Langerhans (Nakamo et al 1992; Davidson et al, 1997). Alguns autores referem uma maior taxa de sobrevida aos cinco anos em doentes com carcinoma invasor com intenso infiltrado linfoide no colo do útero (Nakamo et al, 1992) tal como no estômago (Watanabe et al, 1976). Da mesma forma, a sobrevida parece ser melhor nos raros casos associados ao infiltrado inflamatório eosinofílico (Robert e Fu, 1990). Nos casos por nós estudados não foi possível avaliar o papel do infiltrado inflamatório estromal na sobrevida dos doentes já que não dispunhamos de informação sobre o "follow-up" dos nossos casos.

### **3. FACTORES DE CAUSALIDADE**

#### **3.1. HPV**

Está bem documentado que o HPV é o factor causal determinante do carcinoma invasor do colo do útero e suas lesões precursoras (Franco, 1995; Braly, 1996; Meijer et al, 1998).

No nosso estudo avaliámos a prevalência de HPV em lesões neoplásicas intraepiteliais e invasoras, bem como em colos normais, usando o método de PCR com "primers" GP5+/bio-GP6+ e sondas específicas para diferentes tipos de HPV.

Apenas 50 casos (3/10 CIN III, 37/47 carcinomas invasores e 10/10 colos normais) da nossa série de 67 casos puderam ser amplificados com "primers" para actina. Este facto reduziu assim o número de casos com ADN de qualidade para ser avaliada a presença de HPV.

A falha na amplificação de ADN para a actina traduzindo indirectamente a má preservação do ADN, poderá estar relacionada com modificações do ADN provocadas pelo formol durante a fixação dos tecidos (Karlsen et al, 1994).

Os resultados do nosso estudo demonstram que o HPV está presente na maioria dos carcinomas invasores do colo do útero (70%) e das lesões de CIN III (100%). Quando comparados os colos normais com as lesões de CIN III ou com os carcinomas invasores (isoladamente ou em conjunto) a frequência de HPV é consistentemente maior nas lesões neoplásicas, indicando uma forte associação entre a presença de HPV e a transformação neoplásica no colo do útero, tal como foi demonstrado por outros autores (Bosch et al, 1993; Neto et al, 1994; Bosch, et al, 1995; Suzuk et al, 1997; Zehbe e Wilander, 1997; Chichareon et al, 1998; Ngelangel et al, 1998). Os nossos resultados, bem como os dados da literatura sobre esta matéria, suportam que o HPV é o agente causal mais importante do carcinoma do colo uterino.

No nosso estudo observámos uma frequência de 70% de HPV em carcinomas invasores do colo do útero. Esta frequência aproxima-se da descrita por Muñoz et al (1992) num estudo conduzido na Espanha e Colômbia, de 69% e 72,4% respectivamente, no qual foi utilizada a técnica de PCR com "primers" diferentes dos usados no presente estudo. Num trabalho conduzido por Bosch et al (1995), usando amostras de material congelado de 22 países, a prevalência de HPV em carcinomas cervicais invasores variou entre 75-100%.

Na Tabela 14 podemos observar que a prevalência de HPV no carcinoma pavimentoso varia entre 71% a 100% quando se comparam estudos utilizando o PCR como técnica de detecção (isoladamente ou em combinação com outros métodos). A variação na frequência de HPV pode ser devida ao uso de diferentes tipos de amostra (esfregaços cervicais, raspados cervicais, biópsias ou peças cirúrgicas), às diferentes técnicas de preservação tecidular das amostras estudadas (amostras a fresco, congeladas ou fixadas em formol) ou ainda à sensibilidade e especificidade dos diferentes "primers" utilizados para a amplificação do ADN viral. É ainda possível admitir que a frequência de HPV seja variável nas diferentes regiões geográficas.

Apesar de os resultados dos estudos contidos na Tabela 14 não serem totalmente comparáveis essencialmente devido à metodologia de cada estudo, fica clara a elevada prevalência de HPV em carcinomas invasores do colo do útero. A maioria dos estudos que realizaram a amplificação de ADN de HPV com os "primers" GP5+/GP6+, que foram também utilizados no nosso trabalho, documentam frequências de HPV mais elevadas e consequentemente menor número de casos de carcinoma invasor HPV- negativos (Zhebe e Willander, 1997; Chichareon et al 1998; Ngelangel et al, 1998 – Tabela 14).

Vários factores poderão estar relacionados com a presença de 30% de casos HPV negativos na nossa série usando os "primers" GP5+/GP6+ dirigidos à região L1:

- a) baixa representatividade do tecido neoplásico na maioria das amostras de material de biópsia por nós estudadas.
- b) possível presença de baixa carga viral. Mesmo considerando os casos amplificados para a actina, uma baixa carga viral poderá resultar em "falsos-negativos" em PCR (Karlsen et al, 1995 e 1996; Walboomers e Meijer, 1997).
- c) utilização de amostras fixadas em formol a 10% e incluídas em parafina. Estudos comparativos de detecção de HPV demonstram que a sensibilidade de detecção por PCR é menor em material incluído em parafina do que em material congelado (Karlsen et al, 1995). Este aspecto tem sido relacionado com as modificações do ADN celular e viral pelo processo de fixação em formol (Karlsen et al, 1994; de Roda Husman et al, 1995).

- d) eventuais deleções pontuais na região L1 do vírus, secundárias ao processo de integração do genoma viral no genoma da célula hospedeira, já descrita por alguns autores (Karlsen et al, 1996). Deleções na região L1 do vírus poderão explicar a perda de produtos detectáveis por PCR com o uso de "primers" dirigidos a esta região. Karlsen et al (1995 e 1996) documentam um aumento de 20 % de detecção de HPV numa mesma série de carcinomas invasores do colo do útero, após a utilização de uma combinação de múltiplos "primers" universais, dirigidos a diferentes ORF's.
- e) possível presença de tipos de HPV que amplificam menos eficientemente. de Roda Husman et al (1995) demonstraram a existência de tipos de HPV que amplificam menos eficientemente com os "primers" usados no nosso estudo.
- f) possível existência de estirpes de alto risco ainda não detectáveis com GP5+/GP6+ (Zhebe e Wilander, 1997), mesmo considerando que estes "primers" são dirigidos para regiões altamente conservadas num grande número de tipos mucosotrópicos (de Roda Husman et al, 1995).
- g) eventual existência de variações do vírus com perda de conservação da região L1 não reconhecidas com os "primers" GP5+/GP6+.

Se tomarmos em consideração todos estes aspectos, a frequência de 70% de HPV nos carcinomas invasores do nosso estudo será mais provavelmente uma frequência subestimada do que verdadeira. No entanto não podemos pôr de parte a existência de carcinomas invasores do colo do útero que possam ser verdadeiramente negativos para HPV (Burger et al, 1996; Zhebe e Wilander, 1997).

**Tabela 14. Frequência de HPV em carcinomas invasores em diversos estudos**

Método	Material	Nº total de casos	Casos HPV+ n° (%)	HPV +	de	alto	risco	(%)*	Área	Referência
			Total	HPV 16	HPV 18	HPV O	HPV X	HPV M		
PCR	B	45	43 (95)	56	21	23	-	-	Suécia	Zhebe e Wilander, 1997
PCR	C	932	866 (93)	54	15	30	1	-	22 países**	Bosch et al, 1995
PCR	E + C	356	333 (94)	34	23	23	11	9	Filipinas	Ngelangel et al, 1998
PCR+ SB+ VP	E	227	161 (71)	68	6	12	14	-	Espanha/ Colômbia	Muñoz et al, 1992
PCR	B	68	55 (81)	56	2	11	31	-	Cabo (África Sul)	Williamsom et al, 1994
PCR	B	146	129 (88)	43	21	36	0	-	Toquio	Nagakawa et al, 1996
PCR	E + C	377	357 (95)	55	20	12	9	4	Tailândia	Chichareon et al, 1998
PCR+ SB	B	53	47 (89)	43	36	6	15		Tanzania	ter Meulen et al, 1992
PCR	C	50	50 (100)	68	10	6	-	16	Holanda	van den Brule et al, 1991
PCR	B	37	26 (70)	54	4	23	19	-	Moçambique	Presente estudo

\*percentagem calculada sobre o nº total de casos HPV positivos; \*\* inclui países da Europa, América Central e do Sul, África e Ásia; HPV O – outros tipos ; HPV X – tipos de HPV não classificados; HPV M – múltiplos tipos; PCR – Polimerase chain reaction; SB – Southern Blot; VP – ViraPap; HS – hibridização *in situ*; B – biópsia fixada em formol; C – biópsia processada por congelação; E – esfregaço cervical;

Apenas observámos 3 casos de lesões de CIN III com ADN adequado para a detecção de HPV. Nos três casos observámos amplificação de ADN de HPV com os "primers" universais por nós usados.

A forte associação entre as lesões de CIN III e carcinoma invasor com a presença de HPV sugere que as lesões de CIN III representam apenas um estadio de progressão do mesmo processo neoplásico. Esta associação está bem documentada se compararmos a prevalência de HPV e os factores de risco das lesões de CIN III e carcinomas invasores descritas em vários estudos (Bosch et al, 1992; Bosch et al, 1993; Schiffman et al, 1993).

Não detectámos HPV em nenhum dos colos normais da nossa série. A prevalência de HPV em colos normais noutros estudos varia entre 3% a 45% (van den Brule et al, 1991; Bosch et al, 1993; Schiffman et al, 1993; Eluf-Neto et al, 1994; Chua e Hjerpe, 1996; Chichareon et al, 1998; Ho et al, 1998; Ngelangel et al, 1998). A presença de HPV em colos normais é dependente em parte da idade: em grupos etários abaixo dos 24 anos a prevalência de HPV em colos normais atinge os 20%, e em grupos etários acima dos 35 anos a prevalência de HPV diminui para 3% (Meijer et al, 1998). O factor idade poderá explicar em parte a não detecção de HPV nos colos normais da nossa série, já que a maioria das amostras por nós estudadas pertenciam a mulheres com mais de 35 anos (mediana de 40 anos).

Na maioria dos estudos os tipos mais frequentemente associados ao carcinoma invasor do colo do útero são os tipos 16, 18, 31 e 45 (van den Brule et al, 1991; Eluf-Neto et al, 1994; Williamson et al, 1994; Bosch et al, 1995; Zhebe e Wilander, 1997; Ngelangel et al, 1998). O tipo mais comum na nossa série de carcinomas invasores HPV-positivos foi o HPV16, de acordo com a maioria dos estudos (Tabela 14). A frequência de HPV 16 em carcinomas invasores tem no entanto uma distribuição geográfica variável (Tabela 14). A frequência de carcinomas invasores positivos para HPV 16 da nossa série (54%) é similar à frequência documentada por outros autores (Bosch et al, 1995; Zhebe e Wilander, 1997; Williamson et al, 1994; Chichareon et al, 1998). A frequência por nós obtida é igualmente similar à documentada por Bosch et al (1995) em carcinomas invasores de países da América Central e do Sul e de alguns países de África, e é menor do que em países da Europa. Suzuk et al (1997) documentam num estudo realizado em Uygur, China, uma prevalência de perto de 100 % de carcinomas pavimentosos associados a HPV 16.

A baixa frequência de HPV 18 observada no nosso estudo (4%) poderá ser explicada também por diferenças geográficas. Em alguns países de África, observou-se tal como no nosso trabalho uma baixa frequência de HPV 18 em carcinomas invasores: 5,6% na Guiné (Bosch et al, 1995) e 2% em na África do Sul (Williamson et al, 1994). Os tipos 31/33/35/45 foram encontrados em 23% dos nossos casos, também de acordo com o descrito por Bosch et al (1995). No estudo de Bosch et al (1995) o HPV 31 é mais frequentemente encontrado na Europa e América Central e do Sul e o HPV 45 em África.

Uma frequência de 25% de tipos de HPV "não classificados" foi observada por Williamson et al (1994), valor que é maior do que o observado na nossa série (19%). A frequência elevada de tipos de HPV "não classificados" pode ser explicada pelo número limitado de sondas específicas usadas no nosso estudo.

### 3.2. Schistosomíase

Em países onde a schistosomíase *haematobium* é prevalente, esta doença poderia constituir um factor de risco adicional para o desenvolvimento neoplásico no colo do útero. A schistosomíase *haematobium* afecta preferencialmente o aparelho genitourinário, sendo as lesões causadas pela presença de ovos nos tecidos. A frequência global de schistosomíase do colo do útero no nosso

estudo foi de 16,4%. Este valor que encontramos é inferior ao descrito em outros estudos realizados em regiões que, tal como em Moçambique, têm infecção endémica (Moubayed et al, 1994).

Embora não seja possível comparar directamente os nossos valores com os obtidos em outras séries, já que a selecção do material e o propósito dos diferentes estudos foram diversos, há a sugestão de que perante a presença de infecção por *Schistosoma haematobium* o envolvimento do aparelho genital feminino e do colo do útero em particular são muito prevalentes. Numa revisão feita por Feldmeier et al, ficou demonstrado concretamente que 24 a 100% dos casos de schistosomíase do aparelho genital feminino envolvem isoladamente o colo uterino (Feldmeier et al, 1995) e que 70% dos casos de autópsia com envolvimento genital afectam o colo do útero, vagina e vulva (Feldmeier et al, 1995). A menor frequência no nosso estudo deve-se provavelmente a um problema de amostragem, já que em 76% dos casos dispúnhamos apenas de material de biópsia e apenas em 16 casos (24%) o material proveio de peças cirúrgicas. No colo normal, observámos 40% de casos com schistosomíase, valor que é superior à frequência de 25% descrita em esfregaços cervicais normais (Feldmeier et al, 1995). No entanto e mais uma vez os resultados dos dois estudos não são comparáveis já que a frequência de 25% se refere apenas à percentagem de ovos viáveis e o nosso valor de 40% se refere à presença de schistosomíase, independentemente da presença ou ausência de ovos viáveis.

No nosso estudo a frequência de schistosomíase no carcinoma invasor foi de 8,5%, valor menor que o observado na Tanzânia, de 36% (Moubayed et al, 1994). O papel da schistosomíase na carcinogénese do colo do útero não é claro, ao contrário das evidências consistentes desta associação com o carcinoma pavimentoso da bexiga (Badawi et al, 1995; Bedwani et al, 1998). A maior parte dos estudos realizados usando grandes séries não encontraram associação entre o carcinoma invasor do colo do útero e a presença de schistosomíase (Szela et al, 1993; Moubayed et al, 1995 e 1994), embora Shwartz e Hyg (1984) tenham sugerido uma associação numa série de três carcinomas invasores.

No nosso estudo a frequência de schistosomíase diminuiu significativamente do colo normal para o carcinoma invasor. Este resultado relaciona-se provavelmente, como descrito por Riffenburgh et al, (1997) com um problema de amostragem ao invés de traduzir um efeito protector verdadeiro. Com efeito, a maior parte dos carcinomas da nossa série foi diagnosticada por biópsia, enquanto as amostras de colo normal foram colhidas de peças cirúrgicas (ver "Material e Métodos"). Estudos adicionais com uma amostragem maior deverão ser feitos para esclarecer esta questão.

### **3.3. Comparação entre o HPV, Schistosomíase e morfologia**

No nosso estudo não encontramos associações entre carcinomas com e sem schistosomíase e os diversos aspectos morfológicos (tipo histológico, grau de diferenciação, tipo e intensidade do infiltrado inflamatório), ou a idade das doentes.

Quanto à associação entre HPV e tipo histológico, o HPV 16 foi apenas detectado em carcinomas pavimentosos. O HPV 18 foi identificado apenas em um carcinoma adenoescamoso. A associação entre HPV 16 e carcinoma pavimentoso e entre o HPV 18 e carcinomas com diferenciação glandular (adenocarcinoma e carcinoma adenoescamoso) no colo do útero está bem documentada na literatura (Bosch et al, 1995; Nakagawa et al, 1996; Suzuk et al, 1997).

Embora não tenhamos observado diferenças entre a idade média das mulheres e o tipo de HPV nos carcinomas pavimentosos, observámos uma tendência para a presença de HPV 16 em mulheres mais jovens ( $43,8 \pm 13,1$  anos) e para a presença de HPV 31/33/35/45 em mulheres mais idosas ( $57,6 \pm$

13,7 anos). A maior prevalência de HPV 16 em mulheres mais jovens em oposição aos outros tipos prevalentes em mulheres mais velhas foi também documentado por Nagakawa et al (1996). No entanto a idade média dos nossos casos HPV 16 positivos é inferior ao valor descrito por este autor, de  $56,2 \pm 12,1$  anos (Nagakawa et al, 1996). A presença de HPV 31/33/35/45 em mulheres mais idosas sugere um efeito oncogénico menor ou mais lento do que o do HPV 16.

Quanto ao subtipo histológico de carcinoma pavimentoso, apesar de não haver diferenças significativas, observou-se uma tendência para a associação entre a presença de HPV 31/33/35/45 e carcinomas de grandes células não queratinizantes. Não se observou associação entre o subtipo histológico de carcinoma pavimentoso e os tipos 16 e 18 de HPV, em oposição ao estudo de Zhebe e Wilander (1997) que encontraram associação entre a presença de HPV 16 e os carcinomas pavimentosos queratinizantes. Bosch et al (1995) não encontraram qualquer associação entre o subtipo histológico e o tipo específico de HPV.

A presença de infiltrado linfoide e o grau de diferenciação foram também independentes da presença ou ausência de HPV nos carcinomas invasores do nosso estudo. Bosch et al (1995) documentam a associação entre a presença de sinais inflamatórios e a presença de HPV. Outros autores não encontraram associação entre o infiltrado inflamatório e a presença ou ausência de HPV em carcinomas pavimentosos invasores (Davidson et al, 1997). Bosch et al (1995) descrevem um aumento da frequência de HPV 18 com a diminuição do grau de diferenciação apenas em adenocarcinomas.

Um único caso de schistosomíase estava presente na série de 37 casos de carcinomas invasores com ADN adequado ao estudo por PCR. Este caso era simultaneamente HPV 16 positivo. A presença de um único caso de schistosomíase nesta série não permite tirar conclusões entre a possível associação da schistosomíase com a presença ou ausência de HPV. Moubayed et al, estudando retrospectivamente uma grande série de carcinomas invasores com e sem schistosomíase de uma área endémica não observaram associação entre a presença ou ausência de HPV em carcinomas com e sem schistosomíase, sugerindo que na ausência de HPV a schistosomíase não é um factor causal para o cancro do colo do útero (Moubayed et al, 1995). Na bexiga também não foi encontrada associação entre a presença de schistosomíase *haematobium* e o HPV (Cooper et al, 1996).

### 3.4. Progressão das lesões *in situ* para lesões invasoras

No nosso estudo, o intervalo entre o diagnóstico das lesões de CIN III e do carcinoma invasor foi de 12 anos, dentro dos valores previamente descritos na literatura (Chua e Hjerpe, 1996; Gustafsson e Adami, 1989), e sugere a possibilidade de a infecção por HPV, apesar de ser o factor determinante comum das lesões neoplásicas *in situ* e invasoras, não ser suficiente para a progressão neoplásica. Adicionalmente, 80 % das infecções são transitórias (Evander et al, 1995; Ho et al, 1998) e sabe-se que a progressão da doença está associada com a persistência da infecção (Ho et al, 1995; Remmink et al, 1995; Chua e Hjerpe, 1996). Todos estes aspectos apontam para factores que causariam mutações somáticas adicionais e actuariam como co-factores na carcinogénese, concomitantemente com o HPV. Park et al fazem referência a estudos onde se encontraram alterações nos cromossomas 4, 5, 6, 11, 13, 17, 18 e 21. Perdas de heterozigotia têm sido observadas mais frequentemente nos cromossomas 3, 5 e 11 de carcinomas cervicais e perda alélica do 5p em carcinomas invasores e em lesões precursoras que progrediram para o estadio invasor (Park et al, 1995; Mullokandov et al, 1996). Factores de risco adicionais têm sido descritos, entre eles os hábitos tabágicos (Chichareon et al, 1998; Ngelangel et al, 1998), a diminuição da resposta linfoproliferativa às proteínas E6 e E7 do HPV (Kadish et al, 1997), a imunodepressão induzida por outros agentes infecciosos como o HIV ou



por outros factores, e a co-infecção pelo HSV-2 (ter Meulen et al, 1992; Petry et al, 1994; Olsen et al, 1998).

A multiparidade, o uso de contraceptivos orais, o número de parceiros sexuais e a idade da primeira relação sexual, estão no fundo ligados ao comportamento sexual e indirectamente ao HPV (Schiffman e Schatzkin, 1994; Richart et al, 1998).

#### **4. FACTORES DE TRANSFORMAÇÃO E PROGRESSÃO NEOPLÁSICAS (Mucinas e carboidratos associados a mucinas)**

Para avaliar o padrão de glicosilação e o seu significado na transformação e progressão neoplásicas no colo do útero, estudámos por imunocitoquímica usando anticorpos monoclonais específicos os antígenos simples das mucinas Tn, Sialosil-Tn (STn), T e Sialosil-T (ST) e a glicoproteína gp230, em amostras de colo uterino normal, CIN III e carcinoma invasor.

##### **4.1. Tn, STn, T e ST**

Os antígenos Tn, STn, T e ST representam os precursores mais iniciais na glicosilação dos carboidratos da superfície das células (Springer, 1984; Hakamori, 1985; Clausen e Hakamori, 1989; Dennis, 1991). Um dos fenómenos que tem sido descrito na transformação neoplásica é a glicosilação aberrante, essencialmente devido à expressão anormal dos genes que codificam as glicosiltransferases. A glicosilação aberrante resulta na síntese incompleta de carboidratos com consequente acumulação dos seus precursores. Tem sido depositado grande interesse no estudo dos antígenos do grupo TTn, já que frequentemente se encontram expressos em lesões neoplásicas e pré-neoplásicas e fracamente expressos ou ausentes nos tecidos normais.

Os resultados encontrados no nosso estudo demonstram que o padrão de glicosilação se encontra alterado na transformação e progressão neoplásicas do colo uterino.

O antígeno Tn foi expresso em raras células da camada intermediária de apenas um caso de colo normal (10%). A frequência de expressão do Tn em tecidos normais é variável em diferentes estudos. No epitélio pavimentoso estratificado normal, a ausência de expressão de Tn foi descrita no esófago (Ikeda et al, 1993), na epiderme (Dabelsteen et al, 1990) e no colo do útero (Terasawa et al, 1996), ao contrário do descrito no epitélio pavimentoso normal da laringe (Sternesen e Dabelsteen, 1992) e da cavidade oral (Mandel et al, 1991), onde é expresso mais frequentemente.

As diferenças de expressão de Tn nestes diferentes estudos poderão reflectir diferenças na afinidade dos diferentes anticorpos usados. A ausência total de expressão no exocolo normal foi documentada por Terasawa et al (1996), usando o anticorpo HB-Tn1, e poderá estar relacionada com a concentração do anticorpo ou com o tipo de "score" usado, já que não foram considerados positivos os casos em que a expressão ocorria em menos que 5 % das células. A localização da expressão do antígeno Tn no único caso positivo de colo normal da nossa série foi observada no citoplasma de células da camada intermediária. A localização nas camadas mais superficiais do epitélio pavimentoso é concordante com o descrito na cavidade oral (Mandel et al, 1991) e na laringe (Sternesen e Dabelsteen, 1992). A localização citoplasmática sugere que o anticorpo visualiza o carboidrato no percurso biosintético inicial (Mandel et al, 1991).

A expressão significativamente aumentada de Tn nas lesões de CIN III e carcinoma invasor (30% e 63,8%, respectivamente), indica que o Tn é um marcador de malignidade com alta especificidade no colo uterino. Variações na expressão entre as lesões *in situ* e invasoras têm sido descritas.

Terasawa et al (1996) não encontraram expressão de Tn nas lesões intraepiteliais de alto grau do colo uterino e encontraram uma expressão menor (20%) do que a observada no presente trabalho nos carcinomas invasores. Estas diferenças poderão estar relacionadas com a concentração do anticorpo, muito menor no trabalho de Terasawa et al (1996), já que o anticorpo usado foi o mesmo nos dois trabalhos. Na laringe, está descrita perda total de Tn quer nas lesões *in situ*, quer nas invasoras (Sternesen e Dabelsteen, 1992).

No nosso estudo, apesar da expressão de Tn não ser limitada às lesões invasoras, ela é sugestivamente mais frequente nos carcinomas invasores do que no CIN III ( $p = 0,07$ ). Os nossos resultados sugerem que a expressão aberrante do antígeno Tn ocorre precocemente, nas lesões pré-invasoras, mas que esta expressão aberrante é ainda mais frequente em carcinomas invasores. Quanto à intensidade de expressão e à citolocalização, este antígeno é expresso mais frequentemente no citoplasma, mas também adquire expressão na membrana, sugerindo que a glicosilação na célula neoplásica se encontra alterada a vários níveis.

Os resultados de estudos acerca da expressão de STn são mais controversos. Alguns autores reportam fraca expressão ou mesmo ausência de expressão do STn nos tecidos normais (Langkilde et al, 1992; Yonezawa et al, 1992). A expressão de STn foi descrita no epitélio pavimentoso normal da laringe (Sternesen e Dabelsteen, 1992) e da cavidade oral (Mandel et al, 1991) e não foi observada no epitélio pavimentoso normal do esôfago (Ikeda et al, 1993) e na epiderme (Dabelsteen et al, 1990). Nós encontramos uma expressão elevada de STn no epitélio exocervical normal (80% dos casos). Estes resultados são contraditórios com o descrito por alguns autores, que documentam que no epitélio do exocervix a expressão é muito fraca (Hirao et al, 1992), esporádica (Yonezawa et al, 1992) ou mesmo ausente (Terasawa et al, 1996). Mandel et al (1991) descrevem a expressão de STn no epitélio pavimentoso da cavidade oral em 50% de 30 casos da sua série. Jass et al (1995), sugerem que diferenças na expressão de STn em epitélios normais em diferentes estudos são justificadas pelo tipo de ligação do ácido siálico ao Tn, conferindo diferente antigenicidade conforme o tipo de anticorpo usado.

Quanto à localização e intensidade, a expressão de STn foi muito focal e de fraca intensidade, localizada às células das camadas intermediária e superficial, e ausente na camada basal, tal como descrevem Mandel et al (1991) na cavidade oral e Teglbjaerg et al (1991) no exocervix. Estas diferenças de expressão de STn nas diferentes camadas do epitélio pavimentoso poderão estar relacionadas com o processo de maturação das células epiteliais, sendo o STn expresso em células com diferenciação terminal.

No nosso estudo a imunorreactividade do STn foi mais forte e difusa nos carcinomas invasores do que nas lesões de CIN III. A expressão quantitativa de STn por nós encontrada no CIN III e carcinomas invasores foi de 90% e 66%, respectivamente, valores que são superiores aos descritos por Terasawa et al (1996), de 64 a 54% (displasias graves/carcinoma *in situ*) e 58% (carcinomas invasores), respectivamente. Uma vez mais, a menor concentração de anticorpo usada no estudo de Terasawa et al (1996) poderá justificar as diferenças em relação à nossa série. No esôfago, Ikeda et al (1993) não encontraram expressão de STn em lesões de displasia e encontraram uma expressão de 47% em carcinomas pavimentosos invasores. Os resultados que obtivemos de maior expressão de STn no carcinoma *in situ* do que nos carcinomas invasores, encontram paralelo em estudos realizados na mama (Schmitt et al, 1995). A expressão quantitativa de STn não foi significativamente diferente entre o colo normal e as lesões neoplásicas (CIN III e carcinoma

invasor), nem entre o CIN III e o carcinoma invasor. Os nossos resultados sugerem que a expressão quantitativa de STn poderá ter pouco ou nenhum valor como marcador de desenvolvimento neoplásico no colo do útero, em contradição com o descrito por Terasawa et al (1996). No entanto, a distribuição deste antígeno foi diferente no colo normal e nas lesões neoplásicas. No colo normal, nunca foi expresso na camada basal, em oposição ao que aconteceu no CIN III e carcinoma invasor. A ausência de expressão de STn foi também observado por Bryne et al (1995) no epitélio pavimentoso normal da região da cabeça e pescoço, indicando que em última instância, o padrão de glicosilação está pelo menos alterado em relação à sua distribuição em situações de proliferação anormal.

No carcinoma invasor, observámos expressão difusa de STn nos ninhos neoplásicos, embora predominando no centro, e localizado quer na membrana quer no citoplasma das células, de forma semelhante ao descrito por Terasawa et al (1996).

A coexpressão de Tn e STn em 51% dos carcinomas invasores foi menor do que a observada por Terasawa et al (1996), de 89% dos casos. A circunstância de os antígenos Tn e STn serem na maioria dos casos co-expressos ou ambos não-expressos sugere que a desregulação do processo de glicosilação que ocorre nas neoplasias afecta drasticamente o processo de alongamento das cadeias de carboidratos com acumulação simultânea de vários antígenos precursores. Nos casos em que nenhum dos carboidratos (Tn e STn) é expresso duas interpretações são plausíveis: ou a perturbação da glicosilação é tão grave que não há glicosilação das proteínas ou a glicosilação é próxima do normal, com alongamento das cadeias que mascara a exposição dos precursores. Os estudos realizados neste trabalho não permitem esclarecer qual das alternativas é a mais plausível já que não foram utilizados anticorpos que permitam descrever com precisão todo o processo de biossíntese das cadeias dos carboidratos.

O antígeno T nunca foi expresso em casos de colo normal, CIN III e carcinoma invasor. Apenas um caso (10%) da sua forma sialilada foi expresso no colo normal, após tratamento com neuraminidase, e não houve expressão de ST no CIN III. Estes resultados sugerem ou que o antígeno T poderá estar mascarado por adição de outros açúcares ou determinantes antigénicos, tais como os do grupo sanguíneo ABO (Sakamoto et al, 1986; Teglbjaerg et al, 1991). A expressão ocasional de ST na mucosa normal foi descrita por outros autores na mucosa gástrica normal (David et al, 1992; Carneiro et al, 1994), no colon (Itzkowitz et al, 1993) e na mucosa vesical (Langkilde, 1992). Nielsen et al (1997) descrevem ainda a expressão de ST na camada basal de epitélio exocervical normal e Dabelsteen et al (1990) na epiderme normal.

A expressão do antígeno ST foi significativamente mais frequente no carcinoma invasor (51,1%). Estes achados sugerem que 51% dos carcinomas possui a enzima  $\beta$ 1,3-galactosiltransferase necessária à síntese do antígeno T e que em 100% destes casos este dissacárido está coberto pelo ácido siálico, tal como foi observado no estômago, indicando uma sialilação eficiente (David et al, 1992). Adicionalmente, a ausência de expressão de T e ST no colo normal e no CIN III, e a presença consistente de ST em cerca de metade dos carcinomas invasores (51,1%) demonstra que este antígeno é um marcador de invasão com alta especificidade. A presença de ST foi também referida nos carcinomas pavimentosos do colo uterino e da cavidade oral (Nielsen et al, 1997) e em carcinomas pavimentosos da laringe (Sternesen e Dabelsteen, 1992). O padrão de expressão difuso no centro e na periferia dos ninhos neoplásicos é semelhante ao encontrado na laringe (Sternesen e Dabelsteen, 1992). A citolocalização por nós observada, quer no citoplasma quer na membrana, sugere uma interrupção da glicosilação celular a vários níveis, desde a altura de síntese ao transporte até à membrana celular.

Não encontramos associação entre a expressão dos antígenos Tn, STn, T e ST com nenhum dos parâmetros morfológicos por nós analisados, tal como foi documentado por outros autores no colo do útero (Hirao et al, 1993; Terasawa et al, 1996), no esófago (Ikeda et al, 1993), no estômago (David et al, 1992) e na mama (Schmitt et al, 1995). Este facto sugere que as alterações no padrão de expressão dos antígenos simples das mucinas acompanham paralelamente mas de modo independente as alterações morfológicas que ocorrem no processo de transformação e progressão neoplásica no colo do útero.

#### 4.2. Gp 230

Sabe-se que a mucosa cervical expressa altos níveis de carbohidratos das mucinas com ligações-O. No entanto pouco se sabe sobre as moléculas que as transportam. De entre as glicoproteínas com domínio das mucinas (com regiões altamente O-glicosiladas), as que estão expressas no colo do útero normal são o MUC1 e o CD 44 (Gipson et al, 1997; Nielsen et al 1997; Gum, 1992). O MUC1 está apenas fracamente expresso no exocervix normal, em células da camada intermediária (Tatemoto et al, 1987; Nielsen et al, 1997), enquanto o CD44 é fortemente expresso apenas na camada basal do exocervix normal (Nielsen et al, 1997). Recentemente, Nielsen et al (1997) sugeriram a presença de outro "reservatório" de glicanos O-ligados nas camadas superiores do epitélio cervical normal, nomeadamente a glicoproteína gp 230, reconhecida pelo anticorpo PANH4.

Nós encontramos forte expressão de gp 230 em 100% dos casos de epitélio exocervical normal, predominantemente na membrana de células das camadas suprabasais, de modo similar ao descrito por Nielsen et al (1997), demonstrando que esta glicoproteína está ligada ao processo de diferenciação e maturação no colo uterino normal. Igual padrão de expressão foi também documentado na mucosa normal da laringe, esófago, vagina e cavidade oral (Nielsen et al, 1997). A expressão de gp 230 foi no nosso estudo significativamente menor nas lesões de CIN III (50%). Esta frequência de perda de expressão difere no entanto da descrita em displasias graves do epitélio oral, onde houve perda total de expressão (Nielsen et al, 1997). No carcinoma invasor, a glicoproteína gp 230 é expressa em 51,1% dos casos, frequência que é superior à de 30% descrita por Nielsen et al (1997). A expressão de gp 230 foi diferente em relação ao tipo histológico, sendo expressa apenas nos carcinomas pavimentosos. Esta associação entre a expressão de gp 230 e o tipo morfológico pode justificar as diferenças entre a percentagem de carcinomas com expressão de gp 230 nos dois estudos, já que as séries são diferentes quanto ao número de casos dos diferentes tipos morfológicos (Nielsen et al, 1997). A perda de expressão de gp 230 é semelhante à descrita para outra glicoproteína de tipo mucina (CD44) em cerca de 50% de lesões escamosas de alto grau e carcinomas pavimentosos do colo do útero (Davidson et al, 1998).

A diminuição consistente de gp 230 no grupo de lesões neoplásicas em relação ao colo normal indica que esta glicoproteína é um marcador de malignidade. Uma vez que a diminuição de gp 230 já é significativa nas lesões de CIN III em relação ao colo normal, este facto sugere que a perda de expressão de gp 230 está ligada a estádios precoces de transformação neoplásica.

A expressão de gp 230 diminui com a perda de diferenciação, de 90,4% nos carcinomas pavimentosos bem diferenciados a 68,8% e 17,6% nos carcinomas pavimentosos moderadamente e pouco diferenciados respectivamente. A expressão é também significativamente menor de acordo com o grau de queratinização: 89,5% nos carcinomas de grandes células queratinizantes, 31,8% nos de grandes células não queratinizantes e ausentes no de pequenas células não queratinizantes. Estes dois achados conjugados, sugerem que a gp 230 é um marcador de diferenciação nos carcinomas pavimentosos. De facto, a gp 230 foi apenas encontrada nas áreas melhor diferenciadas, no centro dos ninhos neoplásicos. Encontrámos também expressão desta glicoproteína em pérolas córneas dos

carcinomas bem diferenciados. Este dado é contraditório com o descrito por Nielsen et al (1997). Nesse estudo os autores nunca encontraram expressão na camada de queratina da epiderme e muito fracamente no epitélio queratinizado do palato (Nielsen et al, 1997). No entanto dados não publicados documentam expressão de gp 230 em corpúsculos de Hassal de timo normal. A expressão de gp 230 nas pérolas córneas de carcinomas queratinizantes do colo uterino pode indicar em última análise, que estas neoplasias têm um padrão de queratinização aberrante, eventualmente diferente da queratina produzida pela pele. A expressão maior em áreas queratinizadas e pérolas córneas de carcinomas pavimentosos invasores foi descrita também na cavidade oral para outra mucina – o MUC1 (Tatemoto et al, 1987).

A expressão de gp 230 foi predominantemente membranar, mas ao contrário do colo normal, foi também citoplasmática nas lesões neoplásicas. A aquisição de expressão citoplasmática, tal como aconteceu em alguns carcinomas pavimentosos do nosso estudo, foi também descrita em carcinomas pavimentosos da cavidade oral para o MUC1 (Tatemoto et al, 1987).

Não encontramos associação entre a expressão de gp 230 e a presença ou ausência concomitante de infiltrado inflamatório nos carcinomas do colo uterino em geral, e nos carcinomas pavimentosos em particular, sugerindo que a expressão de gp 230 não influencia o padrão de resposta inflamatória que ocorre nos carcinomas invasores.

A glicoproteína gp 230 foi coexpressa com o Tn em 31,9% dos casos de carcinomas invasores, com o STn em 38,3% dos casos, com o ST em 29,8% dos casos e não houve coexpressão com o T. A presença ou ausência concomitante de gp 230 com qualquer um dos antígenos simples das mucinas não foi no entanto significativa, o que sugere que os antígenos Tn, STn, T e ST estão ligados provavelmente com mais frequência ao processo de glicosilação de outras glicoproteínas de tipo mucina presentes no colo do útero, tal como o CD44. De facto, a confirmar este achado está a presença simultânea de CD44 e ST na camada basal do exocolo normal, descrita por Nielsen et al (1997) e ausência consistente de gp 230 na mesma camada, documentada no estudo de Nielsen et al (1997) e no nosso estudo.

#### **4.3. HPV, antígenos simples das mucinas e gp 230**

O padrão de glicosilação normal nos epitélios também está relacionado com a maturação e diferenciação. No epitélio normal do colo do útero, o padrão de glicosilação é diferente nas células escamosas metaplásicas da zona de transformação em relação ao epitélio escamoso nativo. Esta poderá ser uma das razões para que as células metaplásicas da zona de transformação do colo uterino sejam mais susceptíveis à infecção viral, nomeadamente à infecção por HPV (Teglbjaerg et al, 1991), já que uma das funções dos carboidratos se prende com a adesão de microorganismos. Esta variação de expressão de carboidratos no epitélio metaplásico pode ser importante no desenvolvimento dos carcinomas nesta área.

Por outro lado, também está demonstrado que o ciclo de vida do HPV está intimamente ligado à diferenciação escamosa cervical. Não seria portanto surpreendente se a alteração de expressão dos carboidratos se associasse à presença de HPV, em especial à expressão de gp 230 que se relacionou no nosso estudo com o grau de diferenciação dos carcinomas invasores. No entanto não encontramos associação entre a expressão de nenhum dos antígenos simples das mucinas ou de gp 230 e o grau de diferenciação ou de queratinização em carcinomas invasores do colo do útero com a presença ou ausência de HPV.

Tanto quanto é do nosso conhecimento, não está descrita na literatura a pesquisa de associação entre o HPV e os antígenos simples das mucinas Tn, STn, T e ST.

Nos casos de carcinomas invasores encontramos uma localização citoplasmática mais frequente de Tn, STn e ST em carcinomas invasores HPV-positivos independentemente do tipo específico de HPV. Este achado sugere que o HPV poderá interferir com a ação de glicosiltransferases específicas, provocando uma interrupção do processo de glicosilação dos carboidratos em pontos específicos imediatamente subsequentes à síntese dos seus precursores no aparelho de Golgi, com a consequente acumulação destes precursores no citoplasma das células neoplásicas infectadas pelo HPV.

No único estudo onde é avaliada a expressão de gp 230 (Nielsen et al, 1997) não foi pesquisada a presença de HPV. No nosso estudo não encontramos associação entre a presença e ausência de HPV e a expressão de gp 230. Alguns autores que estudaram outras mucinas encontraram associação entre a presença de HPV e o aumento de expressão de isoformas de CD44 nos carcinomas invasores do colo do útero, indicando que a infecção por HPV de alto risco pode preceder a expressão alterada destas isoformas (Dall et al, 1996). Outros autores não encontraram associação entre a presença de HPV e a expressão alterada de CD44 (Davidson et al, 1998).

No nosso estudo documentamos que tanto o HPV como a expressão aberrante dos carboidratos associados a mucinas e de gp 230 se associam à transformação e progressão neoplásicas no colo do útero. Quer a infecção por HPV quer a expressão aberrante dos carboidratos associados a mucinas e da glicoproteína gp 230 são frequentes no processo de cancerização do colo do útero e, tanto quanto pudemos observar, não estão relacionadas entre si. Apenas a presença de HPV poderá ter um papel na localização dos antígenos simples das mucinas no citoplasma das células neoplásicas.

## V. CONCLUSÕES PRINCIPAIS

---

Os resultados obtidos no trabalho efectuado permitem a formulação de algumas conclusões que poderão contribuir para o melhor entendimento dos processos de cancerização e progressão neoplásicas no colo do útero:

1. A prevalência de HPV tem uma distribuição diferente nos casos de colos normais (0%) e no grupo das lesões neoplásicas não invasoras e invasoras (100% e 70%, respectivamente). A presença de HPV de alto risco associa-se fortemente ao carcinoma invasor do colo uterino, sugerindo o seu papel central como agente causal do cancro do colo uterino. O HPV 16 foi o tipo oncogénico mais frequente em oposição ao HPV 18. O HPV 16 é mais frequentemente encontrado em carcinomas pavimentosos e o HPV 18 em carcinomas com diferenciação glandular. A frequência do grupo 31/33/35/45 parece ser maior em carcinomas de doentes com idades mais avançadas que o HPV 16. Este facto poderá eventualmente indicar uma evolução mais lenta da transformação e progressão neoplásicas dos carcinomas invasores associados ao HPV 31/33/35/45.
2. A presença de 30% de carcinomas invasores negativos para HPV, apesar de sugerir a possibilidade de "falsos negativos" relacionados com a qualidade do material, levanta também a possibilidade de haver na nossa série deleções da região L1 do HPV na zona seleccionada para amplificação com os "primers" GP5+/bio-GP6+, naturalmente secundárias à integração viral no genoma do hospedeiro. É ainda possível admitir a presença de infecção por tipos de HPV não detectáveis pela metodologia utilizada.
3. A schistosomíase não parece estar associada ao processo de transformação neoplásica no colo do útero de um modo geral e dessa transformação na ausência de HPV de forma particular. No entanto a amostragem limitada de carcinoma invasor em peças cirúrgicas não permite extrair conclusões definitivas em relação a este ponto.
4. O padrão de glicosilação está alterado no processo de transformação neoplásica do colo do útero, quer quantitativamente quer fenotipicamente. A diminuição de gp 230 é detectada desde estadios precoces da transformação neoplásica; a expressão aumentada de Tn é observada em estadios mais avançados da cancerização e a expressão de ST associa-se fortemente com o carcinoma invasor. Adicionalmente a gp 230 está intimamente ligada ao processo de diferenciação, quer no colo normal, quer nos carcinomas pavimentosos invasores. A conjugação do padrão dos antígenos estudados, mostra que o Tn, ST e a gp 230 são marcadores de malignidade com alta especificidade, podendo ser úteis na avaliação do diagnóstico e da progressão neoplásicas.
5. A expressão aberrante de antígenos simples das mucinas e da gp 230 é independente da presença de HPV, e acompanha gradualmente as alterações morfológicas que se observam desde o colo normal, aumentando nas lesões neoplásicas *in situ* e nas lesões invasoras.
6. A presença de HPV nos carcinomas invasores poderá interferir com etapas específicas de glicosilação e justificar a localização dos antígenos simples das mucinas no citoplasma das células neoplásicas com infecção por HPV.

Com este trabalho acreditamos ter contribuído para o melhor entendimento do processo de transformação neoplásica no colo uterino utilizando novos conhecimentos e técnicas actuais de investigação na área da oncobiologia.

## VI. PROPOSTAS PARA ESTUDOS A CURTO PRAZO

---

A exígua informação que conseguimos obter dos aspectos clinico-patológicos e em particular do "follow-up" das doentes limita muito o estudo de factores de prognóstico e de agressividade biológica envolvidos no carcinoma do colo do útero. No entanto há aspectos importantes para o melhor entendimento biopatológico dos carcinomas do colo uterino que considerámos relevante avaliar.

Assim propomos:

1. Estudar a frequência relativa dos tipos de HPV 31, 33, 35 e 45, utilizando sondas específicas para cada tipo nos casos que foram positivos com o "cocktail" conjunto de sondas para este sub-grupo de vírus.
2. Estudar a frequência de infecções por mais que um tipo de HPV, utilizando nas diferentes amostras com infecção várias sondas específicas de tipo de forma sequencial.
3. Tentar identificar por sequenciação os tipos que não foram identificados através da utilização de sondas específicas.
4. Tentar identificar a presença de HPV nos casos que se revelaram negativos com a abordagem utilizada, nomeadamente utilizando "primers" para outras regiões do genoma vírico.
5. Alargar o estudo do padrão de glicosilação no colo normal, lesões *in situ* e carcinomas pavimentosos invasores através do estudo da expressão dos determinantes antigénicos do grupo sanguíneo ABO.
6. Estudar as características anátomo-patológicas e o papel do HPV em uma série maior de carcinomas invasores com e sem schistosomíase disponíveis em arquivo no Registo do Cancro do HCM.



## VII. BIBLIOGRAFIA

---

Ambros RM, Kurman RJ: Current concepts in the relationship of human papillomavirus infection to the pathogenesis and classification of precancerous squamous lesions of the uterine cervix. *Sem Diagn Pathol* 7:158-172, 1990

Badawi AF, Mostafa MH, Probert A, O'Connor PJ: Role of schistosomiasis in human bladder cancer: evidence of association, aetiological factors and basic mechanisms of carcinogenesis. *Eur J Cancer Prev* 4:45-59, 1995

Baken LA, Koutsky LA, Kuypers J, Kosorok MR, Lee S-K, Kiviat NB, Holmes KK: Genital human papillomavirus infection among male and female sex partners: prevalence and type specific concordance. *J Infect Dis* 171:429-432, 1995

Basset MT, Chokunonga E, Mauchaza B, Levy L, Ferlay J, Parkin DM: Cancer in the African population of Harare, Zimbabwe, 1990-1992. *Int J Cancer* 63: 29-36, 1995

Bedwani R, Renganathan E, Kwahsky FEI, Braga C, Abu Seif HH, Abul Azm T, Zaki A, Franceschi S, Boffetta P, La Vecchia C: Schistosomiasis and the risk of bladder cancer in Alexandria, Egypt. *Br J Cancer* 77:1186-1189, 1998

Bosch FX, Muñoz N, de Sanjosé S, Navarro C, Moreo P, Ascunce N, Gonzalez LC, Tafur L, Gili M, Larrañaga I, Viladiu P, Daniel RW, Alonso de Ruiz P, Aristizabal N, Santamaria M, Guerrero E, Shah KV: Human papillomavirus and cervical intraepithelial neoplasia gradeIII/carcinoma *in situ*: a case-control study in Spain and Colombia. *Cancer Epidemiol Biomarkers & Prev* 2: 415-422, 1993

Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kurman R, Shah KV, International Biological Study on Cervical Cancer (IBSCC) study group: Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a Worldwide perspective. *J Natl Cancer Inst* 87:796-802, 1995

Bosch FX, Castellsagué X, Muñoz N, de Sanjosé S, Ghaffari AM, Gonzalez LC, Gili M, Izarzugaza I, Viladiu P, Navarro C, Vergara A, Ascunce N, Guerrero E, Shah KV: Male sexual behavior and human papillomavirus DNA: key risk factors for cervical cancer in Spain. *J Natl Cancer Inst* 88: 1060-11067, 1996

Braly P: Preventing cervical cancer. A recent conference reiterates the need for better screening and the development of an HPV vaccine. *Nature Med* 2:749-75, 1996

Bryne M, Gravdahl C, Koppang HS, Kjaerheim A, Dabelsteen E: Is the carbohydrate sialosyl-Tn a marker for altered, non-malignant activity in squamous epithelium in the head and neck region? *J Pathol* 175:237-242, 1995

Burger MPM, Hollema H, Pieters WJLM, Schroder FP, Quint WGV: Epidemiological evidence of cervical intraepithelial neoplasia without the presence of human papillomavirus. *Br J Cancer* 73: 831-836, 1996

Carneiro F, Santos L, David L, Dabelsteen E, Clausen H, Sobrinho-Simões M: T (Thomsen-Friedenreich) antigen and other simple mucin-type carbohydrate antigens in precursor lesions of gastric carcinoma. *Histopathology* 24:105-113, 1994

- Chichareon S, Herrero R, Muñoz N, Bosch FX, Jacobs MV, Deacon J, Santamaria M, Chongsuvivatwong V, Meijer CJLM, Walboomers JMM: Risk factors for cervical cancer in Thailand: a case-control study. *J Natl Cancer Inst* 90:50-57, 1998
- Chua K-L, Hjerpe A: Persistence of human papillomavirus (HPV) infections preceding cervical carcinoma. *Cancer* 77:121-127, 1996
- Clausen H, Hakomori S-I: ABH and related histo-blood group antigens; immunochemical differences in carrier isotypes and their distribution. *Vox Sang* 56:1-20, 1989
- Cohen RJ, Edgar SG, Cooper K: Schistosomiasis and prostate cancer. *Pathology* 27:115-116, 1995
- Cooper K, Haffajee Z, Taylor I: Human papillomavirus and schistosomiasis associated bladder cancer. *J Clin Pathol: Mod Pathol* 50:145-148, 1997
- Crissman JD, Makuchi R, Budhraj M: Histopathologic grading of squamous cell carcinoma of the uterine cervix. An evaluation of 70 stage Ib patients. *Cancer* 55:1590-1596, 1985
- Dabelsteen E, Broby-Johansen U, Jeppe-Jensen D, Mandel U: Cell surface glycosylation patterns in psoriasis. *APMIS* 98:221-228, 1990
- Dabelsteen E, Mandel U, Clausen H: Blood group antigens as differentiation and tumor-associated markers in oral epithelium. *Proc Finn Dent Soc* 84:19-29, 1988
- Dall P, Hekele A, Ikenberg H, Goppinger A, Bauknecht T, Pfeleiderer A, Moll J, Hofmann M, Ponta H, Herrlich P: Increasing incidence of CD44v7/8 epitope expression during uterine cervical carcinogenesis. *Int J Cancer* 22:79-85, 1996
- David L, Nesland JM, Clausen H, Carneiro F, Sobrinho-Simões M: Simple mucin-type carbohydrate antigens (Tn, Sialosyl-Tn and T) in gastric mucosa, carcinomas and metastases. *APMIS* 27:162-172, 1992
- Davidson B, Goldberg I, Kopolovic J: Inflammatory response in cervical intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Pathol Res Pract* 193:491-495, 1997
- Davidson B, Goldberg I, Gotlieb WH, Bem-Baruch G, Kopolovic J: CD44 expression in the cervical intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma: an immunohistochemical study. *Eur J Gynaecol Oncol* 19: 46-49, 1998
- Dennis JW: N-linked oligosaccharide processing and tumor cell biology. *Sem Cancer Biol* 2:411-420, 1991
- de Roda Husman AM, Snijders PJF, Stel HV, van den Brule AJC, Meijer CJLM, Walboomers JMM: Processing of long-stored archival cervical smears for human papillomavirus detection by the polymerase chain reaction. *Br J Cancer* 72:412-417, 1995
- Evander M, Edlund K, Gustafsson A, Jonsson M, Karlsson R, Rylander E, Wadell G: Human papillomavirus infection is transient in young women: a population-based cohort study. *J Infect Dis* 171: 1026-1030, 1995

Feldmeier H, Krantz I: A synoptic inventory of needs for research on women and tropical parasitic diseases. I. Application to urinary and intestinal schistosomiasis. *Acta Trop* 55: 117-138, 1993

Feldmeier H, Poggensee G, Krantz I: A synoptic inventory of needs for research on women and tropical parasitic diseases. II. Gender-related biases in the diagnosis and morbidity assessment of schistosomiasis in women. *Acta Trop* 55: 139-169, 1993

Feldmeier H, Krantz I, Helling-Giese G, Rohrbach C: Preventing cervical cancer – a global issue. *Nature Med* 2: 1054, 1996

Feldmeier H, Poggensee G, Krantz I, Helling-Giese G: Female genital schistosomiasis, new challenges from a gender perspective. *Tropical and Geographical Medicine* 47 (2):S1-S15, 1995

Fu YS, Sherman ME: The uterine cervix. *Em: Principles and practice of surgical pathology and cytopathology*. Vol 3, pag 2346-2348. Editores: Silverberg, SG, DeLellis, RA e Frable, JR. 3ª ed., 1997

Franco EL: Cancer causes revisited: Human papillomavirus and cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 87:779-780, 1995

Gipson IK, Ho SB, Spurr-Michaud SJ, Tisdale AS, Zhan Q, Torlakovic E, Pudney J, Anderson DJ, Toribara NW, Hill JA 3rd: Mucin genes expressed by human female reproductive tract epithelia. *Biol Reprod* 56:999-1011, 1997

Gombel C, Silverberg SG. The cervix. *Em: Pathology in gynecology and obstetrics*. Pag 105; Editores: Gombel C, Silverberg SG. 4ª ed, 1994

Gum JM Jr: Mucin genes and proteins they encode: structure, diversity, and regulation. *Am J Resp Cell Mol Biol* 7:557-564, 1992

Gustafsson L, Adami HO: Natural history of cervical neoplasia: consistent results obtained by an identification technique. *Br J Cancer* 60:132-141, 1989

Hakomori S-I: Aberrant glycosylation in cancer cell membranes as focused on glycolipids: overview and perspectives. *Cancer Res* 45:2405-2414, 1985

Hilkens J, Ligtenberg MJL, Vos HL, Litvinov SV: Cell membrane-associated mucins and their adhesion-modulating property. *TIBS* 17:359-363, 1992

Hirao T, Sakamoto Y, Kamada M, Hamada S-I, Aono T: Tn antigen, a marker of potencial for metastasis of uterine cervix cancer cells. *Cancer* 72:154-159, 1993

Ho GY, Burk RD, Klein S, Kadish AS, Chang CJ, Palan P, Basu J, Tachezy R, Lewis R, Romney S: Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia. *J Natl Cancer Inst* 87:1365-1371, 1995

Ho GYF, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD: Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 338: 423-428, 1998

Ho JLL, Kim YS: Do mucins promote tumor cell metastasis? (review). *Int J Oncol* 7:913-926, 1995

Ho SB, Niehans GA, Lyftogt C, Yan PS, Cherwitz DL, Gum ET, Dahiya R, Kim YS: Heterogeneity of mucin gene expression in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res* 53: 641-651, 1993

Howley P: Role of human papillomavirus in human cancer. *Cancer Res* 51:5919s-5022s, 1991

Hsu S.M, Raine L, Fanger H: Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques. A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29:1349, 1981

Hulbreztse JM, Beaudenon SL: Mechanism of HPV E6 proteins in cellular transformation. *Sem Cancer Biol* 7:317-326, 1996

Ikeda Y, Kuwano H, Baba K, Ikebe M, Matsushima T, Adachi Y, Mori M, Sugimachi K.: Expression of sialyl-Tn antigens in normal squamous epithelium, dysplasia, and squamous cell carcinoma in the esophagus. *Cancer Res* 53: 1706-1708, 1993

Inoue M, Ton S, Ogawa H, Tanizawa O: Expression of Tn and Sialyl-Tn antigens in tumor tissues of the ovary. *Am J Clin Pathol* 96:711-716, 1991

Inoue M,(b) , Ogawa H, Tanizawa O, Kobayashi Y, Tsujimoto M, Tsujimura T: Immunodetection of sialyl-Tn antigen in normal, hyperplastic and cancerous tissues of the uterine endometrium. *Virchows Arch A Pathol Anat* 418:157-162, 1991

Itzkowitz SH, Yuan M, Montgomery CK, Kjeldsen T, Takahashi HK, Bigbee WL, Kim YS: Expression of Tn, Sialyl-Tn, and T antigens in human colon cancer. *Cancer Res* 49:197-204, 1989

Jacobs MV, van den Brule AJC, Snijders PJF, Helmerhorst TJM, Meijer CJLM, Walboomers JMM : A non-radioactive PCR enzyme-immunoassay enables a rapid identification of HPV 16 and 18 in cervical scrapes after GP5+/6+ PCR. *J Med Virol* 49:223-229, 1996

Jacobs MV, Snijders PJF, van den Brule AJC, Helmerhorst TJM, Meijer CJLM, Walboomers JMM: A general primer GP5+/GP6+ - mediated PCR-enzyme immunoassay method for rapid detection of 14 high-risk and 6 low-risk human papillomavirus genotypes in cervical scrapings. *J Clin Microbiol* 35: 791-795, 1997

Jass JR, Allison LJ, Edgar SG: Distribution of sialosyl Tn and Tn antigens within normal and malignant colorectal epithelium. *J Pathol* 176:143-149, 1995

Kadish AS, Ho GYF, Burk RD, Wang Y, Romney SL, Ledwidge R, Angeletti RH: Lymphoproliferative responses to human papillomavirus (HPV) type 16 proteins E6 and E7: Outcome of HPV infection and associated neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 89:1285-1293, 1997

Karlsen F, Kalantari M, Chitemerere M, Johansson B, Hagmar B: Modifications of human and viral deoxyribonucleic acid by formaldehyde fixation. *Lab Invest* 71:604-611, 1994

Karlsen F, Kristensen G, Holm R, Chitemerere M, Berner A, Hagmar BM: High incidence of human papillomavirus in 146 cervical carcinomas. A study using three different pairs of consensus primers and detecting viral genomes with putative deletions. *Eur J Cancer* 31:1511-1516, 1995

Karlsen F, Kalantari M, Jenkins A, Pettersen E, Kristensen G, Holm R, Johansson B, Hagmar B: Use of multiple PCR primer sets for optimal detection of human papillomavirus. *J Clin Microbiol* 34:2095-2100, 1996

Kjeldsen T, Clausen H, Hirohashi S, Ogawa T, Iijima H, Hakomori S-I: Preparation and characterization of monoclonal antibodies directed to the tumor-associated O-linked Sialosyl-2-6 a-Nacetylgalactosaminyl (Sialosyl-Tn) epitope. *Cancer Res* 48:2214-2220, 1988

Koulibaly M, Kabba IS, Cissé A, Diallo SB, Diallo MB, Keita N, Camara ND, Diallo MS, Sylla BS, Parkin DM: Cancer incidence in Conakry, Guinea: first results from the cancer registry 1992-1995. *Int J Cancer* 70: 39-45, 1997

Kurman RJ, Norris HJ, Wilkinson E: Atlas of tumor pathology, Tumours of the cervix, vagina and vulva. 3rd ed. Series, vol 4. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC, 1992

Langkilde NC, Wolf H, Clausen H, Kjeldsen T, Orntoft TF: Nuclear volume and expression of T-antigen, sialosyl-Tn-antigen, and Tn-antigen in carcinoma of the human bladder. Relation to tumor recurrence and progression. *Cancer* 69:219-227, 1992

Mandel U, Petersen OW, Sorensen H, Vedtofte P, Hakomori S-I, Clausen H, Dabelsteen E: Simple mucin-type carbohydrate in oral stratified squamous and salivary gland epithelia. *J Invest Dermatol* 97:713-721, 1991

Meijer CJLM, Helmerhorst TJM, Rozendaal L, van der Linden JC, Voorhorst FJ, Walboomers JMM: HPV typing and testing in gynaecological pathology: has the time come?. *Histopathology* 33: 83-86, 1998

Moubayed P, Lepere JF, Mwakyoma H, Neuvians D: Carcinoma of the uterine cervix and schistosomiasis. *Int J Gynaecol Obstet* 45: 133-139, 1994

Moubayed P, Ziehe A, Peters J, Mwakyoma H, Schmidt D: Carcinoma of the uterine cervix associated with schistosomiasis and induced by human papillomaviruses. *Int J Gynaecol Obstet* 49: 175-179, 1995

Mulloikandov, MR, Kholodilov NG, Atkin NB, Burk RD, Johnson AB, Klinger HP: Genomic alterations in cervical carcinoma: Losses of chromosome heterozygosity and human papillomavirus tumor status. *Cancer Res* 56:197-205, 1996

Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Tafur L, Gili M, Navarro C, Martos C, Ascunce N, Gonzalez LC, Kaldor JM, Guerrero I, Lorincz A, Santamaria M, de Ruiz PA, Aristizabal N, Shah K: The causal link between human papillomavirus and invasive cervical cancer: a population-based case-control study in Colombia and Spain. *Int J Cancer* 52:743-749, 1992

Muñoz N, Castellsagué X, Bosch FX, Tafur L, de Sanjosé S, Aristizabal N, Ghaffari AM, Shah KV: Difficulty in elucidating the male role in cervical cancer in Colombia, a high-risk area for the disease. *J Natl Cancer Inst* 88:1068-1075, 1996

Nakagawa S, Yoshikawa H, Onda T, Kawana T, Iwamoto A, Taketani Y: Type of papillomavirus is related to clinical features of cervical carcinoma. *Cancer* 78:1935-1941, 1996

Nakamo T, Oka K, Takahashi T, Morita S, Arai T: Roles of Langerhans' cells and T-lymphocytes infiltrating cancer tissues in patients treated by radiation therapy for cervical cancer. *Cancer* 70:2839-2844, 1992

National Cancer Institute Workshop: The 1988 Bethesda system for reporting cervical/vaginal cytological diagnoses. *JAMA* 262: 931-934, 1989

Neto JE, Booth M, Muñoz N, Bosch FX, Meijer CJLM, Walboomers JMM: Human papillomavirus and invasive cancer in Brazil. *Br J Cancer* 69:114-119, 1994

Neto JE: Epidemiologia das lesões relacionadas ao HPV no tracto anogenital. *Em: Lesões relacionadas à infecção por HPV no tracto anogenital*. Pag. 13-16. Editores: Bibbo, M e Filho, AM 1998

Ngelangel C, Muñoz N, Bosch FX, Limson GM, Festin MR, Deacon J, Jacobs MV, Santamaria M, Meijer CJLM, Walboomers JMM: Causes of cervical cancer in the Philippines: a case-control study. *J Natl Cancer Inst* 90:43-49, 1998

Nielsen PA, Mandel U, Therkildsen MH, Ravn V, David L, Reis CA, Wandal HH, Dabelsteen E, Clausen E: Loss of a mucin-like epithelial glycoprotein in oral and cervical squamous cell carcinomas. *Cancer Res* 57: 634-640 1997

Nonnenmacher B, Hubbert NL, Kimbauer R, Shah KV, Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Viscidi R, Lowy DR, Schiller JT: Serologic response to human papillomavirus type 16 (HPV 16) virus-like particles in HPV-16 DNA-positive invasive cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia grade III patients and controls from Colombia and Spain. *J Infect Dis* 172: 19-2, 1995

Ogawa H, Inoue M, Tanizawa O, Miyamoto M, Sakurai M: Altered expression of sialyl-Tn, Lewis antigens and carcinoembryonic antigen between primary and metastatic lesions of uterine cervical cancers. *Histochemistry* 97:311-317, 1992

Olsen AO, Orsavik I, Dillner J, Vestergaard BF, Magnus P: Herpes simplex virus and human papillomavirus in a population-based case-control study of cervical intraepithelial neoplasia grade II-III. *APMIS* 106:417-424, 1998

Osako M, Yonezawa S, Siddiki B, Huang J, Ho JLL, Kim YS, Sato E: Immunohistochemical study of mucin carbohydrates and core proteins in human pancreatic tumors. *Cancer* 71:2191-2199, 1993

Parazzini F, Chatenoud L, la Vecchia C, Negri E, Franceschi S, Bolis G: Determinants of risk of invasive cervical cancer in young women. *Br J Cancer* 77: 838-841, 1998

Park T-W, Fujiwara H, Wright TC: Molecular biology of cervical cancer and its precursors. *Cancer*, 76:1902-1913, 1995

Parkin DM, Muir CS, Whelan SL, Gao Y, Ferlay J, Powell J: Cancer incidence in five continents. Volume VI. Lyon: IARC Scientific publications 120, 1992

Parkin DM, Pisani P, Ferlay J: Estimates of the worldwide frequency of eighteen major cancers in 1985. *Int J Cancer* 54:594-606, 1993

Petry KU, Scheffel D, Bode U, Gabrysiak T, Kochel H, Kupsch E, Glaubitz M, Niesert S, Kuhnle H, Schedel I: Cellular immunodeficiency enhances the progression of human papillomavirus-associated cervical lesions. UICC:836-840, 1994

Prates MD: Tumores malignos na província de Moçambique. Separata do Boletim da Sociedade de Estudos de Moçambique. Ano XXX 126, 1961

Remmink AJ, Walboomers JMM, Helmerhorst TJM, Vooorst FJ, Rozendaal L, Risse EKJ, Meijer CJLM, Kenemans P: The presence of persistent high-risk HPV genotypes in dysplastic cervical lesions is associated with progressive disease: natural history up 36 months. *Int J Cancer* 61:306-311, 1995

Richart RM, Masood S, Syrjanen KJ, Vassilakos P, Kauffman RH, Meisels A, Olszewisky WT, Sakamoto A, Stoler MH, Vooijs GP, Wilbur DC: Human papillomavirus. IAC task force summary. *Acta Cytologica* 42:50-58, 1998

Riffenburgh RH, Olson PE, Johnstone PA: Association of schistosomiasis with cervical cancer: detecting bias in clinical studies. *East Afr Med J* 74: 14-16, 1997

Robert ME, Fu YS: Squamous cell carcinoma of the uterine cervix - a review with emphasis on prognostic factors and unusual variants. *Sem Diagn Pathol* 7: 173-189, 1990

Sakamoto Y, Kamada M, Irahara M, Hasebe H, Daitoh T, Furumoto H, Kishi Y, Mori T: Differences in clinical significance of blood group antigens A, B, and H in carcinoma tissue in the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 25:195-203, 1986

Schiffman MH, Bauer HM, Hoover RN, Glass AG, Cadell DM, Rush BB, Scott DR, Sherman ME, Kurman RJ, Wacholder S, Stanton CK, Manos MM: Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 85:958-964, 1993

Schiffman MH, Schatzkin A: Test reliability is critically important to molecular epidemiology: an example from studies of human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *Cancer Res* 54: 1944s-1947s, 1994

Schiffman MH, Brinton LA: The epidemiology of cervical carcinogenesis. *Cancer* 76:1888-1901, 1995

Schiller JT, Lowy DR: Papillomavirus-like particles and HPV vaccine development. *Sem Cancer Biol* 7: 373-382, 1996

Schmitt FC, Figueiredo P, Lacerda M: Simple mucin-type carbohydrate antigens (T, Sialosyl-T, Tn and Sialisyl-Tn) in breast carcinogenesis. *Virchows Arch* 427:251-258, 1995

Schmitt FC, Marinho A, Amendoeira I: Expression of sialosyl-Tn in fine-needle aspirates from mammographically detected breast lesions: a marker of malignancy? *Diagn. Cytopathol* 18: 325-329, 1998

Schwartz DA, Hyg MS: Carcinoma of the uterine cervix in West Africa. *Gynecol Oncol* 19:365-370, 1984

- Scully RE, Bonfiglio TA, Kurman RJ, Silverberg SG, Wilkinson EJ: Histological typing of female genital tract tumors. World Health Organization. International histological classification of tumours. 1994
- Sell S: Cancer-associated carbohydrates identified by monoclonal antibodies. *Hum Pathol* 21:1003-1019, 1990
- Sherman ME, Schiffman MH, Strickler H, Hildesheim A: Prospects for a prophylactic HPV vaccine: rationale and future implications for cervical cancer screening. *Diagn Cytopathol* 18:5-9, 1998
- Springer GF: T and Tn, general carcinoma autoantigens. *Science* 224: 1198-1206, 1984
- Sternesen TC, Dabelsteen E: Changes in the glycosylation pattern of histo-blood group antigens in benign, pre-malignant and malignant laryngeal epithelial lesions. *APMIS* 27:139-148, 1992
- Suzuk L, Noffsinger AE, Ali M, Fegnoglio-Preiser CM: A high frequency of human papillomavirus (HPV) DNA type 16 in biopsies of cervical squamous cell neoplasia of Uygur women. *Int J Surg Pathol* 4:219-226, 1997
- Szela E, Bachicha J, Miller D, Till M, Wilson JB: Schistosomiasis and cervical cancer in Ghana. *Int J Gynaecol Obstet* 29:263-268, 1993
- Tatemoto Y, Saka M, Tanimura T, Mori M: Immunohistochemical observations on binding of monoclonal antibody to epithelial membrane antigen in epithelial tumors to the oral cavity and skin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 64: 721-726, 1987
- Teglbjaerg CS, Ravn V, Mandel U, Dabelsteen E: Distribution of histo-blood group antigens in cervical and uterine endometrium. *APMIS* 23:100-106, 1991
- ter Meulen J, Eberhardt HC, Luande J, Mgaya HN, Chang-Claude J, Mtiro H, Mhina M, Kashaija P, Ockert S, Yu, et al: Human papillomavirus (HPV) infection, HIV infection and cervical cancer in Tanzania, east Africa. *Int J Cancer* 51:515-521, 1992
- Terasawa K, Furumoto H, Kamada M, Aono T: Expression of Tn and Sialyl-Tn antigens in the neoplastic transformation of uterine cervical epithelial cells. *Cancer Res* 56:2229-2232, 1996
- Torres FO: O cancro em Moçambique. Influência dos factores mesológicos. *Revista de Ciências Médicas da Universidade de Lourenço Marques* 1:107-113, 1969
- Traquinho GA, Júlio A, Thompson R: Bilharziose vesical em Boane, Província de Maputo. *Revista Médica de Moçambique* 5:20-24, 1994
- Traquinho GA, Quintó LI, Nalá RM, Gama Vaz R, Corachan M: Schistosomiasis in northern Mozambique. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 92:279-281, 1998
- van den Brule AJC, Walboomers JMM, du Maine M, Kenemans P, Meijer CJLM: Difference in prevalence of human papillomavirus genotypes in citomorphologically normal cervical smears is associated with a history of cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer* 48:404-408, 1991
- van Nagell JR, Donaldson ES, Wood EG, Parker JC: The significance of vascular invasion and lymphocytic infiltration in invasive cervical cancer. *Cancer* 41:228-234, 1978



van Oortmarssen GJ, Habbema JDF: Epidemiological evidence for age-dependent regression of pre-invasive cervical cancer. *Br J Cancer* 64:559-565, 1991

Verma M, Davidson EA: Glycopinions mini-review: Mucins genes: structure, expression and regulation. *Glycoconj J* 11:172-179, 1994

Villa LL: Aspectos moleculares da oncogénese por Papilomavírus. Em: Lesões relacionadas à infecção por HPV no tracto anogenital. Pag. 51-58. Editores: Bibbo, M e Filho, AM, 1998

Wabinga HR, Parkin DM, Wabwire MF, Mugerwa JW: Cancer in Kampala, Uganda, in 1989-91: changes in incidence in the era of AIDS. *Int J Cancer* 54:26-36, 1995

Walboomers JMM, Meijer CJLM: Do HPV-negative cervical carcinomas exist? *J Pathology* 81:253-254, 1997

Watanabe H, Enjoji M, Imai T: Gastric carcinoma with lymphoid stroma. Its morphologic characteristics and prognostic correlations. *Cancer* 38:232-243, 1976

Williamson AL, Brink NS, Dehaeck CM, Ovens S, Soeters R, Rybicki EP: Typing of human papillomavirus in cervical carcinoma biopsies from Cape Town. *J Med Virol* 43:231-237, 1994

Yonezawa S, Tachikawa T, Shin S, Sato E: Sialosyl-Tn antigen. Its distribution in normal human tissues and expression in adenocarcinomas. *Am J Clin Pathol* 98:167-174, 1992

Zehbe I, Wilander E: Human papillomavirus and invasive cervical neoplasia: a study of prevalence and morphology. *J Pathology* 181:270-275, 1997

## RESUMO

O cancro do colo do útero é a segunda neoplasia maligna mais comum na mulher em todo o mundo, e 80% dos casos ocorrem em países em desenvolvimento. Está bem documentado que tipos de alto risco do vírus do Papiloma humano (HPV) são o factor causal determinante, estando presentes numa alta percentagem dos carcinomas invasores e suas lesões precursoras. Factores adicionais, tais como outras doenças infecciosas, têm sido descritos como podendo ter um papel coadjuvante na cancerização do colo do útero. Alguns autores sugerem uma associação entre a schistosomíase e o cancro do colo do útero em áreas onde esta doença parasitária é hiperendémica. Por outro lado desconhecem-se as modificações resultantes da infecção por HPV e/ou da schistosomíase no padrão de glicosilação, nomeadamente quanto à expressão de antígenos simples das mucinas e de uma glicoproteína de membrana do tipo mucina (gp 230).

Assim, foram objectivos do nosso estudo,

### **1. Determinação da frequência de infecção por HPV em carcinomas do colo uterino numa população de Moçambique e da frequência relativa dos principais tipos oncogénicos de HPV de alto risco**

Através da técnica de PCR com "primers" GP5+/bio-GP6+ , detectámos a presença de HPV em 26/37 casos de carcinomas invasores (70% ) e em 3/3 casos de lesões de CIN III (100%). O tipo mais frequentemente encontrado foi o HPV 16 (54%), seguido do grupo HPV 31/33/35/45 (23%) (quer o HPV 16 quer o grupo HPV 31/33/35/45 foram detectados apenas em carcinomas pavimentosos) e finalmente do HPV 18 em 4% dos casos (1 caso de carcinoma adenoescamoso). Dezanove por cento dos casos tinham HPV que não foi possível sub-tipar com os métodos utilizados. A presença de HPV de alto risco na maioria dos carcinomas da nossa série reforça o papel central do HPV como agente causal no processo de cancerização. A presença de 30% de carcinomas invasores negativos para HPV pode corresponder à presença de "falsos-negativos" ou à existência de deleções da região L1 ou ainda à existência de tipos de HPV não detectáveis pela metodologia utilizada.

### **2. Determinação da frequência de schistosomíase em carcinomas do colo uterino numa população de Moçambique**

Detectámos a presença de schistosomíase, por estudo histológico, em 4/10 colos normais (40%), 3/10 lesões de CIN III (30%) e 4/47 carcinomas invasores (8,5%). A baixa frequência de schistosomíase nos casos de carcinoma invasor, apesar de poder ser parcialmente justificada por problemas de amostragem (quase todos os carcinomas invasores foram estudados apenas com biópsia), sugere que a schistosomíase não desempenha um papel relevante na transformação neoplásica do colo do útero.

### **3. Definição do perfil de expressão dos antígenos simples das mucinas (Tn, STn, T e ST) e da glicoproteína de tipo mucina gp 230 no epitélio do colo uterino normal e em lesões displásicas e neoplásicas**

Estudámos por imunocitoquímica a expressão dos antígenos simples das mucinas Tn, STn, T e ST e da glicoproteína gp 230 em 67 casos (10 colos normais, 10 lesões de CIN III e 47 carcinomas invasores). O antígeno T não foi expresso em nenhum dos casos. Em relação aos restantes antígenos observámos no colo normal: expressão citoplasmática de Tn em 1 caso (10%); expressão membranar de STn em 8 casos (80%) e expressão citoplasmática de ST em 1 caso (10%); a

glicoproteína gp 230 foi expressa na membrana de todos os casos. Nas lesões de CIN III observámos: expressão de Tn em 3 casos (30%) e de STn em 9 casos (90%), todos com localização citoplasmática e membranar; ausência de expressão de ST; expressão de gp 230 em 5 casos (50%). No carcinoma invasor observámos: expressão de Tn em 30 casos (63,8%), de STn em 31 casos (66%) e de ST e gp 230 em 24 casos (51,1%), todos com localização citoplasmática e membranar. Em resumo, a diminuição de gp 230 é detectada desde estadios precoces da transformação neoplásica; a expressão aumentada de Tn é observada em estadios mais avançados da cancerização e a expressão de ST associa-se fortemente com os carcinomas invasores. Observou-se ainda que a gp 230 está intimamente ligada ao processo de diferenciação, quer no colo normal, quer nos carcinomas pavimentosos invasores. A conjugação do padrão de expressão dos antígenos estudados mostra que o Tn, ST e a gp 230 são marcadores de malignidade com alta especificidade, podendo ser úteis na avaliação do diagnóstico e da progressão neoplásicas.

#### **4. Estudo da expressão de Tn, STn, T, ST e gp 230 em carcinomas invasores com e sem infecção por HPV**

A expressão aberrante dos antígenos Tn, STn, Te ST e da gp 230 é independente da presença de HPV e acompanha gradualmente as alterações morfológicas que se observam desde o colo normal, aumentando nas lesões neoplásicas *in situ* e atingindo o seu máximo nas lesões invasoras. Observou-se no entanto uma maior acumulação citoplasmática de Tn, STn e ST em carcinomas invasores positivos para HPV (independentemente do tipo de HPV) sugerindo que a presença de HPV nos carcinomas invasores poderá interferir com etapas iniciais de glicosilação.

#### **5. Comparação das características anátomo-patológicas, do perfil glicoproteico e da infecção por HPV com a presença de schistosomíase em carcinomas invasores**

Através do estudo histológico dos 47 carcinomas invasores observámos presença de schistosomíase em 4 casos (8,5%). As características anátomo-patológicas dos carcinomas invasores e o seu padrão de glicosilação não são influenciados pela presença ou ausência de schistosomíase. Apenas um caso de schistosomíase estava presente na série de 37 casos de carcinomas invasores em que foi avaliada a presença de HPV. Este caso era simultaneamente HPV 16 positivo. A presença de um único caso de schistosomíase na série avaliada para HPV não permite tirar conclusões sobre a possível associação da schistosomíase com a presença ou ausência de HPV.