

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP
Faculdade de Medicina de Botucatu

**Genotipagem de HPV e Imunorreatividade da Ciclina D1 em
Adenocarcinoma do Colo do Útero**

Simony dos Reis Segovia da Silva Back

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Patologia da Faculdade
de Medicina de Botucatu – Universidade
Estadual Paulista – UNESP, para obtenção
do título de Mestre em Patologia.

Botucatu
2013

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP
Faculdade de Medicina de Botucatu

Genotipagem de HPV e Imunorreatividade da Ciclina D1 em Adenocarcinoma do Colo do Útero

Simony dos Reis Segovia da Silva Back

Orientadora: Profa. Adj. Mariângela Esther Alencar Marques

Co-orientadora: Profa. Dra. Márcia Guimarães da Silva

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Patologia da Faculdade
de Medicina de Botucatu – Universidade
Estadual Paulista – UNESP, para obtenção
do título de Mestre em Patologia.

Botucatu

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSANGELA APARECIDA LOBO**

Back, Simony dos Reis Segovia da Silva.

Genotipagem de HPV e Imunorreatividade da Ciclina D1 em Adenocarcinoma do Colo de Útero/ Simony dos Reis Segovia da Silva Back. – Botucatu : [s.n.], 2013

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Mariângela Esther Alencar Marques

Co-orientador: Márcia Guimarães da Silva

Capes: 40105008

1. Adenocarcinoma. 2. Vírus do papiloma. 3. Útero - Doenças.
4. Imunohistoquímica. 5. Proteínas celulares.

Palavras-chave: Adenocarcinoma cervical, Ciclina D1, HPV.

Dedicatórias

*Aos meus pais,
Laércio e Marilza, pelo amor incondicional, pelos sacrifícios
em prol da minha felicidade e pelo apoio em todos os
momentos da minha vida.*

*Ao meu filho Matheus, cuja existência norteia e dá sentido à
minha vida.*

*Ao meu marido Martins, pessoa a quem admiro e me orgulho
muito e que sempre me faz sorrir e amar.*

*À minha irmã Érica e aos meus sobrinhos Beatriz e Miguel,
pelo amor que nos une, apesar da distância.*

Agradecimientos

À minha orientadora Dra Mari pela disponibilidade, empenho, dedicação e paciência. Sou inteiramente grata pela orientação que ultrapassa a dissertação, bem como o imenso carinho nos momentos de dificuldade.

À minha amiga Néia pelo companheirismo, sábios conselhos e boas conversas que me ajudaram a seguir em frente. Por abrir as portas de sua casa para que eu me sentisse em casa também.

À amiga Edna pela amizade e companheirismo. Por fazer a minha caminhada mais suave, sempre se dispondo a ajudar e zelando por mim em todos os momentos. Beijo e queijo!

Aos amigos Gabriel e Carlão por serem tão “gente fina, elegante e sincera”.

Aos amigos Ancelía, Laura, Sônia, Cristina, Beth, Sílvia, Renata, Bruno, Marilza, Lili e Hélio pelos momentos que partilharam comigo nesses anos de UNESP.

À Dra Iza pelo convívio e aprendizado, a quem sou muito grata.

À amiga Vanessa por ser exemplo de simplicidade e verdadeira amizade.

À amiga e Pós-Doc Aline por suas generosas considerações que enriqueceram o trabalho.

À pesquisadora Fabíola que gentilmente me ajudou a melhorar meu projeto.

À Dra Gisele pela participação em minha banca de qualificação.

À Cristina Dorico, Vânia e Luciene por estarem sempre prontas a ajudar.

À equipe do laboratório de Imunoistoquímica: Marcos Roberto Franchi, Luiz Fernando Franchi, Celene Maria Carvalho Gandin e Cristina de Fátima Audi por sua competência, dedicação e apoio na realização da técnica.

Aos funcionários José Carlos, Roberto, Luciano, Cícera, Denise e Lúcia pela disponibilidade e atenção.

À minha co-orientadora Profa Dra Márcia, pelo apoio e confiança.

Ao pessoal do laboratório da Relação Materno-Fetal: Bruna, Amanda, Mariana, Camila, Jossimara, Natália, Natalhíinha, Carolzinha e Heloíse pela acolhida e ajuda nesta caminhada. Em especial à Larissa que me ensinou as técnicas, ao Gabriel que esteve sempre me dando força e apoio, à Carol e Laura por me ajudarem a desvendar os mistérios estatísticos e Eliane companheira de projeto. Muito obrigada!

Ao meu marido que com muita sabedoria e dedicação esteve ao meu lado me encorajando nas horas difíceis e me aplaudindo nos momentos de glória.

Ao meu filho querido, por ser tão compreensivo nos momentos em que estive ausente e por sempre me receber de volta com um abraço apertado.

À minha mãe e à minha sogra Ivalda por assumirem meu papel de mãe nos momentos de minha ausência.

Ao Toxícam, pela disposição do espaço que me foi concedido.

Ao patologista Francíscco Alves Moraes Neto, pela dedicação na coleta dos casos.

Ao Departamento de Patologia do Hospital Amaral Carvalho de Jaú pelo fornecimento dos casos de adeno.

Ao CNPQ pela bolsa de estudos a mim concedida e à FAPESP (11/50558-2) pelo apoio financeiro deste projeto.

À Deus, que permitiu que eu pudesse realizar este trabalho e por colocar pessoas tão especiais no meu caminho.

Sumário

Sumário

Capítulo I - Revisão da Literatura	11
1. Introdução	12
1.1 Epidemiologia do Câncer do Colo do Útero	12
1.2 Classificação do Adenocarcinoma do Colo Uterino.....	12
1.3 O Papillomavirus Humano	15
1.4 Câncer cervical associado ao HPV	18
1.5 Métodos de detecção do vírus e de diagnóstico de cânceres cervicais.....	20
1.6 A proteína Ciclina D1	22
2. Referências Bibliográficas	24
Capítulo II – Justificativa do projeto.....	30
Capítulo III – Objetivos	32
Capítulo IV - Manuscrito	34
Resumo.....	35
Abstract.....	36
1. Introdução	37
2. Materiais e Métodos	39
3. Resultados	43
4. Discussão.....	49
5. Divulgação/Conflito de Interesses.....	51
6. Agradecimentos.....	52
7. Referências	52
Conclusão Final	56
Anexos.....	58

Capítulo I

Revisão da literatura

1. Introdução

1.1 Epidemiologia do Câncer do Colo do Útero

Carcinoma da cérvix é a segunda neoplasia maligna entre as mulheres e a mais comum na população feminina nos países em desenvolvimento. Na Índia, aproximadamente 130.000 mulheres desenvolvem esse câncer a cada ano, constituindo 16% da incidência mundial¹. Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA) é a quarta causa de morte por câncer entre as mulheres no Brasil chegando a 4.800 mortes/ano. Estima-se que mais de 18 mil novos casos são diagnosticados a cada ano. A maioria dos casos ocorre em células escamosas e o segundo tipo mais comum é o adenocarcinoma cervical. Sua incidência é de aproximadamente 20% dos cânceres cervicais na América do Norte²⁻⁵ e, nas últimas décadas, têm sido cada vez mais relatado em mulheres jovens⁶. Em muitos países ocidentais está sendo observado um aumento na incidência desta neoplasia, chegando a ocupar 25% de todos os carcinomas cervicais^{7,8}.

1.2 Classificação do Adenocarcinoma do Colo Uterino

O adenocarcinoma cervical pode ser classificado em dois tipos principais: adenocarcinoma *in situ* (AIS) e adenocarcinoma invasor, havendo ainda subtipos dentro de cada classe. Não há diferença biológica descrita para os subtipos, sendo justificáveis para auxiliar o patologista no reconhecimento da lesão⁹. A classificação dos subtipos dos adenocarcinomas cervicais não é um consenso geral, havendo diferenças entre autores.

O adenocarcinoma *in situ* é caracterizado por alterações confinadas às glândulas endocervicais e ao epitélio superficial. As glândulas podem apresentar formato distorcido, bem como projeções papilares. O epitélio pode ser simples ou estratificado, composto por células cubóides colunares com núcleos de volume aumentado e geralmente hipercromáticos. É comum nucléolos proeminentes. A atividade mitótica é variável e aproximadamente metade dos casos acompanha lesões escamosas¹⁰.

Os subtipos do adenocarcinoma *in situ* são baseados nas alterações citoplasmáticas^{9,10} (tabela 1).

Tabela 1: Subtipos de adenocarcinoma *in situ*.

Subtipo	Descrição Morfológica
Endocervical	Lembra o epitélio endocervical normal, com citoplasma abundante e vacuolizado, frequentemente granular e pálido.
Intestinal	Mostra distensão da parte apical citoplasmática por grande quantidade de mucina, assemelhando-se às células intestinais em anel-de-sinete.
Endometrióide	Similar ao adenocarcinoma de endométrio apresenta arquitetura glandular complexa com padrão papilar (<i>back-to-back</i>), há pouca ou nenhuma mucina.
Adenoescamoso	Composto por elementos malignos escamosos e glandulares. Geralmente o componente escamoso é moderadamente diferenciado com presença de pérolas córneas e componente glandular tipicamente tipo endocervical.

O adenocarcinoma invasor caracteriza-se quando as alterações neoplásicas invadem o estroma e permanecem em glândulas mais profundas. Os tipos mais frequentes são os mucinosos que incluem tipo endocervical, intestinal, anel-de-sinete e adenoma maligno. O segundo tipo mais comum é o endometrióide que se assemelha estruturalmente ao adenocarcinoma de endométrio. Existem ainda os tipos viloglandular, adenocarcinoma de células claras, seroso,

mesonéfrico, adenóide cístico e adenóide basal que são mais raros. A descrição morfológica^{9,10} dos subtipos está na tabela 2.

Tabela 2: Descrição Morfológica dos Tipos de Adenocarcinoma Cervical Invasor.

Adenocarcinoma Mucinoso São exofíticos e polipóides com arquitetura complexa. Células colunares com pseudoestratificação e núcleo atípico basal. A quantidade de mucina no citoplasma é variável podendo haver formação de lagos com reação estromal. 1. Adenocarcinoma tipo endocervical É o tipo mais comum. As glândulas lembram glândulas normais e a maior parte é moderadamente diferenciada. Reação estromal está frequentemente presente e lagos de mucina podem ser ocasionalmente vistos. O núcleo é basal com atipias. Há pseudoestratificação, perda de polaridade, variação no tamanho e forma nuclear, hiper Cromasia e cromatina grosseira. Figuras de mitose e apoptose são frequentes. 2. Adenocarcinoma tipo intestinal Segundo tipo mais comum entre os adenocarcinoma mucinosos. Características morfológicas lembram o adenocarcinoma colorretal. Células em anel-de-sinete são frequentes. Padrão glandular podendo ter áreas papilares. 3. Adenocarcinoma mucinoso tipo anel-de-sinete Raro na sua forma pura, geralmente visto como um componente menor nos tipos endocervical e intestinal. 4. Adenocarcinoma mucinoso de desvio mínimo (MDA) ou Adenoma Maligno Variante extremamente bem diferenciado. A forma glandular é variável. Atipia citológica mínima com pequeno aumento nuclear e ocasionais mitoses. Atipias citológicas malignas são vistas focalmente. Há reação estromal focal ou edema.
Adenocarcinoma Viloglandular bem diferenciado É raro. Formando massa papilar friável que se estende ao canal endocervical. As vilosidades no estroma são longas, delgadas e cobertas por epitélio com atipia citológica leve. A quantidade do estroma viloso pode ser considerável ou mínima. O epitélio pode ser pseudoestratificado, podendo conter ou não mucina intracelular. Frequente presença de células de inflamação aguda e crônica. Usualmente o tumor é bem circunscrito.
Adenocarcinoma Endometrióide Segundo tipo mais comum. Similar ao adenocarcinoma de endométrio apresenta arquitetura glandular complexa com padrão papilar ou cerebriforme. O citoplasma é menos abundante do que o adenocarcinoma tipo endocervical, há pouca ou nenhuma mucina. Epitélio estratificado com núcleo oval perpendicular à base da membrana basal. Usualmente bem diferenciado com misto de padrão glandular e papilar. 1. Adenocarcinoma endometrióide de desvio mínimo Extremamente bem diferenciado, caracterizado por invasão glandular sutil e difícil de caracterizar da parede cervical. Atipia citológica moderada, atividade mitótica e algum grau de reação estromal.
Adenocarcinoma de células claras Relacionado à exposição ao dietilbestrol. Variação no padrão histológico com áreas sólidas, túbulos e cistos revestidos por células exibindo formato de “tachinhas” ou áreas papilares. Células pleomórficas com citoplasma claro e abundante, núcleo atípico e hiper Cromático. Pode ser encontrada mucina extracelular e não intracelular. Presença de glicogênio intracitoplasmático.
Adenocarcinoma Seroso Extremamente raro e histologicamente idêntico ao adenocarcinoma papilar seroso do ovário, endométrio e peritônio. Composto por papilas complexas com brotamento e alta atipia nuclear.

Adenocarcinoma Mesonéfrico Raro, originado do mesonéfron remanescente. Profundamente invasivo com aparência microscópica altamente variável. Apresenta estruturas compostas por células pouco diferenciadas e não contém nenhuma mucina intracelular
Carcinoma adenoescamoso Tumor composto por elementos malignos distintos: escamoso e glandular. O componente escamoso é frequentemente moderadamente diferenciado e pérolas córneas podem ser vistas, o componente glandular é tipicamente endocervical. Tumores bem diferenciados têm pérolas de queratina, pontes intracelulares e glândulas com arquitetura complexa. 1. Células de Aspecto Vítreo É o carcinoma adenoescamoso pobremente diferenciado. Pode ser visto em lençóis ou ilhas de células malignas com citoplasma vítreo, núcleo grande, nucléolo proeminente, sem queratinização. Associado à infiltrado inflamatório eosinofílico.
Carcinoma adenóide cístico O tumor lembra a contrapartida das glândulas salivares. Composto por lençol ou ninhos de células tumorais. Frequentemente marcados por padrão cerebriforme. Raramente o tumor é puramente sólido. Células de escasso citoplasma, núcleo oval com pouca à moderada atipia celular, nucléolo evidente e frequente cariocinese. Pode conter material hialino ou mucina associados à reação estromal.
Carcinoma adenóide basal Tumor com pequenos ninhos de células com configuração lobular lembrando um carcinoma de células basais de pele. Às vezes os ninhos podem ter um lúmen central. As células são pequenas e uniformes, citoplasma escasso, núcleo oval, nucléolo que se destaca e pouca atividade mitótica. Reação estromal não é vista.

Sabe-se também que AIS é precursor do adenocarcinoma invasivo. A duração da progressão dos AIS em invasor foi estimada em 5-13 anos^{11,12}. Segundo Eifel et al (1995), pacientes com adenocarcinoma têm prognóstico pior do que pacientes com carcinoma de células escamosas⁵.

1.3 O Papillomavirus Humano

A infecção pelo Papillomavirus Humano (HPV) é necessária para o desenvolvimento do câncer cervical. As infecções genitais pelo HPV são as mais frequentemente diagnosticadas entre as doenças sexualmente transmissíveis (DST) de origem viral, podendo ter sua prevalência entre 8,7% a 72%, dependendo da população estudada^{13, 14}.

A infecção ocorre através do contato sexual e a transmissão do vírus pode ocorrer mesmo na ausência de lesões. Após o contágio, a ação viral está na dependência de muitos fatores e os acontecimentos seguintes são variáveis, não existindo um marcador que defina a evolução da infecção¹⁵. Porém, de maneira geral, essa evolução depende do inter-relacionamento entre as características do indivíduo, como sua resposta imune e o genótipo viral, que determinam a atividade do vírus¹⁵. Em grande parte dos indivíduos expostos, o HPV permanece inativo, na forma latente por um longo período¹⁶. No hospedeiro o vírus pode ficar na forma episomal ou incorporado ao DNA. Alguns pesquisadores observaram maior frequência de DNA de HPV episomal nos coilocitos e nas camadas mais superficiais do epitélio e presença de DNA de HPV integrado em áreas mais profundas e com atipias celulares¹⁷⁻²⁰. Como a integração do DNA viral ao genoma humano é uma fase crítica para a carcinogênese do câncer cervical, a avaliação do estado físico do vírus pode ser um marcador útil para prever a progressão da lesão²¹.

Os HPVs são vírus DNA de dupla hélice circular, pertencentes à família *Papillomaviridae*. Foram descritos mais de 130 tipos que infectam o homem e representam diferentes repercussões clínicas²². As partículas do HPV medem aproximadamente 55nm de diâmetro, tem forma icosaédrica e não são envelopados. Replicam-se no núcleo de células epiteliais escamosas e seu genoma é composto por fita dupla de DNA circular. O DNA viral é associado com proteínas *histone-like*, possuindo aproximadamente 8000 pares de bases e é encapsulado por 72 capsômeros. O genoma viral pode ser dividido em três regiões: uma região de controle da transcrição e replicação viral (*Long Control Region* – LCR), correspondendo a aproximadamente 10% do seu genoma,

uma região de genes precoce (E-early) e uma região de genes tardios (L-late). Os genes da região tardia codificam proteínas estruturais (L1 e L2), enquanto a região precoce apresenta genes principalmente relacionados às funções regulatórias da transcrição e replicação do DNA do vírus (E1 a E7)²².

Os genes E5, E6 e E7 codificam proteínas relacionadas a funções de estimulação do crescimento. A proteína codificada pelo gene E5 interage com os domínios transmembranas dos receptores das quinases, alterando suas funções. Os genes E6 e E7 são expressos na forma de RNA mensageiro (RNAm) transcrito da região promotora E6/E7²². A proteína codificada pelo gene E6 está associada à degradação do p53, gene supressor tumoral²². A oncoproteína viral E7 se liga à forma hipofosforilada da proteína pRb permitindo a liberação do fator de transcrição E2F. Uma vez liberada, esta proteína promove a ativação transcricional de inúmeros genes envolvidos no controle do ciclo celular, bem como a ciclina D²².

Os HPVs que infectam o trato genital são classificados de acordo com seu potencial na indução do câncer: genótipo de alto risco (16,18,31,33,35,45,51, entre outros) e genótipo de baixo risco (6,11,40,42,54,61)²³.

Os genótipos de alto risco estão associados com lesões precursoras do câncer cervical e ao desenvolvimento de carcinoma cervical invasor. A infecção por HR-HPV (high risk-HPV) é marcador para progressão da lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL), passando pela lesão intraepitelial escamosa de alto grau (HSIL), ao carcinoma cervical invasor²⁴. Embora o genótipo viral seja importante marcador para progressão das lesões cervicais, outros preditores têm sido estudados para determinar o resultado clínico, principalmente de mulheres com LSIL e infectadas por genótipos virais de alto

risco oncogênico. Dentre esses marcadores, o estado de incorporação do HPV ao genoma celular e a carga viral têm sido destaque nos estudos recentes²⁵. O estado de integração do vírus leva a disrupção ou deleção da ORF E2, resultando na falta de expressão da respectiva proteína e consequente aumento da expressão das proteínas E6 e E7^{24,25}. A expressão contínua dessas proteínas contribui para progressão das lesões e para a imortalização das células infectadas, já que elas desregulam o ciclo celular através da interação com diferentes proteínas, como p53 e Rb, importantes reguladoras da proliferação celular^{24, 25}.

Durante a progressão das lesões associadas ao HPV, ocorrem mudanças no padrão de expressão dos genes virais. Nas lesões de baixo grau, a expressão dos genes virais se assemelha ao observado durante a infecção produtiva: as proteínas precoces, como E2, E4, E6 e E7 que são essenciais para replicação do vírus e manutenção do genoma celular nas células das camadas mais basais, são expressas ao longo de todo epitélio. A proteína tardia L1, principal componente do capsídeo viral, é expressa nas camadas mais superficiais do epitélio. Nas lesões de alto grau e no carcinoma invasivo há o predomínio da expressão do oncogene E7 e nota-se expressão reduzida dos genes tardios²⁶.

1.4 Câncer cervical associado ao HPV

A relação entre a presença do vírus HPV e o carcinoma das células escamosas do colo do útero está bem estabelecida na literatura. No entanto, quando se trata do epitélio cervical glandular esta relação ainda permanece incerta, pois a prevalência de DNA de HPV nesses tumores pode variar

significativamente, de 32 a 100%, dependendo do método empregado. Além disso, poucos estudos são realizados com adenocarcinoma cervical o que reduz o poder estatístico para detectar associação deste tumor com o vírus HPV. Estudos que relacionem a população brasileira e o adenocarcinoma cervical também são escassos. No ano de 2000, Pirog et al. (2000) avaliando adenocarcinomas cervicais, incluindo adenocarcinoma *in situ*, tipo endocervical, tipo intestinal, tipo endometrióide, de células claras e adenocarcinoma seroso, demonstraram alta prevalência de DNA HPV²⁷ quando comparado com estudos anteriores²⁸⁻³³. Esses autores apontam que a dificuldade de detecção de HPV no adenocarcinoma pode estar relacionada à menor carga viral nas lesões glandulares quando comparadas às lesões escamosas.

Os tipos de HPV que predominam no carcinoma de células escamosas são os mesmos tipos que predominam no adenocarcinoma cervical. Já se sabe que o HPV16 é o mais frequente no carcinoma de células escamosas e os tipos 16 e 18 são os mais frequentes no adenocarcinoma^{27,34}. No carcinoma de células escamosas, o vírus oncogênico tipo 16, é observado em 50-60% dos casos e o tipo 18 em 10-20% dos casos³⁵⁻³⁸. No adenocarcinoma, o tipo 18 ocorre em aproximadamente 40-60% dos casos de adenocarcinoma e o tipo 16 é observado em 30-55% dos casos. No total, os tipos 16 e 18 são responsáveis por aproximadamente 92% dos casos de adenocarcinoma^{35, 36, 38,39}.

Tornesello et al. (2011) avaliou a presença da infecção pelo HPV16 em 39 casos de adenocarcinoma em pacientes italianas e encontrou positividade em 72% dos casos⁴⁰. Castellsagué et al. (2006) em um estudo multicêntrico, avaliou 112 casos de adenocarcinoma dentre os quais, 18 casos eram

brasileiros e encontrou uma prevalência de 94,4% de infecção pelo HPV⁴¹. A presença deste vírus foi encontrada em 88% dos casos de adenocarcinoma *in situ* e invasivo por Schorge et al. (2004). Este autor também reiterou que a maior expressão da proteína p16 reflete a desregulação do ciclo celular quando há infecção pelo papillomavirus humano⁴².

Análises de HPV tipo-específico também indicam um mau prognóstico para tumores associados ao tipo oncogênico 18, particularmente em adenocarcinoma^{43, 44}.

1.5 Métodos de detecção do vírus e de diagnóstico de cânceres cervicais

São vários os métodos de biologia molecular utilizados atualmente para detecção do HPV, os quais podem ser classificados de acordo com sua sensibilidade. A imunoperoxidase, a imunofluorescência e a hibridização *in situ* detectam o vírus apenas quando presentes em mais de 10 cópias de DNA viral por célula, sendo considerados de baixa sensibilidade. Técnicas que detectam o vírus quando presentes de 1 a 10 cópias do DNA viral por célula são consideradas de moderada sensibilidade, sendo Southern blot, dot blot e hibridização inversa. A reação em cadeia da polimerase (PCR) é método de alta sensibilidade, pois detecta o vírus quando menos de 1 cópia viral estiver presente⁴⁵.

A citologia de colo uterino, ou exame de Papanicolaou, é hoje o exame de rotina preconizado para a detecção de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas do colo do útero. Este método é considerado de extrema eficiência para lesões do epitélio escamoso, contudo quando se trata de lesões relacionadas ao epitélio

glandular cervical essa eficiência se torna muito baixa⁴⁶. Estudo que revisou lâminas de Papanicolaou que tinham tido resultado negativo ou insatisfatório de pacientes com adenocarcinoma cervical comprovado por biópsia, mostrou que 50% dos casos eram falso-negativo ou falso-insatisfatório⁴⁷.

O exame histopatológico é o mais adequado para o diagnóstico deste carcinoma, uma vez que seu achado pode levar a uma terapêutica agressiva. Geralmente essas lesões são tratadas com biópsias em cone ou até mesmo uma histerectomia, o que pode ser complicado para pacientes jovens em idade fértil^{48,49}. Contudo, muitas vezes o diagnóstico histológico de adenocarcinomas cervicais não é uma tarefa fácil para o patologista. Alterações reacionais benignas podem mimetizar uma lesão neoplásica maligna^{50, 51}.

A imunoistoquímica é um método diagnóstico que se baseia no uso de anticorpos marcados para identificar antígenos específicos em tecidos ou em preparados citológicos⁵². Esta técnica pode ser usada como adjuvante à análise morfológica para auxiliar casos duvidosos. Em patologia ginecológica é um técnica que está sendo cada vez mais utilizada, especialmente nas patologias cervicais⁵³. Marcadores como bcl-2, Ki-67 e proteína p16^{INK4A} (p16) já foram descritos para ajudar nas dúvidas relacionadas ao epitélio glandular cervical^{54,55}. A proteína Ki67 (MIB1) é um marcador nuclear de proliferação celular cuja expressão pode ser detectada em todas as fases ativas do ciclo celular (G1, S, G2 e mitose) e está ausente nas células em repouso (G0). Localizado no cromossomo 18, bcl-2 é um proto-oncogene de marcação citoplasmática, que aumenta a sobrevivência da célula pela inibição da apoptose. A proteína p16, marcador nuclear, se liga especificamente ao complexo ciclinaD-cdk4/6 atuando no controle do ciclo celular na interfase G1-S. Estudos

demonstram a alta expressão de p16 em lesões escamosas de alto grau e em lesões de baixo grau associadas a HPV de alto risco⁵⁵.

Recentes trabalhos mostram a importância da adição da marcação para proteína Ciclina D1 ao painel imunoistoquímico para ser usado na distinção entre epitélio endocervical normal, metaplasia tubo-endometrióide, adenocarcinoma *in situ* e adenocarcinoma invasor⁵⁶.

Embora esses anticorpos sejam úteis, nenhum deles é confiável individualmente. Além disso, quando o padrão de coloração é focal ou difuso a avaliação pode se tornar difícil, principalmente nas amostras pequenas, como as por “punch” ou quando a região neoplásica é pequena⁵⁶. Portanto, o uso do painel imunoistoquímico é o mais indicado na distinção de casos difíceis.

1.6 A proteína Ciclina D1

Ciclins são proteínas do sistema de controle do ciclo celular que se ligam às quinases – quinases dependentes de ciclins (CDKs) - atuando na regulação do ciclo. A concentração das ciclins varia ciclicamente durante o ciclo celular, o que ajuda a direcionar a montagem e ativação dos complexos ciclina-CDK. A ativação desses complexos aciona diversos eventos do ciclo celular^{57,58,59}.

Desde a descoberta das CDKs, mais de 13 tipos de ciclins e 25 proteínas homólogas foram identificadas no genoma humano⁵⁷. Há três tipos de Ciclina D - ciclina D1, D2 e D3 - elas interagem com CDK4 e CDK6 atuando sobre a fase G1 do ciclo celular⁵⁷. A Ciclina D1 é codificada pelo gene CCND1 que está localizado no cromossomo 11q13⁶⁰.

Aberrações genéticas nos circuitos de regulação da fase G1 do ciclo celular ocorrem com frequência nas neoplasias e a superexpressão da Ciclina D1 é uma das alterações mais comumente observada^{58,59}. Quando isto ocorre, esta proteína atua como oncogene em diferentes neoplasias humanas⁶¹.

A ausência da Ciclina D1 em lesões associadas ao HPV pode ser entendida como resultado da supressão do controle negativo do p16, que normalmente desacelera o ciclo através da ligação com o complexo CiclinaD/CDK. A suspensão do controle negativo do p16 é consequência da ação da oncoproteína viral E7, que se liga à pRb liberando o fator transcrição E2F promovendo o ciclo celular⁶².

Estudos que avaliaram a expressão da Ciclina D1 e a amplificação do gene (CCND1) em cânceres demonstraram que o padrão de expressão e amplificação é variável para cada tipo de tecido afetado. Moreno-Bueno et al. demonstrou que a maior amplificação do gene CCND1 está ligada com maior expressão de Ciclina D1 em câncer endometrial⁶³. Em carcinoma ductal de mama, a Ciclina D1 pode estar superexpressa mesmo sem a amplificação do gene, especialmente nas lesões de baixo grau⁶⁴. Nas lesões da tireóide, tanto benignas quanto malignas, a expressão de Ciclina D1 está aumentada sem que haja aumento da amplificação gênica⁶⁵. Nos carcinomas de laringe a maior amplificação do gene CCND1 relaciona-se com a presença do vírus HPV e com pior prognóstico⁶⁶. Goia et al. relatou a baixa expressão de Ciclina D1 nas lesões cervicais HPV positivas em carcinomas cervicais. Este estudo também propôs que a avaliação da expressão desta proteína pode ser útil para prever um prognóstico desfavorável na progressão destas lesões⁶⁷.

2. Referências Bibliográficas

1. Sankaranarayanan R, Nene BM, Shastri SS, Jayant K, Muwonge R, Budukh AM, et al. HPV screening for cervical cancer in rural India. *N Engl J Med* 2009; 360(14):1385-94.
2. Smith HO, Tiffany MF, Qualls CR, Key CR. The rising incidence of adenocarcinoma relative to squamous cell carcinoma of the uterine cervix in the United States: a 24-year population-based study. *Gynecol Oncol* 2000; 78:97-105.
3. Wang SS, Sherman ME, Hidesheim A, Lacey JV Jr, Devesa S. Cervical adenocarcinoma and squamous cell carcinoma incidence trends among white women and black women in the United States for 1976-2000. *Cancer* 2004; 100:1035-44.
4. Sherman Me, Wang SS, Carreon J, Devesa SS. Mortality trends for cervical squamous and adenocarcinoma in the United States. *Cancer* 2005; 103(16):1258-64.
5. Eifel PJ, Burke TW, Morris M, Smith TL. Adenocarcinoma as an independent risk factor for disease recurrence in patients with stage IB cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 1995; 59:38-44.
6. Zheng T, Holford TR, Ma Z, Chen Y, Liu W, Ward BA, et al. The continuing increase in adenocarcinoma of the uterine cervix: a birth cohort phenomenon. *Int J Epidemiol* 1996; 25:252-8.
7. Schorge JO, Knowles LM, Lea JS. Adenocarcinoma of the cervix. *Curr Treat Options Oncol* 2004; 5:119-127.
8. Bray F, Carstensen B, Moller H, et al. Incidence trends of adenocarcinoma of the cervix in 13 European countries. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14:2191-2199.
9. Zaino RJ. Glandular lesions of the uterine cervix. *Modern Pathology* 2000; 13(3):261-74.
10. Lee KR, Rose PG. Glandular neoplasia of the cervix. In: Crum C P & Lee K. *Diagnostic Gynecologic and Obstetric Pathology*. Philadelphia: Saunders, 2006: 355-390.
11. Bosch FX, de Sanjose S. Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer: burden and assessment of causality. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003; 31:3-13.
12. Castellsague X, Diaz M, de Sanjose S, Muñoz N, Herrero R, Franceschi S, et al. Worldwide human papillomavirus etiology of cervical

- adenocarcinoma and its cofactors: implications for screening and prevention. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98: 303-15.
13. Shin HR, Franceschi S, Vaccarella S, Roh JW, Ju YH, Oh J, et al. Prevalence and determinants of genital infection with papillomavirus, in female and male university students in Busan, South Korea. *J Infect Dis* 2004; 190:468-76.
 14. Okesola AO, Fawole OI. Prevalence of human papillomavirus genital infections in sexually transmitted diseases clinic attendees in Ibadan. *West Afr J Med* 2000; 19:195-9.
 15. Franco EL, Villa LL, Ruiz A, Costa MC. Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high risk area for cervical cancer. *J Infect Dis* 1995; 180:1415-23.
 16. Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004; 324:17-27.
 17. Durst M, Glitz D, Schneider A, zur Hausen H. Human papillomavirus type 16 (HPV16) gene expression and DNA replication in cervical neoplasia: analysis by in situ hybridization. *Virology* 1992; 189:132-40.
 18. Nagai N, Nuovo G, Friedman D, Crum CP. Detection of papillomavirus nucleic acids in genital precancers with the in situ hybridization technique. *Int J Gynecol Pathol* 1987; 6:366-79.
 19. Skyldberg B, Kalantari M, Karki M, Johansson B, Hagmar B, Walaas L. Detection of human papillomavirus infection in tissue blocks by in situ hybridization as compared with a polymerase chain reaction procedure. *Hum Pathol* 1991; 22:578-82.
 20. Pirami L, Giachè V, Becciolini A. Analysis of HPV 16, 18, 31 and 35 DNA in pre-invasive and invasive lesions of the uterine cervix. *J Clin Pathol* 1997; 50: 600-4.
 21. Park KJ, Soslow RA. Current Concepts in Cervical Pathology. *Arch Pathol Lab Med* 2009; 133:729-37.
 22. Orth G. Papillomaviruses: general features of Human viruses. Elsevier 2008.
 23. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003; 348:518-27.
 24. Yoshida T, Sano T, Kanuma T, Owada N, Sakurai S, Fukuda T, et al. Quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of type

- distribution, viral load, and physical status of human papillomavirus in liquid-based cytology samples from cervical lesions. *Int J Gynecol Cancer* 2008; 18:121-7.
25. Cricca M, Morselli-Labate AM, Venturoli S, Ambretti S, Gentilomi GA, Gallinella G, Costa S, Musiani M, Zerbini M. Viral DNA load, physical status and E2/E6 ratio as markers to grade HPV16 positive women for high-grade cervical lesions. *Gynecol Oncol* 2007; 106:549-57.
 26. Guo M, Sneige N, Silva EG, Jan YJ, Cogdell DE, Lin E, et al. Distribution and viral load of eight oncogenic types of human papillomavirus (HPV) and HPV 6 integration status in cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. *Mod Pathol* 2007; 20:256-66.
 27. Pirog EC, Kleter B, Olgac S, Bobkiewicz P, Lindeman J, Quint WGV, Richart RM, Isacson C. Prevalence of Human Papillomavirus DNA in different histological subtypes of cervical adenocarcinoma. *Am J Pathol* 2000; 157:1055-62.
 28. Van Muyden RC, ter Harmsel BW, Smedts FM, Hermans J, Kuijpers JC, Raikhlin NT, et al. Detection and typing of human papillomavirus in cervical carcinomas in Russian women: a prognostic study. *Cancer* 1999; 85:2011-2016.
 29. Skjoldberg BM, Murray E, Lambkin H, Kelehan P, Auer GU. Adenocarcinoma of the uterine cervix in Ireland and Sweden: human papillomavirus infection and biologic alterations. *Mod Pathol* 1999; 12:675-682.
 30. Ferguson AW, Svoboda-Newman SM, Frank TS. Analysis of human papillomavirus infection and molecular alterations in adenocarcinoma of the cervix. *Mod Pathol* 1998; 11:11-18.
 31. Lee MF, Chang MC, Wu CH. Detection of human papillomavirus types in cervical adenocarcinoma by the polymerase chain reaction. *Int J Gynecol Obstet* 1998; 63:265-270.
 32. Anciaux D, Lawrence WD, Gregoire L. Glandular lesions of the uterine cervix: prognostic implications of human papillomavirus status. *Int J Gynecol Pathol* 1997; 16:103-110.
 33. Parker MF, Arroyo GF, Geradts J, Sabichi AL, Pak RC, Taylor RR, et al. Molecular characterization of adenocarcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol* 1997; 64:242-251.
 34. Uchiyama M, Iwasaka T, Matsuo N, Hachisuga T, Mori M, Sugimori H. Correlation between human papillomavirus positivity and p53 gene

- overexpression in adenocarcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 1997; 65:23-29.
35. Duggan MA, McGregor SE, Benoit JL, Inoue M, Nation JG, Stuart GC. The human papillomavirus status of invasive cervical adenocarcinoma: a clinicopathological and outcome analysis. *Hum Pathol* 1995; 26:319-325.
 36. Tenti P, Romagnoli S, Silini E, Zappatore R, Spinillo A, Giunta P, et al. Human papillomavirus types 16 and 18 infection in infiltrating adenocarcinoma of the cervix: PCR analysis of 138 cases and correlation with histologic type and grade. *Am J Clin Pathol* 1996; 106:52-56.
 37. Altekruze SF, Lacey JV, Brinton LA, Gravitt PE, Silverberg SG, Barnes WA, et al. Comparison of HPV genotypes, sexual and reproductive risk factors of cervical adenocarcinoma and squamous cell carcinoma: Northeastern United States. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 188:657-63.
 38. Muñoz N, Bosch FX, Castellsague X, Díaz M, de Sanjose S, et al. Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *Int J Cancer* 2004; 111:278-85.
 39. Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective: international biological study on cervical cancer (IBSCC) study group. *J Nat Cancer Inst* 1995; 87:796-802.
 40. Tornesello ML, Losito S, Benincasa G, Fulciniti F, Botti G, Greggi S, Buonaguro L, Buonaguro FM. Human papillomavirus (HPV) genotypes and HPV16 variants and risk of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the cervix. *Gynecologic Oncology* 2011; 121: 32–42
 41. Castellsagué X, Díaz M , Sanjosé S , Muñoz N , Herrero R , Franceschi S , Peeling RW , Ashley R , Smith JS , Snijders PJF , Meijer CJFM , Bosch FX. Worldwide Human Papillomavirus Etiology of Cervical Adenocarcinoma and Its Cofactors: Implications for Screening and Prevention. *Journal of the National Cancer Institute* 2006; 98(5): 303-315.
 42. Schorge JO, Lea JS, Elias KJ, Rajanbabu R, Coleman RL, Miller DS, Ashfaq R. P16 as a molecular biomarker of cervical adenocarcinoma. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2004; 190: 668-73.
 43. Burk RD, Tirai M, Gravitt PE, Brinton LA, Kurman RJ, Barnes WA, et al. Distribution of human papillomavirus types 16 and 18 variants in squamous cell carcinomas and adenocarcinomas of the cervix. *Cancer Research* 2003; 63:7215-20.

44. Plaxe SC, Saltzstein SL. Estimation of the duration of the preclinical phase of cervical adenocarcinoma suggests that there is ample opportunity for screening. *Gynecol Oncol* 1999; 75: 55-61.
45. Carmo EFS, Fiorini A. Principais técnicas moleculares para detecção do papilomavirus humano. *Rev Saude Biol* 2007; 2(1):29-31.
46. Lee KR, Flynn CE. Early invasive adenocarcinoma of the cervix. *Cancer* 2000; 89:1048-55.
47. Krane JF, Granter SR, Trask CE, Hogan CL, Lee KR. Papanicolaou Smear Sensitivity for the Detection of Adenocarcinoma of the Cervix – a study of 49 cases. *Cancer Cytopathology* 2001(93): 8-15.
48. Burger RA, Monk BJ, Kurosaki T, et al. Human papillomavirus types 18: association with poor prognosis in early stage cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88:1361-8.
49. Im SS, Wilczynski SP, Burger RA, Monk BJ. Early stage cervical cancers containing human papillomavirus type 18 DNA have more nodal metastasis and deeper stromal invasion. *Clin Cancer Res* 2003; 9:4145-50.
50. Sasieni P, Castanon A, Cuzick J. Screening and adenocarcinoma of the cervix. *Int J Cancer* 2009; 125:525-529.
51. Schorge JO, Knowles LM, Lea JS. Adenocarcinoma of the cervix. *Curr Treat Options Oncol* 2004; 5:119-127.
52. Camargo JLV, Elgui de Oliveira D. Patologia geral: abordagem multidisciplinar. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.
53. McCluggage WG. Immunohistochemistry as a diagnostic aid in cervical pathology. *Pathology* 2007; 39:97-111.
54. Cameron RI, Maxwell P, Jenkins D, McCluggage WG. Immunohistochemical staining with MIB1, bcl2 and p16 assists in the distinction of cervical glandular intraepithelial neoplasia from tubo-endometrial metaplasia, endometriosis and microglandular hyperplasia. *Histopathology* 2002; 41:313-321.
55. Marjoniemi VT. Immunohistochemistry in gynaecological pathology: a review. *Pathology* 2004; 36(2):109–119.
56. Little L, Stewart CJR. Cyclin D1 immunoreactivity in normal endocervix and diagnostic value in reactive and neoplastic endocervical lesions. *Mod Pathol* 2010; 23:611-618.

57. Liu MC, Marshall JL, Pestell RG. Novel strategies in cancer therapeutics: targeting enzymes involved in cell cycle regulation and cellular proliferation. *Curr Cancer Drug Targets* 2004; 4:403-424.
58. Fu M, Wang C, Li Z, Sakamaki T, Pestell RG. Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions. *Endocrinology* 2004; 145:5439-47.
59. Donnellan R, Chetty R. Cyclin D1 and human neoplasia. *J Clin Pathol Mol Pathol* 1998; 51:1-7.
60. Nai, G, Marques, M. Role of ROC1 protein in the control of cyclin D1 protein expression in skin melanomas. *Pathology – Research and Practice* 2011; 207: 174-181.
61. Kim JK, Diehl JA. Nuclear cyclin D1: an oncogenic driver in human cancer. *J Cell Physiol* 2009; 220:292-296.
62. Shorge JO, Lea JS, Elias KJ, Rajanbabu R, Coleman RL, Miller DS, Ashfaq R. P16 as a molecular biomarker of cervical adenocarcinoma. *American Journal of Obst and Gynec* 2004; 190: 668-73.
63. Moreno-Bueno G, Rodriguez-Perales S, Sanchez Estevez C, Hardisson D, Sarrio D, Prat J, Cigudosa JC, Matias-Guiu, Palacios J. Cyclin D1 gene (CCND1) mutations in endometrial cancer. *Oncogene* 2003; 22:6115-6118.
64. Simpson JF, Quan DE, O'Malley F, Odom-Maryon T, Clarke PE. Amplification of CCND1 and Expression of Its Protein Product, Cyclin D1, in Ductal Carcinoma in Situ of the Breast. *American Journal of Pathol* 1997; 151:161-168.
65. Saiz AD, Olvera M, Rezk S, Florentine BA, McCourty A and Brynes RK. Immunohistochemical expression of cyclin D1, E2F-1, and Ki-67 in benign and malignant thyroid lesions. *J Pathol* 2002; 198: 157–162.
66. Cattani P, Hohaus S, Bellacosa A, Genuardi M, Cavallo S, Rovella V, Almadori G, Cadoni G, Galli J, Maurizi M, Fadda G, Neri G. Association between Cyclin D1 (CCND1) Gene Amplification and Human Papillomavirus Infection in Human Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. *Clin Cancer Resear* 1998; 4:2585-2589.
67. Goia CD, Iancu IV, Socolov D, Botezatu A, LazaroIU AM, Huica I, Plesa A, Anton G. The expression of cell cycle regulators in HPV-induced cervical carcinogenesis. *Romanian Biotechnological Letters* 2010; 15(4):5376-5383.

Capítulo II
Justificativa

A incidência do adenocarcinoma cervical tem aumentado sendo o conhecimento da etiologia, epidemiologia, evolução da doença, diagnóstico e tratamento de grande importância.

A confirmação da relação entre a presença do vírus HPV e o desenvolvimento do adenocarcinoma cervical, assim como é verdadeira para o carcinoma escamoso deve ser corroborada, uma vez que são escassos os trabalhos na literatura, especialmente quando se trata de avaliação na população brasileira.

A avaliação imunoistoquímica para p16, Ki-67 e bcl2, já foi descrita como painel, na distinção entre neoplasias e lesões benignas que podem mimetizar o adenocarcinoma. De forma interessante, a expressão de Ciclina D1 tem sido relatada como papel chave na tumorigênese, sendo seu perfil de expressão nas diferentes neoplasias importante fator a ser conhecido. No presente estudo foram avaliados 74 casos de adenocarcinomas *in situ* e invasor. O elevado número de amostras confere vantagem em respeito às análises estatísticas ao nosso estudo quando comparado aos demais trabalhos descritos na literatura.

Portanto, a análise da expressão da Ciclina D1 em conjunto com a identificação de moléculas envolvidas nos processos de proliferação celular (p16 e Ki-67) e apoptose (bcl2), além da detecção e genotipagem do HPV neste tipo de neoplasia traz importante contribuição científica no sentido de fornecer mais informações sobre esta patologia.

Capítulo III

Objetivos

Estabelecer a relação entre o HPV e o adenocarcinoma do colo do útero, bem como a caracterização dos genótipos virais presentes nesta doença.

Avaliar o comportamento da proteína Ciclina D1 em adenocarcinomas cervicais e em condições benignas reativas da endocérvice.

Capítulo IV

Manuscrito

Resumo

A incidência do adenocarcinoma do colo do útero (AC) está aumentando em muitos países. A associação entre a infecção pelo Papillomavirus Humano (HPV) e o AC ainda permanece incerta. A imunoistoquímica pode auxiliar no diagnóstico nos casos duvidosos, pois algumas condições benignas reativas podem mimetizar processos neoplásicos. Marcadores como bcl-2, Ki-67 e proteína p16^{INK4A} (p16) já foram descritos para ajudar nas dúvidas relacionadas ao epitélio glandular cervical. Trabalhos recentes demonstraram a importância da adição da marcação da proteína Ciclina D1 ao painel imunoistoquímico. A Ciclina D1 é uma proteína sensor chave e integrador dos sinais extracelulares nas células em início até meados da fase G1 do ciclo celular, sendo importante na regulação da proliferação e diferenciação celular. Foram estudados 74 casos de biópsias com diagnóstico de adenocarcinoma de colo do útero, sendo 24 de adenocarcinoma cervical *in situ* e 50 de adenocarcinoma cervical invasor. No grupo controle, foram incluídas 79 biópsias de colo do útero que continham endocérvice normal ou em condições benignas reativas. A pesquisa de HPV nas biópsias foi realizada pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os *primers* específicos (MY09/11 e GP5+/GP6+) e a genotipagem foi realizada empregando-se a técnica de PCR Multiplex utilizando *primers* específicos para os genótipos 6, 16, 18 e 33. A imunoistoquímica foi realizada nos 74 casos com diagnóstico de adenocarcinoma cervical (tipo *in situ* e invasor) para os marcadores Ciclina D1, proteína p16, Ki-67 e bcl-2 e em 79 casos controle para a Ciclina D1. O DNA-HPV foi observado em 100% dos casos de adenocarcinoma cervical. O genótipo mais frequente foi o HPV18. A Ciclina D1 se apresentou negativa nos casos da doença e positiva nos casos benignos e reativos. O painel imunoistoquímico associando Ciclina D1, p16 e Ki-67 pode ser ferramenta útil na caracterização e diagnóstico do adenocarcinoma cervical.

Palavras-chave: adenocarcinoma cervical, ciclina D1, HPV.

Abstract

The incidence of cervical adenocarcinoma (AC) is increasing in many countries. The association between Human Papillomavirus (HPV) infection and the AC remains uncertain. Immunohistochemistry may help in the diagnosis in doubtful cases, because some benign reactive conditions can mimic neoplastic processes. Markers such as bcl-2, Ki-67 and protein p16^{INK4A} (p16) have been described to assist with questions related to cervical glandular epithelium. Recent studies have shown the importance of adding protein labeling Cyclin D1 into immunohistochemical panel. The Cyclin D1 protein is a key sensor and integrator of extracellular signals into cells in early to mid G1 phase of the cell cycle, which is important in the regulation of cell proliferation and differentiation. We studied 74 patients with biopsy diagnosis of adenocarcinoma of the cervix, 24 of cervical adenocarcinoma *in situ* and 50 invasive cervical adenocarcinoma. The control group included 79 cervical biopsies containing endocervix normal or benign reactive conditions. The research of HPV in biopsies was performed by the polymerase chain reaction (PCR) using specific primers (MY9/11 and GP5 + / GP6 +) and genotyping was carried out using the Multiplex PCR using primers specific for genotypes 6, 16, 18 and 33. Immunohistochemistry was performed in 74 cases diagnosed with cervical adenocarcinoma (type *in situ* and invasive) for markers Cyclin D1, p16, Ki-67 and bcl-2, and 79 cases control for Cyclin D1. The HPV DNA was observed in 100% of cases of cervical adenocarcinoma. The most common genotype was HPV18. The Cyclin D1 was found negative in cases of illness and positive in benign and reactive samples. The immunohistochemical panel associating Cyclin D1, p16 and Ki-67 may be useful tool in the characterization and diagnosis of cervical adenocarcinoma.

Keywords: cervical adenocarcinoma, cyclin D1, HPV.

1. Introdução

O carcinoma do colo uterino é o segundo câncer mais comum entre as mulheres de todo o mundo. A maioria dos casos ocorre em células escamosas, seguido pelo adenocarcinoma (AC) que acomete as glândulas endocervicais. Embora o *screening* seja um método eficaz para detectar lesões escamosas, ele tem baixa eficácia em adenocarcinomas da cérvix¹. A incidência deste tipo de câncer está aumentando em muitos países, chegando a 25% de todos os carcinomas cervicais nos países ocidentais^{2,3} e de 15 a 20% nos Estados Unidos⁴⁻⁷. O adenocarcinoma cervical pode ser classificado em dois tipos principais: adenocarcinoma *in situ* (AIS) e adenocarcinoma invasor⁸. Sabe-se, que a forma *in situ* é precursora do adenocarcinoma invasivo. A duração da progressão dos AIS em invasor foi estimada em 5-13 anos^{9,10}.

A associação entre a infecção pelo Papillomavirus Humano (HPV) e o carcinoma de células escamosas do colo uterino já foi amplamente descrita. No entanto, quando se trata do adenocarcinoma de colo de útero, esta relação ainda permanece incerta, pois a prevalência de DNA de HPV nesses tumores varia significativamente na literatura. Existem poucos estudos com adenocarcinoma cervical o que reduz o poder estatístico para detectar associação deste tumor com o vírus HPV. Adicionalmente, autores têm sugerido que fatores ambientais e predisposição genética são mais relevantes para que ocorra o aparecimento do adenocarcinoma⁷. O HPV 16 é o mais frequente no carcinoma de células escamosas e os tipos 16 e 18 têm sido relacionados ao adenocarcinoma^{11,12}. Estudos relataram que o tipo 18 ocorre em aproximadamente 40-60% dos casos e o tipo 16 em 30-55%. Juntos, os

tipos 16 e 18 seriam responsáveis por aproximadamente 92% dos casos de adenocarcinoma¹³⁻¹⁶.

A imunoistoquímica é uma técnica auxiliar no diagnóstico que pode ser útil nos casos duvidosos, pois algumas condições benignas reativas podem mimetizar processos neoplásicos. Marcadores como bcl-2, Ki-67 e proteína p16^{INK4A} (p16) já foram descritos para ajudar nas dúvidas relacionadas ao epitélio glandular cervical^{17,18}. Recentes trabalhos demonstraram a importância da adição da marcação da proteína Ciclina D1 ao painel imunoistoquímico utilizado na distinção entre epitélio endocervical normal, metaplasia tubo-endometrióide, adenocarcinoma *in situ* e adenocarcinoma invasor¹⁹.

A Ciclina D1 é codificada pelo gene CCND1 que está localizado no cromossomo 11q13 e interage com CDK4 e CDK6 atuando sobre a fase G1 do ciclo celular. Esta proteína serve como sensor chave e integrador dos sinais extracelulares nas células em início até meados da fase G1 do ciclo celular, sendo importante na regulação da proliferação e diferenciação celular²⁰. Estudos que avaliaram a expressão da Ciclina D1 e a amplificação de seu gene (CCND1) em cânceres demonstram que o padrão de expressão e amplificação é variável para cada tipo de tecido afetado²¹⁻²⁵.

O presente estudo teve como objetivo estabelecer a relação entre o HPV e o adenocarcinoma do colo do útero e avaliar o comportamento da proteína Ciclina D1 resultante das alterações do ciclo celular determinadas pela presença do vírus.

2. Materiais e Métodos

2.1. Casuística

Foi realizado estudo retrospectivo das biópsias com diagnóstico de adenocarcinoma de colo de útero, no período de 1999 a junho 2012, dos arquivos do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP) e do serviço de Patologia do Hospital Fundação Amaral Carvalho de Jaú, São Paulo.

Todas as 74 biópsias com diagnóstico histológico de adenocarcinoma cervical encontradas foram incluídas no estudo, sendo 24 biópsias de adenocarcinoma cervical *in situ* e 50 biópsias de adenocarcinoma cervical invasor. Para constituir um grupo controle, foram incluídas 79 biópsias de colo de útero que continham endocérvice normal ou em condições benignas reativas, tais como hiperplasia microglandular, metaplasia, cervicite crônica, reparação e cistos de Naboth.

As lâminas coradas pela hematoxilina e eosina (HE) foram revisadas por uma Patologista e uma citotécnica (MM e SB) e confirmadas quanto ao diagnóstico de adenocarcinoma cervical e tipo histológico (*in situ* ou invasor). Foi selecionado para análise um bloco representativo de cada caso.

A pesquisa e genotipagem do vírus HPV foram realizadas nos 74 casos de adenocarcinoma.

A imunoistoquímica foi realizada nos 74 casos com diagnóstico de adenocarcinoma cervical (tipo *in situ* e invasor) para os marcadores Ciclina D1, proteína p16, Ki-67 e bcl-2 e em 79 casos controle para a Ciclina D1.

Este estudo teve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP (Protocolo CEP 4380-2012). O trabalho foi

dispensado do termo de consentimento livre e esclarecido por se tratar de amostras de arquivos da rotina patológica, de maneira completamente anônima.

2.2. Pesquisa e Genotipagem de HPV

As amostras foram desparafinizadas e o DNA total foi extraído com solução de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB)²⁶. Para confirmação da extração o gene constitutivo da β -globina, utilizando os *primers* GH20 e PCO4²⁷, foi amplificado. Somente as amostras positivas para β -globina foram utilizadas para análise de pesquisa e genotipagem de HPV. Para a detecção do vírus HPV utilizou-se a técnica de *nested* PCR. Primeiramente, 4 μ L de cada amostra foram amplificados com os *primers* MY09/11²⁸. A segunda PCR consistiu na amplificação de 3 μ L do produto da primeira PCR utilizando-se os *primers* GP5+/6+²⁹. A ciclagem para amplificação (GP5+/6+) seguiu os seguintes parâmetros: 95°C durante 45 segundos para a desnaturação, 47,7°C por 45 segundos para anelamento dos *primers* e 72°C durante 1 minuto para a amplificação, seguido por mais 44 ciclos idênticos a este, concluindo com extensão de 7 minutos a 72°C e armazenamento das amostras a 4°C. Um controle negativo foi utilizado em todas as reações, no qual a mesma quantidade de amostra foi substituída por água Milli-Q. Um controle positivo foi utilizado em todas as reações, usando DNA-HPV extraído de células HeLa. Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% (Invitrogen, São Paulo, Brasil), preparado em tampão Tris-Ácido Bórico-EDTA (TBE) 1X e corado com Gel RedTM (BioLabs, Ipswich, Inglaterra). O tamanho dos produtos amplificados foram comparados com o padrão de 100

pb (GE Healthcare) e visualizados sob transiluminação ultra-violeta. As amostras foram interpretadas como positiva para HPV na presença da banda e negativa para HPV na ausência da mesma.

Para a genotipagem dos HPVs presentes nas amostras, realizou-se a técnica de PCR Multiplex utilizando *primers* específicos para os genótipos 6, 16, 18. Os *Master Mixes* foram preparados com 12,5µl de Mix GoTaq Green (Promega, Valencia, USA), 8µl de água destilada, 1,5µl do conjunto de *primers* (0,2µM de cada) e 3µl do amplificado da reação com os *primers* MY09/11 como amostra, obtendo um volume final de 25µl. Como controles positivos foram utilizados plasmídeos contendo os clones correspondentes dos HPVs. As amplificações foram realizadas em termociclador Eppendorf Mastercycle Personal com o seguinte padrão de ciclagem: 94°C por 5 minutos para ativação da Taq DNA polimerase, seguido de 38 ciclos de desnaturação por 1 minuto à 94°C, 30 segundos à 53,5°C para anelamento e 1 minuto à 72°C para amplificação, concluindo com extensão de 7 minutos a 72°C sendo as amostras armazenadas à 4°C. Para a pesquisa do genótipo 33, realizou-se uma PCR utilizando *primers* específicos para tal genótipo. Os *Master Mixes* foram preparados com 10µl de Mix GoTaq Green (Promega, Valencia, USA), 5,8µl de água destilada, 0,6µl do *primer* sense 10µM, 0,6 do *primer* anti-sense 10µM e 3µl do amplificado da reação com os *primers* MY09/11 como amostra, obtendo um volume final de 20µl. As amplificações foram realizadas em termociclador Eppendorf Mastercycle Personal com o padrão de ciclagem: ativação da Taq DNA polimerase por 4 minutos a 94°C, seguido de 38 ciclos de desnaturação por 1 minuto à 94°C, 1 minuto à 45°C para anelamento e mais 1

minuto à 72°C para amplificação, finalizando com extensão de 7 minutos a 72°C sendo as amostras armazenadas à 4°C.

Um controle negativo foi utilizado em todas as reações, onde a mesma quantidade de amostra foi substituída por água Milli-Q e um controle positivo para cada tipo de HPV foi utilizado em todas as reações.

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% (Invitrogen, São Paulo, Brasil), preparado em tampão Tris-Ácido Bórico-EDTA (TBE) 1X e corado com Gel Red™ (BioLabs, Ipswich, Inglaterra). O tamanho dos produtos amplificados foram comparados com o padrão de 100 pb (GE Healthcare) e visualizados sob transiluminação ultra-violeta. Os genótipos de HPV foram determinados pela visualização e comparação das bandas correspondentes aos controles positivos.

2.3. Imunoistoquímica (IHQ)

Cortes de 3µm de espessura foram extendidos sobre lâminas histológicas previamente tratadas com VectaBond®, sendo uma lâmina para cada marcador. A imunoistoquímica foi realizada pela técnica do ABC onde os anticorpos primários utilizados: anti-Ciclina D1 (clone SP4, Cell Marque, Rocklin, USA; pronto para uso); anti-bcl-2 (clone 124, Cell Marque, Rocklin, USA; pronto para uso); anti-Ki-67 (clone SP6, Cell Marque, Rocklin, USA; pronto para uso); e anti-p16 (clone E6H4, CINtec Histology, Tucson, USA; pronto para uso) foram incubados por um período de 45 minutos. Os imuno-marcadores foram revelados pelo cromógeno 3,3-diaminobenzidina (DAB Substrate Kit Cell Marque, Rocklin, USA) e a contra-coloração realizada com hematoxilina de Harris (Merck, Darmstadt, Alemanha).

A imunorreatividade das amostras foi analisada pelo método semi-quantitativo e a positividade foi graduada do seguinte modo: (0) 0 até 5%, (1+) 6 até 25%, (2+) 26 até 50%, (3+) 51 até 76% e (4+) 76 até 100%³⁰.

2.4. Análise Estatística

A variável idade foi avaliada por média. A comparação entre as frequências dos tipos de HPV e a comparação da análise semi-quantitativa da Ciclina D1 foi realizada empregando-se o teste exato de Fisher. A significância estatística foi fixada em $p < 0,05$. Todos os cálculos foram analisados pelo programa SigmaStat 9.0 (Jandel Corporation).

3. Resultados

A média de idade das pacientes diagnosticadas com adenocarcinoma cervical *in situ* foi de aproximadamente 37 anos e a média de idade das pacientes com adenocarcinoma cervical invasivo de 53 anos. Entre todos os casos, independente do tipo histológico, a média de idade foi de 46 anos. Como demonstrados na tabela 1.

Tabela 1: Associação entre adenocarcinoma do colo do útero e idade das pacientes incluídas no estudo.

Diagnóstico Histológico	N	Idade
Adenocarcinoma <i>in situ</i>	24	37,875 ± 8,126
Adenocarcinoma invasor	50	50,320 ± 12,006
Adenocarcinoma	74	46,284 ± 12,327

Valores expressos em média ± desvio padrão.

A β -globina não foi detectada em 1 caso de adenocarcinoma *in situ* e em 2 casos de adenocarcinoma invasor, sendo excluídos para pesquisa e genotipagem de HPV. O DNA-HPV foi encontrado em 100% dos 71 casos testados (figura 1). Quanto à genotipagem, 39 (54,9%) casos dos 71 testados, foram positivos para pelo menos um dos tipos pesquisados (HPV6, 16, 18 e 33) e 32 (45,1%) casos foram negativos.

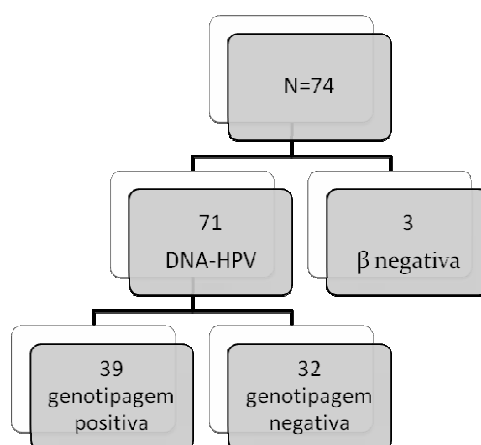


Figura 1: Fluxograma da população estudo para pesquisa e genotipagem de HPV.

O genótipo HPV18 apresentou maior frequência, sendo encontrado em 35,2% (25/71) dos casos de adenocarcinoma do colo do útero (Tabela 2).

Tabela 2: Distribuição dos genótipos de HPV nos tipos de adenocarcinoma cervical.

Casos	HPV (+)	Genotipagem					Infecção Múltipla
		ND	HPV6	HPV16	HPV18	HPV33	
AIS	21	47,6% (10/21)	19% (4/21)	4,76% (1/21)	33,3% (7/21)	19% (4/21)	10,3% (4/39)
AI	50	44% (22/50)	26% (13/50)	6% (3/50)	36% (18/50)	6% (3/50)	23,1% (9/39)
Total	71	45,1% (32/71)	23,9% (17/71)	5,6% (4/71)	35,2% (25/71)	9,9% (7/71)	33,3% (13/39)
		54,9% (39/71)					

AIS: adenocarcinoma *in situ*; AI: adenocarcinoma invasor; ND: genótipo de HPV não detectado; Infecção Múltipla considerada quando mais de 1 tipo viral foi detectado na mesma amostra. A comparação dos grupos foi feita pelo teste exato de Fisher ($p=1,0$).

Das 39 amostras genotipadas, 13 (33,33%) apresentou infecção por múltiplos tipos de HPV (tabela 2), sendo 9 casos em adenocarcinoma invasor e 4 casos de adenocarcinoma *in situ*. A combinação de genótipos encontrados nas amostras estudadas pode ser vista na tabela 3.

Tabela 3: Combinação genótipos de HPV encontrados nas amostras incluídas no estudo.

Combinação de Genótipos*	Adenocarcinoma <i>in situ</i>	Adenocarcinoma invasor
HPV6/16	0	1,4% (1/71)
HPV6/18	1,4% (1/71)	7% (5/71)
HPV6/33	1,4% (1/71)	0
HPV16/33	1,4% (1/71)	0
HPV18/33	1,4% (1/71)	1,4% (1/71)
HPV6/18/33	0	2,8% (2/71)
Total	18,3% (13/71)	36,6% (26/71)

Valores expressos em porcentagem (n/total).

*A combinação de genótipos se referem à infecção dos tipos de HPV concomitantemente.

Na imunoistoquímica três casos foram excluídos por não apresentarem tumor na lâmina, justificáveis por serem casos de adenocarcinoma *in situ* cuja lesão pode ser muito pequena.

A imunorreatividade da proteína Ciclina D1 foi negativa em todos os 71 casos de adenocarcinoma cervical avaliados (Figura 2). Em contraste, este marcador apresentou positividade próximo à 94% nos casos controle (Figura 3). A avaliação semi-quantitativa da Ciclina D1 em condições normais e benignas encontra-se na tabela 4.

Tabela 4: Avaliação semi-quantitativa da imunorreatividade da Ciclina D1 nos casos controle

Resultados	0	1+	2+	3+	4+
Controle	6,3 (5/79)	11,4 (9/79)	31,7 (25/79)	17,7 (14/79)	32,9 (26/79)

Avaliação semi-quantitativa: 0=negativo; 1+=0 até 5%; 2+=6 até 25%; 3+=26 até 75%; 4+=76 até 100%. Valores expressos em (n/total). A comparação dos grupos foi feita pelo teste exato de Fisher ($p<0,05$).

A proteína p16 foi fortemente positiva para adenocarcinoma *in situ* e invasor. Mais de 98% dos casos foram classificados com 3 ou 4+ (Figura 4).

O marcador anti-apoptose bcl-2 foi negativo em 68 (95,77%) casos dos 71 avaliados. Uma positividade que variou entre 1+ a 4+ foi encontrada em 3 casos de adenocarcinoma (4,25%) (Figura 5).

O Ki-67 apresentou-se alto em adenocarcinoma de colo de útero. De forma interessante, a análise semi-quantitativa apresentou variação de 1 a 4+, sendo que a maior parte dos casos de adenocarcinoma *in situ* foram avaliados em 1+ (63.64%) (Figura 6).

Os resultados imunoistoquímicos obtidos estão na tabela 5.

Tabela 5: Padrão de coloração para cada anticorpo nos casos de adenocarcinoma e em glândulas normais.

	Ciclina D1	Proteína p16	Ki-67	Bcl-2
Glândulas Endocervicais Normais	Positivo	Negativo	Baixo	Negativo
Adenocarcinoma <i>in situ</i>	Negativo	Fortemente positivo	Alto	Negativo
Adenocarcinoma invasor	Negativo	Fortemente positivo	Alto	Negativo

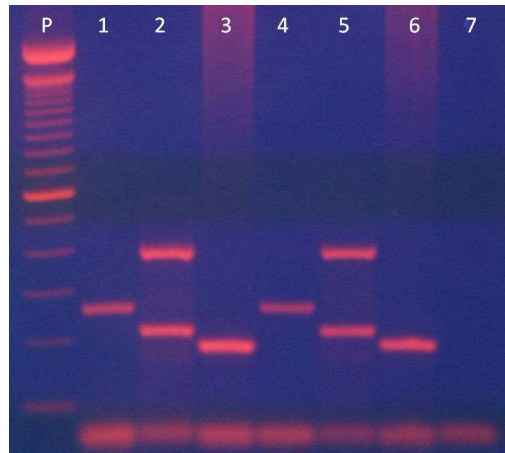


Figura 2: Genotipagem de HPV em gel de agarose. P: peso 100pb; 1: controle positivo HPV6; 2: controle positivo HPV16; 3: controle positivo HPV18; 4: amostra de adenocarcinoma positiva para HPV6; 5: amostra de adenocarcinoma positiva para HPV16; 6: amostra de adenocarcinoma positiva para HPV18; 7: controle negativo.

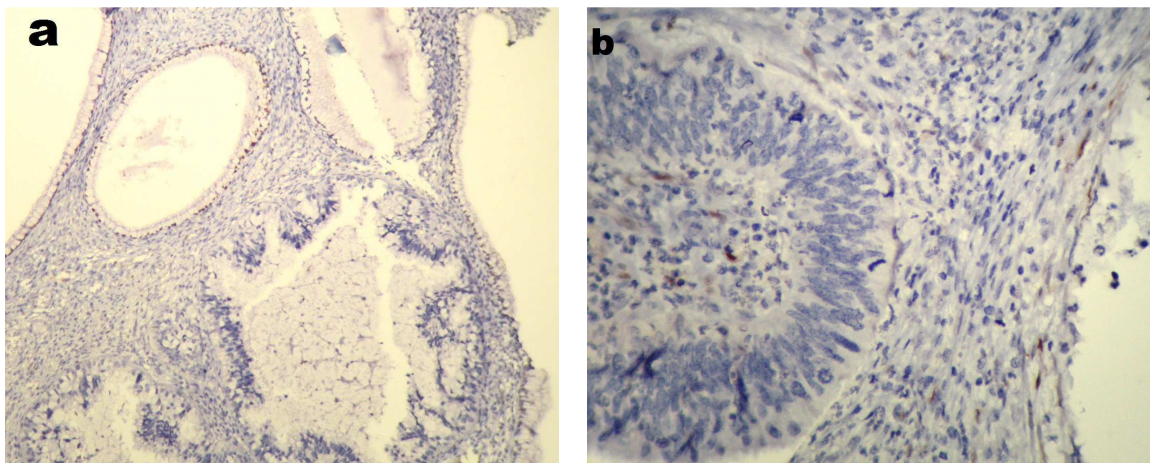


Figura 3: (a) IHQ negativa para Ciclina D1 nas glândulas com adenocarcinoma *in situ* e positiva nas glândulas endocervicais normais (200X). (b) Glândula endocervical neoplásica de adenocarcinoma invasor negativa para Ciclina D1 com presença de algumas células positivas no estroma (400X).

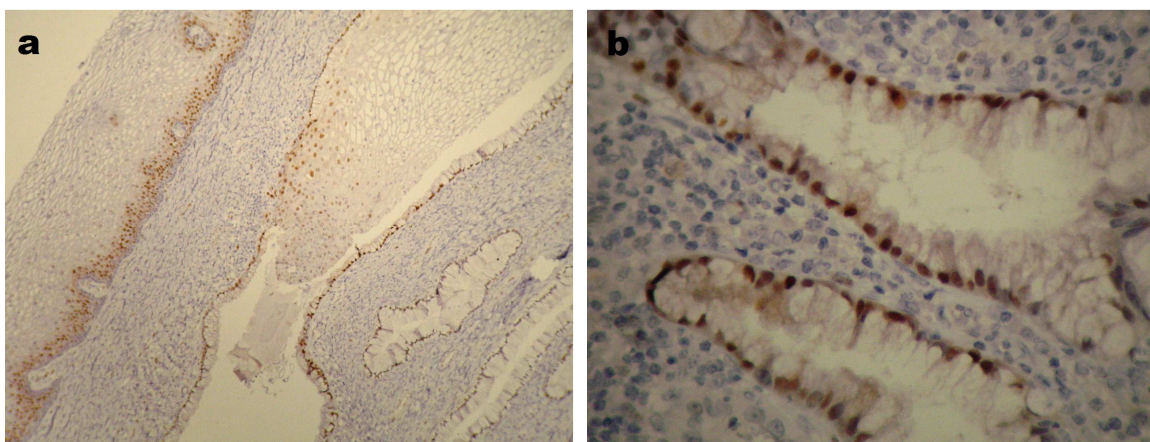


Figura 4: (a) Ciclina D1 positiva em glândulas endocervicais associadas às condições benignas reativas: cervicite e metaplasia imatura (200X) (b) Imunomarcacão para Ciclina D1 fortemente positiva (400X).

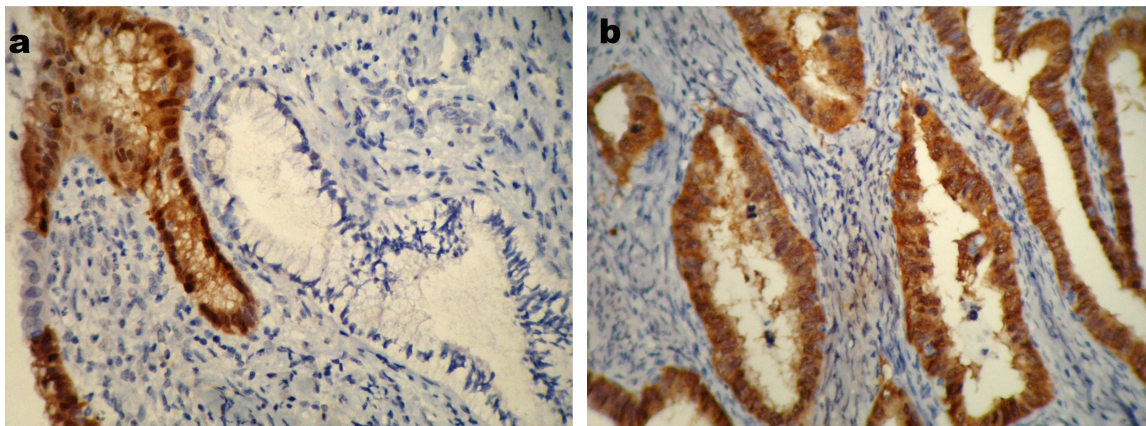


Figura 5: (a) O marcador p16 fortemente positivo nas glândulas neoplásicas em adenocarcinoma *in situ* e negativo no epitélio endocervical normal (400X). (b) Positividade para p16 em adenocarcinoma invasor (400X).

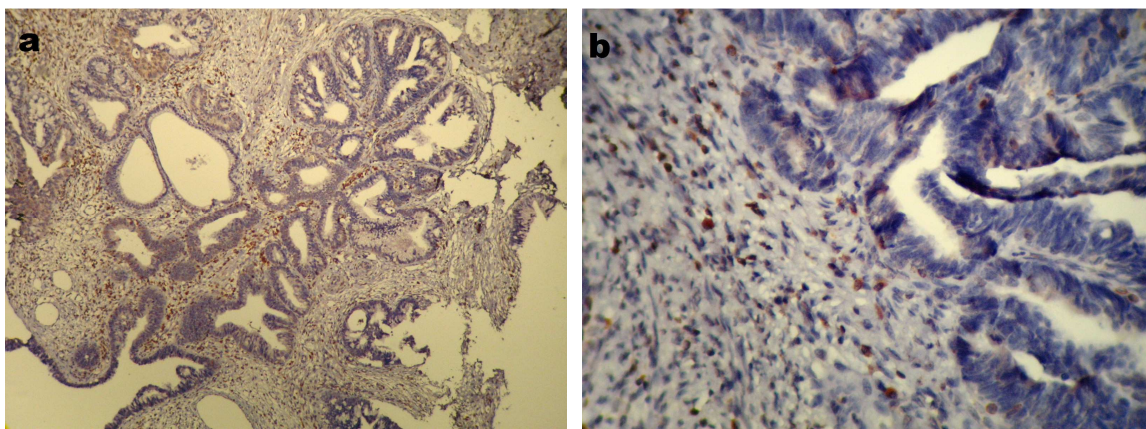


Figura 6: (a) Glândulas de adenocarcinoma *in situ* negativas para bcl-2 com células positivas no estroma (200X). (b) Adenocarcinoma invasor negativo para bcl-2 (400X).

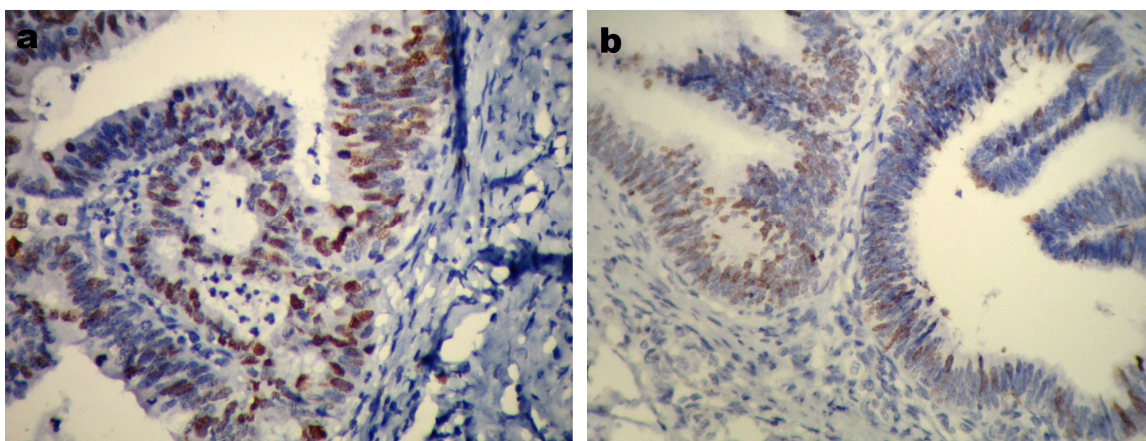


Figura 7: Positividade para Ki-67 em (a) adenocarcinoma *in situ* (400X) e (b) adenocarcinoma invasor (400X).

4. Discussão

A incidência do adenocarcinoma cervical tem aumentado sendo o conhecimento da etiologia, epidemiologia, evolução da doença, diagnóstico e tratamento de grande importância para o controle da doença.

A detecção do DNA-HPV em 100% das amostras de adenocarcinoma estudadas certifica que a infecção é condição necessária para o aparecimento desta doença. Contudo, vale ressaltar que apenas a infecção pelo HPV não é suficiente para levar a transformação maligna, visto que um grande número de mulheres infectadas nunca desenvolverá a doença. A co-infecção com outros agentes, o estilo de vida, a variabilidade do genoma do hospedeiro e susceptibilidade genética são fatores importantes a serem considerados. Além disso, dentre os fatores de risco associados ao HPV para que, de fato ocorra o desenvolvimento do câncer cervical, a persistência da infecção viral é fator primordial^{31, 32}.

A média de idade de todas as pacientes com a doença foi de 46 anos, aliando este dado à história natural da doença, podemos pressupor que a aquisição do vírus tenha ocorrido no início da atividade sexual, visto que o HPV pode permanecer latente durante anos. Foi possível observar também, que o adenocarcinoma *in situ* ocorre em mulheres mais jovens do que as com adenocarcinoma invasor (mediana de 37 e 50 anos, respectivamente). Essa observação é esperada uma vez que a lesão intraepitelial é precursora do adenocarcinoma invasor à semelhança do que ocorre no carcinoma escamoso³³.

Quanto à genotipagem do vírus HPV, entre os 39 casos que foram positivos para pelo menos um dos tipos pesquisados (HPV6, 16, 18 e 33), o

HPV18 teve maior frequência. Este foi documentado em 25 (35,2%) casos, dos quais 15 (21,1%) eram infecção única e 10 (14,1%) infecção mista. Trinta e dois casos foram negativos para os tipos de HPV pesquisados, sendo justificável pela pesquisa ter sido restrita aos tipos 6, 16, 18 e 33. Os HPVs do tipo 16, 18 e 33 são de alto risco e grande prevalência em câncer cervical. O HPV6 é de baixo risco para neoplasia cervical e de alta prevalência nas infecções da mucosa oral³⁴. Este tipo viral esteve presente, na maior parte dos casos, em infecções mistas com HPVs de alto risco. Apesar de frequente, o genótipo 6 não é a causa da transformação maligna. Dentre os casos negativos na genotipagem, podemos inferir que a infecção seja causada por outros tipos de HPV, classificados como alto potencial oncogênico (HPV31, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82). Dos tipos não identificados pelo método utilizado, os HPV39, 45, 59 e 68 têm grande importância, pois se assemelham filogeneticamente com o HPV18 encontrado com maior frequência neste tipo de neoplasia³⁵.

O padrão de expressão e amplificação gênica da Ciclina D1 é variável para cada tipo de tecido afetado³⁶⁻³⁹. O aumento da expressão proteica pode ocorrer mesmo na ausência da amplificação gênica e vice-versa. Goia et al relataram a baixa expressão de Ciclina D1 nos carcinomas cervicais HPV positivos⁴⁰. Em todos os casos de adenocarcinoma cervical a Ciclina D1 foi negativa. A ausência desta proteína em lesões associadas ao HPV pode ser entendida como resultado da supressão do controle negativo do p16, que normalmente desacelera o ciclo através da ligação com o complexo CiclinaD/CDK. A suspensão do controle negativo do p16 é consequência da ação da oncoproteína viral E7, que se liga à pRb liberando o fator transcrição E2F

promovendo o ciclo celular⁴¹. Como reflexo da ação viral, pode-se observar também a proteína p16 fortemente positiva em 100% dos casos de adenocarcinoma.

O marcador de proliferação celular, Ki67 foi alto em todos os casos de adenocarcinoma, variando de 1 a 4+. De forma interessante, a avaliação semi-quantitativa mostrou que em casos de adenocarcinoma *in situ* a expressão é menor quando comparada aos casos de adenocarcinoma invasor. Nas glândulas endocervicais não neoplásicas observou-se positividade menor que 5% justificando a proliferação basal do tecido.

A expressão do bcl-2 foi negativa no adenocarcinoma bem como no tecido glandular normal. Nos casos de adenocarcinoma com grande produção de muco, pode-se observar positividade de fundo, dificultando a avaliação imunoistoquímica precisa.

Em conclusão, o presente estudo demonstrou que o HPV ocorre em todos os casos de adenocarcinoma, sendo o HPV18 o de maior frequência. O painel imunoistoquímico associando Ciclina D1, p16 e Ki-67 pode ser ferramenta útil na caracterização e diagnóstico do adenocarcinoma cervical.

Estudos futuros, com ampliação dos genótipos testados poderão aumentar a eficácia do estudo, pois o detalhamento do tipo viral é importante na caracterização da população para produção de vacinas e monitoramento de eficácia das mesmas.

5. Divulgação/Conflito de Interesses

Os autores declaram não haver qualquer conflito de interesse relacionado à divulgação dos resultados.

6. Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo - FAPESP pelo financiamento deste projeto de pesquisa (11/50558-2).

7. Referências

1. Krane JF, Granter SR, Trask CE, Hogan CL, Lee KR. Papanicolaou Smear Sensitivity for the Detection of Adenocarcinoma of the Cervix – a study of 49 cases. *Cancer Cytopathology* 2001(93): 8-15.
2. Sankaranarayanan R, Nene BM, Shastri SS, Jayant K, Muwonge R, Budukh AM, et al. HPV screening for cervical cancer in rural India. *N Engl J Med* 2009; 360(14):1385-94.
3. Smith HO, Tiffany MF, Qualls CR, Key CR. The rising incidence of adenocarcinoma relative to squamous cell carcinoma of the uterine cervix in the United States: a 24-year population-based study. *Gynecol Oncol* 2000; 78:97-105
4. Wang SS, Sherman ME, Hidesheim A, Lacey JV Jr, Devesa S. Cervical adenocarcinoma and squamous cell carcinoma incidence trends among white women and black women in the United States for 1976-2000. *Cancer* 2004; 100:1035-44.
5. Sherman Me, Wang SS, Carreon J, Devesa SS. Mortality trends for cervical squamous and adenocarcinoma in the United States. *Cancer* 2005; 103(16):1258-64.
6. Eifel PJ, Burke TW, Morris M, Smith TL. Adenocarcinoma as an independent risk factor for disease recurrence in patients with stage IB cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 1995; 59:38-44.
7. Zheng T, Holford TR, Ma Z, Chen Y, Liu W, Ward BA, et al. The continuing increase in adenocarcinoma of the uterine cervix: a birth cohort phenomenon. *Int J Epidemiol* 1996; 25:252-8.
8. Zaino RJ. Glandular lesions of the uterine cervix. *Modern Pathology* 2000; 13(3):261-74.
9. Castellsague X, Diaz M, de Sanjose S, Muñoz N, Herrero R, Franceschi S, et al. Worldwide human papillomavirus etiology of cervical adenocarcinoma and its cofactors: implications for screening and prevention. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98: 303-15.
10. Andersson S, Rylander E, Larson B, Sigurdardottir S, Backlund I, Sällström J, et al. Types of human papillomavirus revealed in cervical adenocarcinoma after DNA sequencing. *Oncol Rep* 2003; 10:175-9.

11. Pirog EC, Kleter B, Olgac S, Bobkiewicz P, Lindeman J, Quint WGV, Richart RM, Isacson C. Prevalence of Human Papillomavirus DNA in different histological subtypes of cervical adenocarcinoma. *Am J Pathol* 2000; 157:1055-62
12. Uchiyama M, Iwasaka T, Matsuo N, Hachisuga T, Mori M, Sugimori H. Correlation between human papillomavirus positivity and p53 gene overexpression in adenocarcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 1997; 65:23-29.
13. Duggan MA, McGregor SE, Benoit JL, Inoue M, Nation JG, Stuart GC. The human papillomavirus status of invasive cervical adenocarcinoma: a clinicopathological and outcome analysis. *Hum Pathol* 1995; 26:319-325.
14. Tenti P, Romagnoli S, Silini E, Zappatore R, Spinillo A, Giunta P, et al. Human papillomavirus types 16 and 18 infection in infiltrating adenocarcinoma of the cervix: PCR analysis of 138 cases and correlation with histologic type and grade. *Am J Clin Pathol* 1996; 106:52-56.
15. Muñoz N, Bosch FX, Castellsague X, Díaz M, de Sanjose S, Hammouda D, et al. Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *Int J Cancer* 2004; 111:278-85.
16. Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective: international biological study on cervical cancer (IBSCC) study group. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87:796-802.
17. Cameron RI, Maxwell P, Jenkins D, McCluggage WG. Immunohistochemical staining with MIB1, bcl2 and p16 assists in the distinction of cervical glandular intraepithelial neoplasia from tubo-endometrial metaplasia, endometriosis and microglandular hyperplasia. *Histopathology* 2002; 41:313-321.
18. Marjoniemi VT. Immunohistochemistry in gynaecological pathology: a review. *Pathology* 2004; 36(2):109–119.
19. Little L, Stewart CJR. Cyclin D1 immunoreactivity in normal endocervix and diagnostic value in reactive and neoplastic endocervical lesions. *Mod Pathol* 2010; 23:611-618.
20. Fu M, Wang C, Li Z, Sakamaki T, Pestell RG. Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions. *Endocrinology* 2004; 145:5439-47.
21. Moreno-Bueno G, Rodriguez-Perales S, Sanchez Estevez C, Hardisson D, Sarrio D, Prat J, Cigudosa JC, Matias-Guiu, Palacios J. Cyclin D1 gene (CCND1) mutations in endometrial cancer. *Oncogene* 2003; 22:6115-6118.
22. Simpson JF, Quan DE, O'Malley F, Odom-Maryon T, Clarke PE. Amplification of CCND1 and Expression of Its Protein Product, Cyclin D1, in Ductal Carcinoma in Situ of the Breast. *American Journal of Pathol* 1997; 151:161-168.

23. Saiz AD, Olvera M, Rezk S, Florentine BA, McCourty A and Brynes RK. Immunohistochemical expression of cyclin D1, E2F-1, and Ki-67 in benign and malignant thyroid lesions. *J Pathol* 2002; 198: 157–162.
24. Cattani P, Hohaus S, Bellacosa A, Genuardi M, Cavallo S, Rovella V, Almadori G, Cadoni G, Galli J, Maurizi M, Fadda G, Neri G. Association between Cyclin D1 (*CCND1*) Gene Amplification and Human Papillomavirus Infection in Human Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. *Clin Cancer Resear* 1998; 4:2585-2589.
25. Goia CD, Iancu IV, Socolov D, Botezatu A, Lazaroiu AM, Huica I, Plesa A, Anton G. The expression of cell cycle regulators in HPV-induced cervical carcinogenesis. *Romanian Biotechnological Letters* 2010;15(4):5376-5383.
26. Vela RAR, Poletini J, Marques MEA, Stolf HO, Candeias JMG, Silva MG, Costa ALB, Matsuo CY, Miot HA. Detecção e genotipagem de papilomavírus humano em lesões de queratoacantoma solitário de pacientes imunocompetentes. *An Bras Dermatol* 2006; 81(5): 443-448.
27. Bauer HM, Ting Y, Greer CE, Chambers JC, Tashiro CJ, Chimera J, et al. Genital human papillomavirus infection in female university students as determined by a PCR-based method. *JAMA* 1991;265:472-7
28. Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AJ, Broker TR, Wolinsky SM. Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells* 1989;7:209–14.
29. de Roda Husman AM, Walboomers JMM, van den Brule AJC, Meijer CJLM, Snijders PJF. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol* 1995;76:1057–62.
30. Nai G, Marques M. Role of ROC1 protein in the control of cyclin D1 protein expression in skin melanomas. *Pathology – Research and Practice* 2011; 207: 174-181.
31. Schlecht NF, Kulaga S, Robitaille J, Ferreira S, Santos M, et al. Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. *JAMA* Dec 2001; 286(24): 3106-14
32. Franco EL, Villa LL, Sobrinho JP, Prado JM, Rousseau MC, Desy M, et al. Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *J Infect Dis* 1999;180:1415-23.
33. Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002 ; 55 : 244 – 65.

34. Rautava J, Willberg J, Louvanto K, Wideman L, Syrjänen K, Grénman S, Syrjänen S. Prevalence, genotype distribution and persistence of Human Papillomavirus in oral mucosa of women: a six-year follow-up study. *Plos One* 2012; 7: 1-9.
35. Orth G. Papillomaviruses: general features of Human viruses. Elsevier 2008.
36. Moreno-Bueno G, Rodriguez-Perales S, Sanchez Estevez C, Hardisson D, Sarrio D, Prat J, Cigudosa JC, Matias-Guiu, Palacios J. Cyclin D1 gene (CCND1) mutations in endometrial cancer. *Oncogene* 2003; 22:6115-6118.
37. Simpson JF, Quan DE, O'Malley F, Odom-Maryon T, Clarke PE. Amplification of CCND1 and Expression of Its Protein Product, Cyclin D1, in Ductal Carcinoma in Situ of the Breast. *American Journal of Pathol* 1997; 151:161-168.
38. Saiz AD, Olvera M, Rezk S, Florentine BA, McCourty A and Brynes RK. Immunohistochemical expression of cyclin D1, E2F-1, and Ki-67 in benign and malignant thyroid lesions. *J Pathol* 2002; 198: 157–162.
39. Cattani P, Hohaus S, Bellacosa A, Genuardi M, Cavallo S, Rovella V, Almadori G, Cadoni G, Galli J, Maurizi M, Fadda G, Neri G. Association between Cyclin D1 (CCND1) Gene Amplification and Human Papillomavirus Infection in Human Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. *Clin Cancer Resear* 1998; 4:2585-2589.
40. Goia CD, Iancu IV, Socolov D, Botezatu A, Lazaroiu AM, Huica I, Plesa A, Anton G. The expression of cell cycle regulators in HPV-induced cervical carcinogenesis. *Romanian Biotechnological Letters* 2010;15(4):5376-5383.
41. Shorge JO, Lea JS, Elias KJ, Rajanbabu R, Coleman RL, Miller DS, Ashfaq R. P16 as a molecular biomarker of cervical adenocarcinoma. *American Journal of Obst and Gynec* 2004; 190: 668-73.

Conclusão Final

A incidência do adenocarcinoma cervical está aumentando em muitos países, especialmente em mulheres jovens. O método de rastreamento lesões cervicais possui alta eficácia para detectar lesões escamosas, no entanto, tem baixa eficácia na detecção dos adenocarcinomas. O diagnóstico histológico deve ser preciso, pois a terapêutica usada nesses casos é agressiva, o que pode ser complicado para pacientes em idade fértil.

O painel imunoistoquímico associando negatividade da Ciclina D1, p16 fortemente positivo e Ki-67 alto pode ser ferramenta útil na distinção do adenocarcinoma cervical de alterações benignas reativas.

A presença de DNA-HPV em 100% das amostras estudadas permite confirmar que este vírus está intimamente relacionado com o aparecimento do adenocarcinoma do colo de útero, sendo o HPV18 o tipo mais frequente.

Estudos futuros, com ampliação dos genótipos testados poderão aumentar a eficácia do estudo, pois o detalhamento do tipo viral é importante na caracterização da população para produção de vacinas e monitoramento de eficácia das mesmas.

Anexos

Desparafinização de Tecido Incluído em Parafina

1. Cortar de 2 a 3 fatias de 5µm de espessura e colocar em tubo Eppendorf® 1,5ml.
2. Adicionar 1000µl de xilol em cada tubo.
3. Misturar por inversão durante 30 minutos em temperatura ambiente (T.A.).
4. Centrifugar durante 5 minutos em T.A. a 13.000 rotações por minuto (rpm).
5. Remover o xilol com pipeta, cuidando para não perturbar o resíduo.
6. Repetir os procedimentos de 2 a 5 por mais 4 vezes.
7. Adicionar 500µl de etanol absoluto em cada tubo.
8. Misturar por inversão durante 5 minutos em T.A.
9. Centrifugar durante 3 minutos a 13.000 rpm em T.A.
10. Remover o etanol.
11. Repetir os procedimentos de 7 a 10 por mais 2 vezes.
12. Secar as amostras em sistema a vácuo por 15 minutos.
13. Adicionar 300µl de TET (Tris-HCl-EDTA-Tween) e 6µl de proteinase K.
14. Incubar a 56°C durante 16-20h.
15. Inativar a proteinase K por aquecimento a 96°C durante 7 minutos.
16. Proceder a purificação orgânica do DNA em solução.

Extração Orgânica de DNA com CTAB
(Brometo de Cetiltrimetilamônio)

1. Adicionar 100µl de solução NaCl 5M.
2. Aquecer a solução CTAB/NaCl a 65°C.
3. Adicionar 100µl de solução CTAB/NaCl pré-aquecida.
4. Agitar.
5. Incubar por 10 minutos a 65°C.
6. Adicionar 750µl de clorofórmio-álcool isoamílico 24:1.
7. Agitar por 10 segundos (até ficar com aspecto leitoso).
8. Centrifugar por 5 minutos a 13.000 rpm.
9. Transferir o sobrenadante para novo tubo e numerar.
10. Adicionar 450µl de etanol absoluto a -20°C.
11. Incubar por 10 minutos a -20°C (ou gelo).
12. Centrifugar por 15 minutos a 13.000 rpm a 4°C.
13. Eliminar o álcool.
14. Acrescentar 450µl de etanol 70% a temperatura ambiente.
15. Centrifugar por 20 minutos a 13.000 rpm a 4°C.
16. Eliminar o álcool.
17. Secar no sistema a vácuo por 5 minutos.
18. Ressuspender em 50µl de T.E. (tris-EDTA) pH=8,5.

Imunoistoquímica (IHQ)

1. Seccionar a amostra na espessura de 3µm e estender os cortes sobre lâminas histológicas previamente tratadas com VectaBond®.
2. Desparafinização em xilol, passagem em etanol absoluto e hidratação.
3. Bloqueio da peroxidase endógena em água oxigenada 3% por 10min em temperatura ambiente.
4. Recuperação antigênica com solução Trilogy® em panela pressurizada por 3 minutos.
5. Incubação dos anticorpos primários (anti-Ciclina D1, anti-Ki-67, anti-p16 e anti-bcl-2) por 45 minutos.
6. Incubação dos anticorpos secundários e terciários (Anti-Mouse/Anti-Rabbit); utilizando-se o método de detecção por polímeros.
7. Revelação com o cromógeno 3,3-diaminobenzidina (DAB).
8. Contra-coloração com hematoxilina de Harris.
9. Desidratação em etanol.
10. Diafanização em xilol.
11. Montagem das lâminas com lamínulas por meio de resina sintética.



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu



Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br
e-mail coordenadoria: tsarden@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde
em 30 de abril de 1997

Botucatu, 01 de outubro de 2.012

OF. 494/2012

Ilustríssima Senhora
Prof^a. Dr^a. Mariângela Esther Alencar Marques
Departamento de Patologia da
Faculdade de Medicina de Botucatu

Prezada Prof^a Mariângela,

De ordem do Senhor Coordenador, informo que o Projeto de Pesquisa - (Protocolo CEP 4380-2012) "Genotipagem de HPV e imunorreatividade da ciclina D1 em Adenocarcinoma de colo de útero", a ser conduzido por Simony dos Reis S. Silva, orientada por Vossa Senhoria, recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião de 01/10/2012.

Situação do Projeto: APROVADO. Os pesquisadores deverão apresentar ao CEP ao final da execução do Projeto o "Relatório Final de Atividades".

Atenciosamente,


Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP