

**DETECÇÃO DE HPV E ANÁLISE DE MARCADORES
IMUNO-HISTOQUÍMICOS EM ADENOCARCINOMAS
DE COLO UTERINO: ESTUDO DA CORRELAÇÃO
COM A RESPOSTA À RADIOTERAPIA**

WENZEL CASTRO DE ABREU

UNB / UFG / UFMS

GOIÂNIA, 2006

Universidade Federal de Goiás

Programa de Pós-Graduação

Em Ciências da Saúde

UNB / UFG / UFMS

**DETECÇÃO DE HPV E ANÁLISE DE MARCADORES
IMUNO-HISTOQUÍMICOS EM ADENOCARCINOMA
DE COLO UTERINO: ESTUDO DA CORRELAÇÃO
COM A RESPOSTA À RADIOTERAPIA**

WENZEL CASTRO DE ABREU

Dissertação apresentada ao consórcio
UNB/UFG/ UFMS para obtenção do Título de
Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marise A. Rebouças Moreira

Ninguém... sabe o que uma única coisa é. É um grande e maravilhoso mistério para todos nós, que qualquer coisa exista ou que nós existamos. E sempre que alguém diz: “ não sei como qualquer coisa veio a existir” ou “ Deus criou tudo”, está simplesmente ressaltando o sentimento do Mistério_ de como tudo é, mas ninguém sabe o que realmente é ou como veio a ser... Se todos os dias você lembrar de sentir o Mistério e lembrar de que você é mais do que parece, e se vir a lembrar de ser o próprio Mistério, então, será feliz todos os dias.

Palavras de uma criança

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho...

...à minha mãe (memória póstuma) que se doou para a família transpondo todos os obstáculos sempre com a pureza de um anjo.

...ao meu pai que me ensinou a lutar por aquilo que acreditamos.

... à minha Tia Criseide, sempre pronta a me ajudar e apoiar, e que se tem caracterizado como uma protagonista em minha vida. Para mim ELA é, foi e sempre será a minha estrela guia.

...aos meus três filhos que são a minha razão de tudo e para tudo na minha existência, e que iluminam o meu caminho com os brilhos de suas luzes.

Se você busca a verdade fora de si, ela se afasta cada vez mais. Hoje, andando sozinho, eu a encontro, aonde quer que vá. Ela e eu somos o mesmo, porém eu não sou ela. Somente se a compreender dessa maneira, você se fundirá com o modo como as coisas são.

Tung Shan

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo melhor presente: a vida. Por poder sonhar, sorrir e ver a luz do sol todos os dias.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a Marise Amaral Rebouças Moreira pelos ensinamentos.

À Prof^a. Dr^a Vera Aparecida Saddi que se fez presente e atuante de modo imprescindível em todas as etapas do desenvolvimento desse trabalho.

Ao amigo Sebastião Alves Pinto pela colaboração na análise imuno-histoquímica do material biológico, a qual realizou com imensurável competência.

Ao Dr. Carlos de Figueiredo Bezerril, Chefe do Setor de Radioterapia do HAJ, pela compreensão e apoio.

À equipe da imuno-histoquímica do Setor de Patologia do HAJ: Karla, Rosana e Gustavo pela efetivação das reações imunohistoquímicas no material a ser avaliado.

Ao Wedder do Setor de Arquivo do Setor de Radioterapia HAJ.

A todos os médicos do Serviço de Ginecologia e Mama HAJ.

Ao Dr. Luis de Paula, Marta e todo IEP pelo apoio e divulgação desse trabalho.

Ao Registro de Câncer de Base Populacional do HAJ, Matinair, Carleane, Edésio.

À Dr^a Maria Paula Curado responsável pelo Registro de Câncer do HAJ.

Ao Setor de Patologia do HAJ, Dr. Élbio, Dr^a Rita e Dr^a Glória e todos os seus

funcionários.

Ao Departamento de Imagenologia e Patologia do HC da UFG-GO.

Ao Laboratório Atalaia.

Ao Arquivo Médico do HAJ e toda sua equipe.

A todos os funcionários da Radioterapia do HAJ que de alguma forma me ajudaram durante essa jornada de trabalho.

As minhas primas Juliana e Luciana pelo apoio.

Um agradecimento especial para a secretária da Pós-Graduação da UFG Valdecina, pela presença marcante nos trâmites burocráticos do início ao final do trabalho.

Ao Prof. Dr. Celmo Celeno Porto pelo apoio fundamental na realização dessa dissertação.

E eu não poderia deixar de citar a pessoa da Prof^a. Dr^a Maria Alves por se fazer presente em momentos de suma importância com todo o seu brilhantismo de educadora.

E por fim agradeço a todos que de alguma forma me ajudaram na concretização de um sonho e mais uma etapa de minha vida, e que aqui não foram citados.

MUITO OBRIGADO A TODOS!!!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Incidência.....	1
1.2 Fatores de risco e etiológicos.....	3
1.3 História natural.....	4
1.4 Definição e classificação histopatológica	5
1.5 Estadiamento clínico.....	7
1.6 Fatores prognósticos.....	9
1.7 Tratamento.....	9
1.8 O HPV e o câncer cervical.....	11
1.9 Receptores hormonais.....	14
1.10 c-erbB-2.....	17
1.11 Ki-67.....	17
2. JUSTIFICATIVAS.....	19
3. OBJETIVOS.....	20
3.1 Gerais.....	20
3.2 Específicos.....	20
4. METODOLOGIA.....	22
4.1 Seleção de casos.....	22
4.2 Espécimes biológicos.....	22
4.3 Extração de DNA dos espécimes biológicos incluídos em parafina...23	
4.4 Reação de PCR para detecção de HPV e genotipagem do HPV-16...23	
4.5.Imuno-histoquímica.....	26

4.6 Radioterapia.....	27
4.7 Análise estatística dos resultados.....	28
5. RESULTADOS.....	30
5.1 Características clínicas.....	30
5.2 Marcadores imuno-histoquímicos.....	33
5.3 Detecção de HPV e genotipagem do HPV-16.....	40
5.4 Diferenças estatísticas entre os parâmetros analisados.....	42
5.5 Análise de sobrevida das pacientes.....	44
6. DISCUSSÃO.....	49
7. CONCLUSÕES.....	53
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fotomicrografia mostrando a detecção imuno-histoquímica de receptores de progesterona em núcleos celulares de adenocarcinoma de colo uterino.....36

Figura 2 - Fotomicrografia mostrando a detecção imuno-histoquímica de receptores de estrógenos em núcleos celulares de adenocarcinoma do colo uterino.....37

Figura 3 - Fotomicrografia mostrando a detecção imuno-histoquímica de Ki-67 em núcleos celulares de adenocarcinoma de colo uterino.....38

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação histopatológica dos adenocarcinomas cervicais
(WHO).....7

Quadro 2 - Estadiamento dos carcinomas cervicais de acordo com os critérios da
Federação Internacional de Ginecologia (FIGO).....8

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição dos primers, tamanho dos replicons e protocolos de ciclagem usados no ensaio de PCR para a detecção de HPV e genotipagem de HPV-16 em amostras de tumores cervicais.....25

Tabela 2 - Características clínicas dos casos de adenocarcinomas e carcinomas adenoescamosos estudados32

Tabela 3 - Expressão dos receptores de estrógenos e receptores de progesterona de acordo com as características clínicas dos tumores.....34

Tabela 4 - Expressão de Ki-67 de acordo com as características clínicas dos tumores.....39

Tabela 5 - Detecção de HPV e genotipagem de HPV-16, por meio de PCR, de acordo com as características clínicas dos tumores.....41

Tabela 6 - Significado estatístico das diferenças entre a expressão dos marcadores imuno-histoquímicos, ou a detecção de HPV e HPV-16, em relação aos parâmetros clinico-patológicos analisados.....43

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Sobrevida geral das pacientes com adenocarcinoma e carcinoma adenoescamoso analisadas.....45

Gráfico 2 – Sobrevida geral das pacientes em relação à expressão dos receptores de estrógenos..... 46

Gráfico 3 – Sobrevida geral das pacientes em relação à expressão dos receptores de progesterona.....47

Gráfico 4 – Sobrevida geral das pacientes em relação à em marcação de Ki-67, com índices até 50% e com índices maiores que 50%.....48

LISTA DE ABREVIACOES

ADC - Adenocarcinoma	LDR - Baixa Taxa de Dose (Low Dose Rate)
BAK - Proteína apoptótica BAK	p16 - Proteína 16
CEC - Carcinoma Espinocelular	p53 - Proteína 53
CO - Contraceptivo Oral	RB - Proteína Retinoblastoma
DES - Dietiestilbestrol	PCR - Reação em Cadeia da Polimerase
DNA - Ácido Desoxirribonucléico	RE - Receptor de Estrógeno
E5 - Proteína precoce (early) 5	RP - Receptor de Progesterona
E6 - Proteína precoce (early) 6	SRC –oncoproteína src (sarcoma)
E7 - Proteína precoce (early) 7	TNM - Estadiamento Clínic: T - tamanho do tumor, N - metástase para linfonodo e M - metástase à distância
EF2 - Fator de alongamento	TC - Tomografia Computadorizada
FIGO - Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia	WHO - Organização Mundial de Saúde
GER – Elemento responsivo aos glicocorticóides	UFG - Universidade Federal de Goiás
H AJ - Hospital Araújo Jorge	UFMS - Universidade Federal do Mato Grosso do Sul
HDR - Alta Taxa de Dose	UNB - Universidade de Brasília
HPV - Papilloma Vírus Humano	
IARC - Agência Internacional para Pesquisa do Câncer	
INCA - Instituto Nacional do Câncer	
INK4A – Inibidor de cinase 4 ^a	

RESUMO

O câncer cervical é o segundo mais comum na população feminina mundial e cerca de 20% desses tumores são classificados como adenocarcinomas. Estudos mais detalhados capazes de identificar marcadores prognósticos e/ou preditivos para os adenocarcinomas são relevantes, objetivando uma melhor abordagem terapêutica para essas neoplasias. Nosso estudo analisou a prevalência do genoma do HPV, a genotipagem do HPV-16 e a imunodeteção de receptores de estrógenos, receptores de progesterona, antígeno nuclear Ki-67 e a hiper-expressão de c-erbB-2 em 43 espécimes de adenocarcinomas cervicais obtidos de pacientes tratadas com radioterapia no Hospital Araújo Jorge, Goiânia-GO. A marcação de RE foi positiva em 9 casos (21,0%) e a marcação de RP foi positiva em 12 (28,0%) casos. A marcação de Ki-67 foi positiva em 36 casos (83,7%) e hiperexpressão de c-erbB-2 foi detectada em apenas 1 caso. Dentre as amostras testadas, 37 (92,5%) apresentaram resultados positivos para detecção do genoma do HPV e o HPV-16 foi detectado em 30 tumores (75,0%). A expressão dos diferentes marcadores imuno-histoquímicos (RE, RP, c-erb-B2 e Ki-67) e os resultados da detecção de HPV, em relação aos parâmetros clínico-patológicos foram avaliados estatisticamente. Entretanto, nenhuma diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) foi detectada para a expressão dos marcadores imuno-histoquímicos ou para a detecção de HPV, exceto para a frequência de marcação do Ki-67. A frequência de marcação do Ki-67, comparada entre as pacientes que permaneceram vivas ao final do trabalho (93,0%) e as que evoluíram ao óbito (61,0%) foi estatisticamente diferente, ou seja, uma proporção maior de pacientes que apresentavam expressão positiva de Ki-67 nos tumores permaneceu viva ao final do acompanhamento. Utilizando o teste de log rank, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada na sobrevida global das pacientes que expressaram os marcadores imuno-histoquímicos analisados em nosso estudo. A detecção de HPV também não apresentou nenhum efeito estatisticamente significativo na sobrevida das pacientes. O tamanho da amostra (43 pacientes) certamente impediu a detecção de possíveis efeitos significativos dos fatores analisados na sobrevida das pacientes.

Palavras-chave: adenocarcinoma cervical; radioterapia; HPV; receptores de estrógenos; receptores de progesterona; Ki-67; c-erbB-2.

ABSTRACT

Cervical câncer is the second most common cancer affecting female population worldwide and about 20% of such tumors are classified as adenocarcinomas. In order to improve therapeutic approaches for cervical adenocarcinomas, it is important to study potential prognostic and predictive markers for such tumors. Our study comprises HPV DNA detection, HPV-16 genotyping and immunohistochemical analysis of estrogen receptor, progesterone receptor, Ki-67 and c-erbB-2 overexpression in 43 adenocarcinoma samples. All the samples were obtained from patients treated with radiotherapy at Hospital Araújo Jorge, Goiânia-GO. Estrogen receptor was detected in 9 cases (21,0%), and progesterone receptor was detected in 12 cases (28,0%). Ki-67 nuclear expression was positive in 36 cases (83,7%), and c-erbB-2 overexpression was detected in only 1 case. HPV DNA was positive in 37 samples (92,5%), and HPV-16 DNA was demonstrated in 30 tumors (75,0%). Statistical analysis was performed in order to analyze the differences in the expression of diverse markers (RE, RP, c-erbB-2 e Ki-67), and HPV DNA detection, according to clinical parameters. No significant difference ($p \leq 0,05$) was demonstrated, except for the Ki-67 expression. Ki-67 expression frequencies compared in patients who were alive at the end of the follow up (93,0%), and patients who died (61,0%) were significantly different. The majority of patients who were alive at the end of analysis demonstrated Ki-67 expression. By using log rank analysis, no significant difference was observed in overall survival of patients expressing the molecular markers analyzed in our study. HPV DNA detection didn't seem to influence overall survival either. The size of our sample, 43 patients, certainly influenced the putative effect of the parameters analyzed on patients overall survival.

Key-words: cervical adenocarcinoma; radiotherapy; HPV; estrogen receptors; progesterone receptors; Ki-67; c-erbB-2.

1. INTRODUÇÃO

1.1 - Incidência:

O câncer de colo uterino é o segundo tipo mais comum entre as mulheres no mundo todo, sendo responsável, anualmente, por cerca de 471 mil novos casos e pelo óbito de aproximadamente 230 mil mulheres. O câncer de colo uterino corresponde a mais de 12% de todos os cânceres da mulher. O número de casos novos esperados para o Brasil em 2006 é de 19.260, com um risco estimado de 20 casos a cada 100 mil mulheres. Excetuando-se os tumores de pele não-melanoma, o câncer de colo do útero é o mais freqüente na região Norte (22 por 100.000). Nas regiões Sul (28 por 100.000), Centro – Oeste (21 por 100.000) e Nordeste (17 por 100.000) representa o segundo tumor mais incidente, e na região Sudeste é o terceiro mais freqüente (20 por 100.000) (INCA, 2005).

A incidência por câncer de colo do útero torna-se evidente na faixa etária de 20 a 29 anos e o risco aumenta rapidamente até atingir seu pico máximo, geralmente na faixa etária de 45 a 49 anos. O câncer de colo do útero continua sendo a segunda principal causa de morte entre as mulheres com idades entre 20 e 39 anos, perdendo apenas para o câncer de mama (DeVitta, 2001). Quase 80% dos casos novos de câncer de colo do útero ocorrem nos países em desenvolvimento e em algumas regiões é o câncer mais comum entre as mulheres (INCA, 2005).

Dentre os cânceres cervicais, o carcinoma espinocelular (CEC) é de longe o mais freqüente, enquanto os adenocarcinomas são relativamente raros. Entretanto, nas últimas décadas, a prevalência desses tumores tem aumentado,

chegando a perfazer 10 a 20% dos tumores cervicais. Enquanto a incidência de CEC do colo uterino diminuiu nas mulheres mais jovens nos Estados Unidos, a partir do início de 1970 e meados de 1980, a taxa de incidência de adenocarcinomas mais que dobrou em mulheres abaixo dos 35 anos, durante o mesmo período (Peters, 1986; Schwartz, 1986). Aumentos similares têm sido relatados na Inglaterra (Chilvers, 1987). Vários estudos têm relatado o aumento da incidência, especialmente em mulheres jovens, brancas e com idades entre 20 e 30 anos (DeVitta, 2001). A incidência do adenocarcinoma invasivo tem aumentado nas mulheres negras também, porém, com significância estatística somente nas mulheres brancas (Zhen, 1996). As causas atribuídas ao aumento da incidência dos adenocarcinomas cervicais invasivos e *in situ* são discutíveis e ainda pouco conhecidas, mas pode-se atribuir uma melhora nos métodos de detecção com a adição do escovado endocervical para as citologias de rastreamento, permitindo o diagnóstico de lesões assintomáticas. Entretanto, o escovado endocervical foi introduzido somente no início de 1990 e a incidência desses adenocarcinomas tem aumentado desde 1970 (Madeleine, 2001). Outra fonte de potencial melhora na detecção de adenocarcinomas pode ser em decorrência do aumento da própria incidência, que por sua vez, tornou essas neoplasias amplamente discutidas na literatura, trazendo com isso a atenção de mais patologistas (Madeleine, 2001). Uma outra hipótese que pode ser considerada é a verificação histológica que atualmente é feita em maior proporção dos casos diagnosticados.

1.2 - Fatores de risco e etiológicos:

Dentre os fatores de risco para o desenvolvimento dos carcinomas cervicais, o alto número de gestações tem sido consistentemente descrito, tanto para os adenocarcinomas como para os carcinomas escamosos, independente do comportamento sexual (Parazzini *et al.*, 1990; Kjaer & Brinton, 1993; Schiffman & Brinton, 1995; Ferenczy, 1997; De Gonzales *et al.*, 2004). Gestações múltiplas podem ter um efeito traumático cumulativo ou imunossupressivo, facilitando a aquisição da infecção pelo HPV. A presença de receptores de estrógenos e de progesterona na endocérvice e em lesões endocervicais relacionadas ao HPV (Shen *et al.*, 1994; Fujiwara *et al.*, 1997; Lu *et al.*, 1999; Suzuki *et al.*, 2000) sugere que o epitélio endocervical é responsivo aos hormônios esteróides e que estes podem eventualmente atuar como cofatores do processo de carcinogênese. Indicadores de atividade sexual também representam um risco consistente para o desenvolvimento do câncer cervical, incluindo a precocidade da primeira relação sexual, o alto número de parceiros ao longo da vida e o comportamento do parceiro do sexo masculino. (Parazzini *et al.*, 1990; Schiffman & Brinton, 1995; De Gonzales *et al.*, 2004). O reconhecimento dos fatores de risco ligados ao comportamento sexual e ao câncer de colo uterino levou à descoberta da importante relação entre o HPV e o câncer cervical. Evidências crescentes apóiam a hipótese de uma relação importante entre hormônios esteróides e adenocarcinomas cervicais. O risco do câncer cervical é maior para mulheres que fizeram uso prolongado de anticoncepcionais orais (5 anos ou mais), sendo mais relevante para o aparecimento de adenocarcinomas (Parazzini *et al.*, 1990; Schiffman & Brinton, 1995; Thomas & Ray, 1996; Smith *et al.*, 2003; De Gonzales

et al., 2004). Outro fator de risco que vem sendo relacionado ao aparecimento do adenocarcinoma cervical inclui a obesidade e a distribuição da gordura corporal, traduzindo mais uma vez a possível relação hormonal com os tumores glandulares (Lacey *et al.*, 2003).

1.3 - História natural:

O carcinoma invasivo do colo do útero é antecedido pelo carcinoma *in situ* por vários anos, na maioria dos casos (Pedersen *et al.*, 1994). Para se caracterizar como invasivo o processo maligno tem que romper a membrana basal do epitélio e invadir o estroma cervical (Christopherson *et al.*, 1964). Quando o tumor do colo do útero não é tratado, ele pode disseminar para os fôrnices vaginais adjacentes ou para os tecidos paracervicais ou parametriais. Pode ocorrer também invasão da bexiga, do reto ou de ambos. A disseminação por meio do plexo venoso e veias paracervicais ocorre menos frequentemente, mas é relativamente mais comum nos estádios avançados da doença (Perez, 2004). A incidência de metástase linfonodal pélvica é relacionada com a profundidade de invasão do estroma pelas células malignas (Ruch *et al.*, 1976). De acordo com o estadiamento clínico proposto pela FIGO, a incidência de metástase em linfonodos pélvicos no cancer cervical é de 15%, 30% e 50% para o estágio clínico IB, IIB e IIIB, respectivamente (Gunderson, 2000). A doença pélvica recorrente é vista em cerca de dois terços das pacientes que recidivam após tratamento (Gunderson, 2000). O sítio de metástase extra-pélvica mais comum é o pulmão, seguido pelos linfonodos para-aórticos (Fagundes *et al.*, 1992). Metástase óssea em coluna lombar já não é considerada tão freqüente, pois estudos com tomografia

computadorizada (TC) mostraram tratar-se de extensão direta do tumor a partir dos linfonodos para-aórticos (Kim *et al.*, 1987).

Várias séries analisam as taxas de sobrevida relativa para os adenocarcinomas cervicais e demonstram que a sobrevida das pacientes com estádios IA e IB, 5 anos após o diagnóstico, varia de 79-98% (Mathews *et al.*, 1993; Steren *et al.*, 1993; McLellan *et al.*, 1994; Shingleton *et al.*, 1995; Kaku *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 2002; Lea *et al.*, 2003; Baalbergen *et al.*, 2004). A presença de metástases em linfonodos regionais reduz significativamente esses índices, ou seja, as taxas de sobrevida 5 anos após o diagnóstico caem para 63-73% (Nakanishi. *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2002). Adenocarcinomas cervicais com estádios mais avançados (IIB-IVB) apresentam taxas de sobrevida significativamente mais baixas, ou seja, em torno de 37% para pacientes com estágio II e menos de 9% para as pacientes com estágio III e IV (Leveque *et al.*, 1998; Lea *et al.*, 2002; Baalbergen *et al.*, 2004).

1.4- Definição e classificação histopatológica:

Os adenocarcinomas foram reconhecidos como uma entidade distinta por Noris, em 1936 (Syrjänen & Syrjänen, 1999). Eles se originam nas glândulas endocervicais, mas raramente podem surgir a partir de remanescentes dos ductos mesonéfricos (Cotran *et al.*, 1994). Os adenocarcinomas podem se apresentar de forma invasiva ou *in situ*. O diagnóstico dessa neoplasia *in situ* é feito quando as células glandulares endocervicais normais são substituídas por células colunares irregulares altas com núcleo hipercromático, estratificado e atividade mitótica aumentada, mas a arquitetura padrão das glândulas endocervicais é mantida e

não existe invasão estromal óbvia (DeVitta, 2001). O diagnóstico do adenocarcinoma *in situ* é algo controverso. Anormalidades endocervicais como displasia, metaplasia tubária, endometriose endocervical, mudanças patológicas ou histológicas devido à biópsia prévia, cervicite e uso de contraceptivos orais têm sido relacionados ao diagnóstico equivocado do adenocarcinoma *in situ* (51, 52, 53). Aproximadamente 20 – 50% das mulheres com adenocarcinoma cervical *in situ* também apresentam neoplasia intraepitelial escamosa (Azodi *et al.*, 1999; Jaworski *et al.*, 1988). A morfologia variada desses tumores resulta em dificuldades para o diagnóstico diferencial. Estudos para esclarecer a classificação morfológica dos adenocarcinomas e estabelecer um consenso para a definição dos principais subtipos histológicos vêm sendo desenvolvidos (Alfsen *et al.*, 2000; Young & Clement, 2002; Silverberg & Loffe, 2003). Os adenocarcinomas de colo uterino podem ser puros ou mistos e apresentam vários padrões histológicos, sendo o mais comum o tipo endocervical que corresponde a cerca de 90% dos casos (Parazzini *et al.*, 1990; Kjaer *et al.*, 1993; Abrão, 1995; Schiffman *et al.*, 1995; Zhen *et al.*, 1996; Vizcaino *et al.*, 1998; Landis *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2000). A classificação histopatológica dos adenocarcinomas cervicais proposta pela Organização Mundial de Saúde encontra-se descrita no quadro 1 (Silverberg & Loffe, 2003). Os padrões histológicos descritos não são mutuamente exclusivos e mais de um padrão histopatológico pode ser reconhecido em carcinomas ocasionais (Syrjänen & Syrjänen, 1999). A graduação histológica dos adenocarcinomas cervicais é feita de acordo com o sistema FIGO (Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia), com base na avaliação quantitativa do componente glandular tumoral: tumores grau I apresentam menos que 5% de

crescimento glandular sólido; os de grau II, apresentam mais que 5% e menos que 50% de crescimento glandular sólido e os de grau III apresentam mais que 50% de crescimento glandular tumoral sólido (Silverberg & Loffe, 2003).

Quadro 1. Classificação histopatológica dos adenocarcinomas cervicais puros, WHO (Silverberg & Ioffe, 2003).

Adenocarcinoma <i>in situ</i>	
Adenocarcinoma	Mucinoso
	<ul style="list-style-type: none">• endocervical• intestinal• em anel de sinete
	Endometrióide
	Células claras
	Seroso
	Mesonéfrico

1.5- Estadiamento clínico:

O estadiamento clínico dos adenocarcinomas cervicais é feito de acordo com as recomendações da Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO), definidas em 1995. O estadiamento do câncer cervical recomendado pela FIGO encontra-se descrito no quadro 2 (Pecorelli & Odicino, 2003). O sistema usado para carcinomas cervicais contempla tanto carcinomas escamosos como adenocarcinomas e carcinomas adenoescamosos.

Quadro 2. Estadiamento dos carcinomas cervicais de acordo com a Federação Internacional de ginecologia e Obstetrícia - FIGO, 1995 (Pecorelli & Odicino, 2003).

Estádio I

Carcinoma cervical limitado à cérvix (extensão ao corpo deve ser desprezada).

Estádio IA

Carcinoma invasivo, somente diagnosticado pela microscopia.

Estádio IA1

Invasão estromal com até 3mm de profundidade e extensão horizontal até 7mm

Estádio IA2

Invasão estromal até 3mm e menor ou igual a 5mm em profundidade e extensão horizontal até 7 mm.

Estádio IB

Lesões clinicamente visíveis, limitadas ao colo ou lesão microscópica maior que IA.

Estádio IB1

Lesão clinicamente visível até 4cm em sua maior dimensão.

Estádio IB2

Lesão clinicamente visível maior que 4 cm em sua maior dimensão.

Estádio II

O carcinoma invade além da cérvix, mas não atinge a parede pélvica ou o terço inferior da vagina.

Estádio IIA

Não há invasão parametrial evidente.

Estádio IIB

Evidente invasão parametrial.

Estádio III

O carcinoma se estende à parede pélvica e/ou compromete o terço inferior da vagina e/ou causa hidronefrose ou exclusão renal.

Estádio IIIA

O carcinoma compromete o terço inferior da vagina, mas sem extensão à parede pélvica.

Estádio IIIB

O carcinoma se estende à parede pélvica e/ou causa hidronefrose ou exclusão renal.

Estádio IV

O carcinoma se estende além da pélvis verdadeira e/ou invade clinicamente a mucosa vesical e/ou retal.

Estádio IVA

O carcinoma invade os órgãos adjacentes.

Estádio IVB

O carcinoma apresenta metástase à distância.

1.6 - Fatores prognósticos:

A maior parte dos estudos voltados para definição de fatores prognósticos para o câncer cervical invasivo aborda primariamente o CEC (Chen *et al.*, 1998). O número reduzido de casos de adenocarcinomas dificulta a análise de grandes séries (Angel *et al.*, 1992; Piura *et al.*, 1996). O estadiamento clínico, o grau de diferenciação e o comprometimento linfonodal são fatores prognósticos independentes para os ADCs cervicais (Baalbergen *et al.*, 2004). Estes autores encontraram, em uma série de 305 pacientes com ADC e seguimento de 61 meses, uma sobrevida global em 5 anos de 60%, sendo 79% e 37% para os estádios I e II, respectivamente. Enquanto para os estádios III e IV a sobrevida foi menos de 9% (Baalbergen *et al.*, 2004).

1.7- Tratamento:

A escolha da terapia mais apropriada e a formulação do prognóstico para uma paciente com câncer são feitas com base no conhecimento clínico sobre a extensão da doença e seu comportamento biológico. Para os carcinomas cervicais, a histerectomia e a radioterapia constituem os métodos terapêuticos mais utilizados (Stehman *et al.*, 2003). Carcinomas cervicais *in situ* são tipicamente tratados com conização ou histerectomia simples. Pacientes com

estádio IA1 são tratadas com histerectomia simples ou em casos especiais somente com conização da cérvix. Pacientes com estágio IA2 são tratadas com histerectomia radical e linfadenectomia pélvica, entretanto, a parametriaectomia é aconselhada quando existem evidências de metástases. Esses estágios também podem ser tratados com braquiterapia de baixa taxa de dose exclusiva prescrevendo-se 60 -75Gy no ponto A. O tratamento para os estágios IB e IIA pode ser cirúrgico ou radioterápico. Apesar da preferência pelo tratamento cirúrgico, este pode ser com radiação ionizante devido ao fato da paciente apresentar condições clínicas desfavoráveis, ou devido às características da lesão. Quando tratadas com histerectomia radical, linfadenectomia e parametriaectomia (Stern *et al.*, 1993; Lea *et al.*, 2002) receberão radioterapia adjuvante se forem evidenciadas metástases em linfonodos pélvicos ou comprometimento das margens cirúrgicas. A partir do estágio IIB todos as pacientes são tratadas com radioterapia e quimioterapia sem cirurgia. Em algumas instituições no Brasil a radioterapia é utilizada como neoadjuvante para os estágios IIB. Particularmente nos estágios IVA, as pacientes podem ser submetidas à exenteração pélvica.

O emprego da radioterapia no tratamento das neoplasias do colo uterino é fundamental por sua eficácia terapêutica, considerando a alta incidência da doença. A radioterapia pode ser utilizada em pacientes com neoplasias malignas do colo uterino antes da cirurgia (neoadjuvante), após (adjuvante) ou como uma única modalidade terapêutica (exclusiva). Quando indicada, pode ser empregada na forma de braquiterapia (terapia de contato), teleterapia (terapia a distância), ou de ambas. Na literatura, muitos relatos têm tentado caracterizar a resposta das

neoplasias ao tratamento, seja cirúrgico ou radioterápico, porém os resultados têm sido conflitantes (Ji-Hong Hong *et al.*, 2000; Suzuki *et al.*, 2000). Pacientes portadoras de adenocarcinoma de colo uterino, estágio IB-2 ou mais avançado, tratadas com radioterapia exclusiva mostraram piores taxas de sobrevida quando comparadas com os casos de carcinomas espinocelular (Eifel *et al.*, 1990). Adenocarcinomas do colo cervical têm prognóstico pior dos que os correspondentes em colo de útero intacto e carcinomas epidermóides do colo (Abrão, 1995).

1.8 - O HPV e o câncer cervical:

Os papilomavirus humanos (HPVs) são reconhecidos como os principais agentes etiológicos do câncer cervical. Entre 1974 e 1976, pesquisadores começaram a postular e analisar o possível papel do HPV no câncer cervical (zur Hausen *et al.*, 1974; zur Hausen *et al.*, 1976; zur Hausen *et al.*, 1977). Os primeiros tipos de HPV foram isolados diretamente do câncer cervical, HPV-16 e HPV-18, sendo clonados em 1983 e 1984, respectivamente. Métodos moleculares altamente sensíveis (PCR, captura híbrida, hibridização *in situ*) demonstram que cerca de 100% dos carcinomas escamosos (CEC) e mais de 70% dos adenocarcinomas cervicais apresentam o genoma do HPV integrado ao genoma das células hospedeiras (Bosch *et al.*, 1995; Kleter *et al.*, 1998; Walboomers *et al.*, 1999). O HPV-16 é o tipo mais encontrado nos CEC, enquanto que o HPV-18 é o tipo mais comumente encontrado nos adenocarcinomas (Walboomers *et al.*, 1999; Pirog *et al.*, 2000; Riethdorf *et al.*, 2000), embora diferenças regionais na distribuição desses tipos virais tenham sido relatadas (Saddi, 2004). Nos adenocarcinomas *in situ*, aproximadamente 86% dos casos apresentam HPV

integrado ao genoma (Madeleine *et al*, 2001). Três grandes estudos mostraram que o DNA do HPV foi encontrado tão freqüentemente nos adenocarcinomas *in situ*, nos adenocarcinomas invasivos quanto nos CEC cervicais (Tase *et al*, 1988; Farnsworth *et al*, 1989; Bosch *et al*, 1995).

O ciclo replicativo do HPV difere de todas as outras famílias de vírus. A infecção viral requer a viabilidade de células epiteliais de mucosa ou epiderme que ainda são capazes de proliferar (células da camada basal). Nessas células, a expressão viral é fortemente suprimida, embora genes específicos de expressão precoce (E5, E6 e E7) causem o aumento proliferativo das células infectadas e sua expansão lateral. Seguindo dentro das camadas suprabasais, a expressão de genes virais tardios é iniciada. O genoma viral circular é então replicado e tem-se a síntese das proteínas estruturais. Nas camadas superiores da epiderme ou mucosas, partículas virais completas são agregadas e liberadas. Três genes possuem atividade estimulante de proliferação: E5, E6 e E7. A proteína codificada por E5 parece ser importante na fase inicial da infecção. A proteína E5 estimula a célula a crescer pela formação de um complexo com o receptor do fator de crescimento epidermal. Recentemente, foi demonstrado que E5 é capaz de inibir a apoptose, induzida por dano causado ao DNA. Em consequência, como as lesões infectadas pelo HPV progridem para o câncer cervical, o DNA viral epissomal freqüentemente torna-se integrado ao DNA da célula hospedeira, e uma parte substancial do genoma, comumente incluindo E5, é deletada. Então E5 não é obrigatória em eventos tardios na carcinogênese mediada pelo HPV. O papel mais importante na transformação maligna pode ser atribuído aos genes E6 e E7 e suas respectivas proteínas. Eles são consistentemente expressos em tecidos

malignos e a inibição da sua expressão bloqueia o fenótipo maligno celular do câncer cervical. Independentes na função de imortalizar vários tipos celulares humanos em cultura de tecidos, suas eficácias aumentam quando expressos em conjunto.

Várias funções têm sido descritas para as proteínas E6 e E7. Observações iniciais revelaram que E6 interage com a proteína supressora p53 e E7 interage com a proteína do retinoblastoma (RB) para bloquear a atividade desses supressores de tumor. Certamente, algumas das funções proeminentes de E6 originam-se de sua interação com p53 e com BAK, seguidas pela degradação dessas proteínas. A degradação de p53 e da proteína pró-apoptótica BAK, resulta em resistência a apoptose e aumento da instabilidade cromossomal. Em adição, a ativação da telomerase e a inibição da degradação da proteína SRC, da família de kinases, pela proteína viral E6, parecem desempenhar funções importantes na estimulação do crescimento celular. A proteína viral E7 interage e degrada a proteína supressora RB, que por sua vez, libera o fator de transcrição E2F. O resultado da alta atividade da E2F pode resultar em apoptose nas células que expressam E7. Além do mais, E7 estimula a fase S do ciclo celular, ativando os genes das ciclinas A e ciclinas E, e ainda parece bloquear a função dos inibidores das ciclina-dependentes de kinases, como WAF1 (também conhecida como CIP1 ou p21) e KIP1 (também conhecido como p27). Por indução da amplificação de centríolos, E7 também induz aneuploidia nas células que expressam E7, fato que também contribui para a formação do tumor.

E6 e E7 podem imortalizar células humanas independentemente, mas com eficácia reduzida. A junção das suas funções resulta em marcado aumento da

atividade de transformação. Isso se deve a um interessante efeito complementar e sinérgico. A proteína E6 parece ser danificada pela INK4A. Entretanto, a proteína E7 suprime essa inibição por ativação direta das ciclinas A e E. Em resposta, E6 previne a apoptose induzida por E7, acarretando a degradação da proteína p53 e BAK, indutoras de apoptose (zur Hausen, 2002). É clara a diminuição da apoptose no câncer cervical associada ao HPV (Nair *et al.*, 1999).

Apesar da importância do HPV na etiopatogenia do câncer cervical já ter sido confirmada, mesmo nos casos de adenocarcinomas, um período prolongado de latência é observado entre a instalação da infecção viral e o aparecimento do câncer cervical. Os HPVs que são encontrados no câncer cervical e outros cânceres anogenitais têm sido designados como sendo de alto risco. Por outro lado, aqueles encontrados primariamente em verrugas genitais e lesões não malignas foram classificados como sendo de baixo risco (zur Hausen, 2002). Além disso, nem todas as pacientes que desenvolvem a infecção pelos reconhecidos HPVs de alto risco apresentarão câncer cervical, sugerindo a existência de cofatores necessários à transformação neoplásica das lesões precursoras.

1.9 - Receptores hormonais:

Os hormônios esteróides têm sido considerados como potenciais cofatores da transformação maligna em vários tipos de tumores. Estudos epidemiológicos demonstram um maior risco para o desenvolvimento do câncer de colo uterino em grupos de mulheres que sofreram exposição aos hormônios esteróides em diferentes circunstâncias, incluindo aquelas que fizeram uso de contraceptivos

orais durante períodos prolongados, mulheres multíparas e pacientes submetidas a transplantes renais que fizeram uso de glicocorticóides imunossupressivos. Em relação a outros métodos contraceptivos, a duração do uso do diafragma foi associada a uma diminuição do risco de adenocarcinoma de colo uterino (Brinton *et al.*, 1989; Pater *et al.*, 1994, Schiffman & Brinton, 1995; Giske-Ursin *et al.*, 1996).

Os hormônios esteróides formam uma classe complexa de compostos naturais ou sintéticos que exercem suas funções celulares através de ligações com receptores específicos localizados no citoplasma das células alvo. Uma vez formado, o complexo hormônio esteróide – receptor é transferido para o núcleo das células onde se liga às seqüências de consenso definidas nas regiões regulatórias (sítios promotores ou *enhancers*) do DNA, aumentando ou suprimindo a transcrição dos genes correspondentes. Diferentes efeitos biológicos são exercidos pelos hormônios esteróides e muitos desses efeitos são comuns para hormônios distintos do mesmo grupo.

Vários estudos experimentais têm descrito que os hormônios esteróides contribuem com a atividade oncogênica dos HPVs de alto risco por meio do aumento na expressão dos genes virais E6 e E7 (von Knebel *et al.*, 1997; Khare *et al.*, 1996; Yuan *et al.*, 1999). O HPV-16, tipo viral mais importante na gênese do câncer cervical, contém elementos de resposta para os receptores de hormônios esteróides nas regiões promotoras dos genes E6 e E7. Aumentos dos níveis de progesterona aumentam a habilidade do DNA viral de transformar as células. De fato, as lesões de papilomavirus são exacerbadas durante a gravidez e o risco do câncer cervical aumenta com os contraceptivos orais e gravidez, quando os níveis

de progesterona estão altos (Paganini *et al*, 1982; Chan *et al*, 1989; Patter *et al*, 1990). A região regulatória do genoma viral, que exerce controle transcricional dos genes do HPV, apresenta elementos regulatórios (*enhancers*) que são reconhecidos e ativados pelo complexo esteróide – receptor. Elementos regulatórios responsivos aos glicocorticóides (GER) e a progesterona (PRE) têm sido descritos e testados em linhagens celulares de carcinomas cervicais, demonstrando o papel dos respectivos hormônios na expressão das oncoproteínas virais e na proliferação celular (Chan *et al.*, 1989; Khare *et al.*, 1996). Receptores de estrógeno (RE) e receptores de progesterona (RP) têm sido reconhecidos como indicadores prognósticos e preditivos em cânceres da mulher, incluindo o câncer de mama, câncer de ovário e de endométrio. Os RE e RP estão presentes em 20-35% dos adenocarcinomas (Masood *et al*, 1993; Fujiwara *et al*, 1997). Estudos sugerem que a expressão de receptores de estrógenos e progesterona pode ter significado prognóstico no adenocarcinoma cervical (Fujiwara *et al.*, 1997; Lu *et al.*, 1999; Suzuki *et al.*, 2000). A análise bioquímica e imuno-histoquímica identificaram os receptores de estrógenos e de progesterona no epitélio colunar endocervical, sugerindo a endocérvice normal como alvo dos hormônios esteróides, vez que a produção e a qualidade do muco cervical flutuam em resposta às mudanças verificadas no ciclo menstrual (Fujiwara *et al.*, 1997). A administração exógena de estrógeno causa proliferação celular e indução de RP, indicando que a ação do estradiol é mediada pela via do receptor de estrógeno (Bhattacharya *et al*, 1997). A existência de RE e RP no tecido cervical torna possível um mecanismo biológico pelo quais os contraceptivos orais podem aumentar o processo de carcinogênese através do efeito no crescimento ou

diferenciação celular (Zhan *et al*, 1995). É possível que RE e RP estejam presentes em maior extensão nos adenocarcinomas que nos CEC (Ford *et al*, 1983). A evidência que os contraceptivos orais podem influenciar o tecido endocervical vem da presença de hiperplasia microglandular, que é associada com o uso de contraceptivos orais (Gall *et al*, 1969).

1.10 - c-erbB-2:

Além dos receptores hormonais, outros marcadores prognósticos têm sido investigados nos adenocarcinomas, incluindo o c-erbB-2 (Kihana *et al.*, 1994; Nishioka *et al.*, 1999). O produto do oncogene c-erbB-2 é uma glicoproteína de 185 kD, com função de receptor de fator de crescimento da epiderme e que apresenta domínio de tirosina – cinase. C-erbB-2 está envolvida na promoção do crescimento, da diferenciação, da adesão e da motilidade celular. A expressão aumentada de c-erbB-2, na maioria das vezes, está relacionada com o fenômeno de amplificação gênica e tem sido implicada na patogênese do carcinoma do colo uterino. Vários estudos demonstram a expressão de c-erbB-2 em adenocarcinomas cervicais, entretanto, a expressão aumentada desse marcador ainda não foi claramente evidenciada e seu valor prognóstico para os adenocarcinomas cervicais ainda é discutido (Costa *et al.*, 1996; Rosly *et al.*, 2004).

1.11 - Ki-67:

Diversas abordagens metodológicas têm sido aplicadas, em auxílio a histopatologia convencional, para a avaliação da proliferação celular. A taxa de

proliferação de uma neoplasia é um dos parâmetros histológicos utilizados nos diversos sistemas de graduação das neoplasias malignas, segundo recomendação da Organização Mundial de Saúde. A avaliação da fração de proliferação pode ser feita por meio da contagem de figuras de mitoses na análise por microscopia óptica. Entretanto, alguns inconvenientes são enumerados nessa metodologia, incluindo o processo de fixação dos espécimes que induz a finalização da divisão celular, os artefatos do processamento técnico que dificultam a contagem, a subjetividade do avaliador, a semelhança com os corpúsculos apoptóticos, além da figura mitótica representar apenas uma pequena fração do evento de divisão celular (Pinto, 2005). Dentre os diversos marcadores utilizados na imuno-histoquímica, o Ki-67/Mib-1 tem sido adotado largamente para a avaliação da proliferação celular (Duchrow *et al.* 1995; Prayson, 2005). O anticorpo Ki-67 foi desenvolvido inicialmente em 1983, por Gerdes *et al.*, estudando uma linhagem celular de linfoma de pele (Gerdes, *et al.* 1983). A especificidade antigênica do anticorpo Ki-67 é contra dois polipeptídeos de 345 e 395 kDa, traduzidos por “splicing” alternativo do RNAm, a partir do cDNA de comprimento total de 11,4 e 12,5 kb. Os dois transcritos diferem entre si apenas pela base 1080 do exon 7, do gene localizado no cromossoma 10 (Schonk, *et al.* 1989; Fonatsch, *et al.* 1991; Gerdes, *et al.* 1991). A detecção imuno-histoquímica de Ki-67 tem sido amplamente utilizada no sentido de diferenciar carcinomas cervicais e suas lesões precursoras (Cambruzzi *et al.*, 2005; Boon *et al.*, 2004; Graflund *et al.*, 2002; Yoon *et al.*, 2001), pois traduz o grau de proliferação das células tumorais.

JUSTIFICATIVAS

Na prática clínica, têm-se evidenciado o aumento na incidência dos adenocarcinomas cervicais, além disso, a relação entre a presença do HPV e o câncer cervical tem sido constatada em vários países. Assim, estudos epidemiológicos, demonstrando a presença do vírus nesses tumores e o tipo viral predominante nas diferentes regiões, são essenciais para que possam ser estabelecidas medidas preventivas e de diagnóstico da infecção viral.

Apesar dos receptores de estrógenos e progesterona e dos marcadores c-erbB-2 e Ki-67 apresentarem potencial prognóstico e preditivo em vários tumores, o *status* desses marcadores no adenocarcinoma de colo uterino ainda não está claramente definido. Portanto, há uma necessidade de se avaliar esses fatores nos adenocarcinomas de colo uterino, objetivando uma melhor abordagem terapêutica dessas neoplasias.

A radioterapia tem demonstrado resultados efetivos no tratamento dos adenocarcinomas de colo uterino; entretanto, uma fração razoável destes tumores apresenta um comportamento mais agressivo e uma menor taxa de resposta ao tratamento, requerendo assim estudos mais detalhados que possam detectar marcadores prognósticos e/ou preditivos para essas neoplasias.

2. OBJETIVOS

3.1- Objetivos Gerais:

3.1.1 - Detectar e genotipar o vírus HPV em pacientes com o diagnóstico de adenocarcinoma de colo uterino nos espécimes coletados utilizando o método de PCR.

3.1.2 - Analisar, por meio da técnica de imuno-histoquímica, a expressão de receptores de estrógeno e de progesterona, do produto do oncogene c-erbB-2 e do Ki-67 em espécimes de adenocarcinomas cervicais invasivos.

3.1.3 - Analisar a resposta das pacientes portadoras de adenocarcinomas tratadas com radioterapia.

3.2- Objetivos Específicos:

3.2.1 - Correlacionar os aspectos clínicos e morfológicos dos tumores analisados com os resultados obtidos na detecção do HPV.

3.2.2 - Correlacionar os resultados da detecção de HPV com a sobrevida global das pacientes tratadas com radioterapia.

3.2.3.1 - Correlacionar os aspectos clínicos e morfológicos dos tumores analisados com os resultados obtidos pela detecção dos marcadores imuno-histoquímicos.

3.2.4 Determinar possíveis fatores prognósticos ou preditivos para os

adenocarcinomas de colo uterino, por meio da detecção de HPV e avaliação dos marcadores imuno-histoquímicos e a correlação destes marcadores com a sobrevida global das pacientes.

4. METODOLOGIA

4.1 - Seleção de casos:

Pacientes com adenocarcinoma de colo uterino foram selecionadas a partir de listagens fornecidas pelo Registro de Câncer de Base Populacional de Goiânia e Registro de Câncer de Base Hospitalar do Hospital Araújo Jorge. Após a análise dos prontuários e considerados os critérios de inclusão, foram selecionadas 43 pacientes com diagnóstico histopatológico comprovado de adenocarcinoma e carcinoma adenoescamoso cervical. Todas as pacientes foram tratadas com radioterapia somente ou radioterapia e cirurgia, no Serviço de Ginecologia e Mama e Serviço de Radioterapia do Hospital Araújo Jorge, de Goiânia-GO, durante o período de 1995 a 2000. Foram selecionadas, as pacientes submetidas à biópsia ou a cirurgia antes do tratamento radioterápico e que apresentaram seguimento por um período mínimo de três anos (36 meses), a fim de que fossem analisados os dados de sobrevida. Os dados clínicos das pacientes foram colhidos dos respectivos prontuários e em vários casos, ligações telefônicas foram feitas com objetivo de atualizar o estado clínico da paciente. O estadiamento clínico das pacientes foi baseado nos critérios da Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia, FIGO, 1995 (Pecorelli & Odicino, 2003).

4.2 - Espécimes biológicos:

Os espécimes biológicos analisados consistiram de fragmentos de colo uterino colhidos por meio de biópsia ou cirurgia, antes de qualquer tratamento radioterápico. Os fragmentos foram fixados em formol e incluídos em blocos de

parafina. Todos os blocos foram obtidos dos arquivos do Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital Araújo Jorge. O diagnóstico correspondente a cada bloco foi revisado e confirmado pelos patologistas que colaboraram com o trabalho. Os critérios adotados para classificação e graduação histológica foram os da FIGO e da Organização Mundial de Saúde, OMS (Silverberg & Loffe, 2003). Após a comprovação do diagnóstico, foram confeccionadas lâminas para o estudo imuno-histoquímico e cortes de tecido para a análise molecular de detecção do HPV.

4.3- Extração de DNA dos espécimes incluídos em parafina:

Fragmentos com cerca de 7,0 µm foram obtidos dos blocos parafinados, sendo que a lâmina do micrótomo era trocada a cada bloco, a fim de que contaminações entre os blocos fossem evitadas. Os cortes foram coletados em microtubos previamente autoclavados e, em seguida, lavados com xilol e etanol para remoção da parafina. Após a desparafinização, os tubos foram incubados em tampão de lise (Tris-EDTA + Proteinase K 50-100µg/mL) a 55°C, *overnight*. Após a digestão total dos tecidos, o DNA era extraído com a utilização do kit comercial PureGene, Gentra, conforme recomendações do fabricante. A qualidade do DNA era avaliada em mini-gel de agarose – 3%, corado com brometo de etídeo e as alíquotas mantidas no freezer -20°C até a realização dos ensaios de PCR.

4.4- Reação de PCR para detecção de HPV e genotipagem do HPV-16:

A detecção do genoma do HPV nas amostras de tumores foi realizada com a utilização do método de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), utilizando

primers genéricos GP5+/GP6+, que permitem a detecção do genoma de vários HPVs de alto risco (Manos *et al.* 1989). Esses primers amplificam um pequeno fragmento do gene viral L1 (\cong 150 pb). As reações de PCR mediadas por GP5+/GP6+ foram realizadas num volume final de 25 μ l, utilizando um termociclador (PE 2400, Perkin Elmer), em mistura contendo 2,0 mM de MgCl₂, 1,25 unidades de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 0,4 mM de cada desoxinucleotídeo-trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, e dTTP), 0,25 μ M de cada primer (GP5+ ou GP6+) e aproximadamente 100 ng de DNA, em tampão 1 vez concentrado (Taq DNA Polimerase 5x Buffer - Invitrogen). As condições de ciclagem usadas encontram-se descritas na tabela 1. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de poliacrilamida, corado com brometo de etídeo ou pela prata. A detecção do DNA viral foi feita pela Professora Vera Aparecida Saddi, no Núcleo de Pesquisas Replicon, na Universidade Católica de Goiás.

As reações de PCR usadas para identificação de HPV-16 também foram realizadas num volume final de 25 μ l, contendo uma mistura de 1,5 mM MgCl₂, 1,25 unidades de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 200 μ M de cada desoxinucleotídeo-trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, e dTTP), 0,25 μ M de cada primer (p1:*sense* e p2: *antisense*) e 100 ng de DNA em tampão uma vez concentrado (Taq DNA Polimerase Buffer - Invitrogen). As condições de ciclagem usadas encontram-se descritas na tabela 1. Os produtos obtidos pelas reações de PCR foram analisados em gel de poliacrilamida - 8%, corado com brometo de etídeo.

Tabela 1. Descrição dos primers, tamanho dos replicons e protocolos de ciclagem usados no ensaio de PCR para a detecção de HPV e genotipagem do HPV-16 em amostras de tumores cervicais.

Fragmento Amplificado/Primers	Condições de ciclagem
	95°C - 5 min
Região L1 (139-148 bp) - Vários HPVs de alto risco	95°C - 30 s
Primer GP5+ : 5'-TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC - 3'	40°C - 2 min
Primer GP6+ : 5'-CTTATACTAAATGTCAAATAAAAAG - 3'	72°C - 1 min
	72°C - 7 min
	4°C - ∞
	95°C - 5 min
Região E6 (≅120 bp) - HPV-16	95°C - 30 s
P1 : 5'- TCAAAAGCCACTGTGTCCTGA - 3'	62°C - 1 min
P2 : 5'- CGTGTTCTTGATGATCTGCAA -3'	72°C - 1 min
	72°C - 7 min
	4°C - ∞

4.5 - Imuno-histoquímica:

A análise imuno-histoquímica empregou o método da estreptoavidina-biotina-imunoperoxidase (LSAB2, Kit peroxidase, DAKO) e foi utilizada para a detecção da expressão dos seguintes antígenos: receptores de estrógenos (RE), receptores de progesterona (RP), o antígeno de proliferação celular (Ki-67) e o receptor da família de fatores de crescimento da epiderme, o C-erbB2 (NovoCasta). Os cortes, montados em lâminas sinalizadas, foram desparafinizados e desidratados, em temperatura controlada. Em seguida, foram submetidos à recuperação antigênica pelo calor, em panela de pressão, durante 20 minutos, utilizando-se o citrato 0,01M, pH 6,0. Após a recuperação antigênica, as lâminas foram mantidas à temperatura ambiente, para resfriamento, por cerca de 1 hora. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito em peróxido de hidrogênio 3%, durante 10 minutos, e em seguida, as lâminas foram lavadas com tampão fosfato (PBS) por 5 minutos. As lâminas foram incubadas a 4°C, durante a noite, com os anticorpos monoclonais anti-RE (1:100), anti-RP (1:100), anti-Ki-67 (1:50) e anticorpo policlonal anti-c-erbB2 (1:1000), diluídos em solução de PBS contendo 1% de albumina bovina. Após a incubação com os anticorpos primários, as lâminas foram lavadas 3 vezes em PBS, por 5 minutos, e incubadas durante 1 hora com o anticorpo secundário conjugado com a biotina-avidina peroxidase. Após nova lavagem com PBS, por 5 minutos, as reações foram reveladas com tetra-hidroclorato de 3-3' diaminobenzidina, por 5 minutos, e levemente contra coradas com hematoxilina. Em seguida, as lâminas foram desidratadas e montadas com lamínula. Sempre que possível, aproximadamente 300 núcleos de células tumorais foram avaliados em cada espécime. A marcação para RE, RP e

Ki-67 foi considerada positiva quando mais que 1% das células tumorais estivessem coradas em cada corte. A marcação positiva para c-erbB2 foi considerada quando a hiper-expressão do marcador estivesse evidenciada nas membranas das células tumorais, de acordo com critérios recomendados pela Dako Corporation, 1998.

4.6 - Radioterapia:

As 43 pacientes analisadas, foram tratadas com uma combinação de irradiação pélvica externa e irradiação intracavitária (braquiterapia), com taxas de altas doses ou baixas doses. Onze pacientes receberam teleterapia neoadjuvante, 22 receberam terapia adjuvante, 8 receberam teleterapia exclusiva e 2 pacientes receberam somente braquiterapia. Dentre as 41 pacientes que receberam teleterapia, 40 receberam doses que variaram entre 45-50 Gy e uma paciente recebeu doses abaixo de 45 Gy. Todos os fracionamentos foram de 1.8 Gy, em quatro campos diários, 5 vezes por semana. O reforço parametrial foi utilizado em 5 pacientes com doses de 16-20 Gy e em 2 pacientes com doses de 5-10 Gy. Das onze pacientes submetidas à teleterapia neoadjuvante, todas foram também submetidas à cirurgia, sendo que 9 delas apresentaram respostas parciais e 2 apresentaram respostas completas na peça cirúrgica. Quatro pacientes receberam teleterapia hipofracionada com finalidade anti-hemorrágica, no esquema de três frações de 4 Gy. Trinta e sete pacientes foram submetidas à braquiterapia, sendo que 2 foram exclusivas. Duas pacientes receberam complementação de dose em campos reduzidos, com doses de 20 Gy no lugar da braquiterapia. Vinte e duas pacientes receberam tratamento com taxas de baixas doses (LDR) e quinze

receberam tratamento com taxas de altas doses (HDR). Vinte e nove pacientes tiveram a cúpula vaginal como ponto de prescrição de dose e 8 pacientes receberam doses prescritas no ponto A. Dentre as pacientes tratadas com LDR, 3 receberam doses no intervalo de 31-40 Gy, 12 receberam doses entre 41-50 Gy e 7 receberam 60 Gy. Dentre as pacientes tratadas com HDR, 15 pacientes receberam doses entre 20-30 Gy. Para as pacientes tratadas com HDR, uma recebeu o fracionamento de 5 Gy, 2 receberam fracionamento de 6 Gy e 12 receberam fracionamento de 7 Gy. Não houve abandono de tratamento na amostra.

4.7- Análise estatística dos resultados:

As variáveis de interesse foram categorizadas da seguinte forma: status menopausal (pré-menopausadas < de 50 anos, e pós-menopausadas \geq 50 anos); tipo histológico (adenocarcinomas e carcinomas adenoescamosos); grau de diferenciação histológica (bem diferenciados, moderadamente diferenciados, pouco diferenciados e não-classificados); estadiamento clínico (I, II, III, IV e não-especificados); condições ao final do estudo (pacientes vivas e pacientes que evoluíram para o óbito); detecção imuno-histoquímica de RE, RP e c-erbB-2 (+ ou -); detecção imuno-histoquímica de Ki-67 (+ ou - e proporção de marcação, < 50 ou \geq 50%); detecção de HPV e genotipagem de HPV-16 (+ ou -). Os resultados encontrados foram tabulados e analisados por meio de estatística descritiva, de tabelas de contingência e de curvas de sobrevida. As diferenças estatísticas, entre a detecção imuno-histoquímica dos marcadores, a detecção de HPV e HPV-16 e

os parâmetros clínico-patológicos, foram avaliadas pelo teste do chi-quadrado. O método de Kaplan-Meier foi usado para estimar o efeito dos marcadores imunohistoquímicos e da detecção de HPV na sobrevida das pacientes. A sobrevida foi definida como o intervalo de tempo entre a data de diagnóstico e a data da morte, ou data da última consulta realizada pela paciente. As diferenças na sobrevida geral foram estimadas pelo teste do log rank. Para efeito de significância estatística, considerou-se um nível de probabilidade $(p) \leq 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1- Características clínicas:

O estudo incluiu 43 pacientes diagnosticadas com adenocarcinoma e carcinoma adenoescamoso de colo uterino, no período de 1995-2000. As pacientes selecionadas foram tratadas com radioterapia exclusiva ou cirurgia e radioterapia, no Serviço de Ginecologia e Mama e Serviço de Radioterapia do Hospital Araújo Jorge da Associação de Combate ao Câncer em Goiás. As características clínicas das pacientes são descritas a seguir e estão listadas na tabela 2.

Idade: a idade média das pacientes ao diagnóstico foi de 50,7 anos (variando de 35 a 78 anos). Vinte mulheres (47%) tinham idades abaixo de 50 anos (pré-menopausadas) e 23 (53%) tinham idades acima de 50 anos (pós-menopausadas).

Tipo e grau histológico: trinta e cinco tumores (82%) eram adenocarcinomas, 7 (16%) eram carcinomas adenoescamosos e 1 (2%) era misto de adenocarcinoma e carcinoma escamoso (tumor de colisão). Dentre os adenocarcinomas, 15 (35%) eram mucinosos, sendo 14 (33%) do tipo endocervical e 1 (3%) intestinal; 12 adenocarcinomas (28%) eram do tipo endometrióide, 2 (5,0%) eram de células claras e 7 (16%) eram mistos do tipo endocervical associado ao tipo endometrióide. A graduação histológica dos adenocarcinomas revelou 20 casos (46%) bem diferenciados, 9 casos (21%)

moderamente diferenciados e 5 casos (12%) pouco diferenciados. Os carcinomas adenoescamosos e os tumores de colisão não são graduados histologicamente.

Estadiamento clínico: quarenta e uma pacientes (95%) tiveram o estadiamento clínico (FIGO) determinado. Dentre elas, 22 pacientes (52%) apresentaram estágio I, 17 pacientes (39%) apresentaram estágio II, 1 paciente (2%) apresentou estágio III, 1 paciente (2%) apresentou estágio IV e duas pacientes não tiveram o estadiamento clínico descrito.

Seguimento das pacientes: o tempo médio de seguimento das pacientes, desde o diagnóstico até o último controle foi de 32,0 meses (intervalo: 7,2 – 69,0 meses). Durante o período analisado, 13 pacientes (30%) morreram em decorrência da doença. A sobrevida média para as pacientes que morreram foi de 23,8 meses (intervalo: 7,2 - 46 meses), enquanto que o seguimento médio para as pacientes vivas ao final do estudo foi de 36,0 meses (intervalo: 16,0 – 69,0 meses).

Tabela 2. Características clínicas dos casos de adenocarcinomas e carcinomas adenoescamosos estudados.

Característica	Número de Pacientes	Proporção
Estadiamento clínico		
Estádio I	22	52,0%
Estádio II	17	39,0%
Estádio III	1	2,3%
Estádio IV	1	2,3%
Não especificado	2	4,6%
Total	43	
Tipo histológico		
Adenocarcinomas	35	81,4%
Carcinomas adenoescamosos	7	16,3%
Tumores mistos (adenocarcinoma+adenoescamoso)	1	2,3%
Diferenciação histológica		
Bem diferenciados	20	46,5%
Moderamente diferenciados	9	20,9%
Pouco diferenciados	5	11,6%
Não classificados	9	20,9%
Status menopausal		
Pré-monopausadas (< 50 anos)	20	46,5%
Pós-menopausadas (≥ 50 anos)	23	53,5%
Condição ao final do estudo		
Vivas	30	70,0%
Óbitos	13	30,0%

5.2- Marcadores imuno-histoquímicos

Expressão de receptores de estrógenos e receptores de progesterona:

a marcação de RE e RP foi considerada positiva quando presente no núcleo das células tumorais (figura 1 e 2). Em todos os casos, células endocervicais normais e/ou células estromais apresentaram marcação positiva para RE e RP. A marcação de RE foi positiva em 9 casos (21,0%) e a marcação de RP foi positiva em 12 (28,0%) casos.

As freqüências de expressão de RE e RP, de acordo com o estadiamento clínico, tipo histológico, grau de diferenciação histopatológica, status menopausal e condições ao final do estudo são apresentadas na tabela 3. No que diz respeito ao estadiamento clínico, uma maior freqüência de expressão, tanto de RE (23,5%) como de RP (35,3%), foi observada para os tumores de estágio II. Um único caso apresentava estágio IV, sendo positivo para ambos os marcadores, RE e RP. A expressão de RE foi mais freqüente (22,8%) nos adenocarcinomas, ao contrário da expressão de RP, que foi mais freqüente (28,5%) nos carcinomas adenoescamosos. Com relação ao grau de diferenciação histológica, a expressão de RE foi mais freqüente nos tumores moderadamente diferenciados, enquanto a expressão de RP foi mais freqüente (40%) nos tumores pouco diferenciados. A freqüência de expressão de RE foi muito semelhante nas pacientes pré-menopausadas (26,6%) e pós-menopausadas (21,7%), entretanto, a expressão de RP foi mais freqüente nas mulheres pós-menopausadas (30,4%). Dentre as 30 pacientes que estavam vivas ao final do estudo, 8 (26,6%) expressavam RE e 9 (30,0%) expressavam RP. Dentre as 13 pacientes que evoluíram para o óbito, 1 (7,7%) expressava RE e 3 (23,0%) expressavam RP.

Tabela 3. Expressão dos receptores de estrógenos e receptores de progesterona de acordo com as características clínicas dos tumores.

Característica	RE			RP		
	(+)	(-)	Proporção (+)	(+)	(-)	Proporção (+)
Estadiamento clínico						
Estádio I	4	18	18,2%	5	17	22,7%
Estádio II	4	13	23,5%	6	11	35,3%
Estádio III	0	1	0%	0	1	0%
Estádio IV	1	0	100,0%	1	0	100,0%
Não especificado	0	2	0%	0	2	0%
Total	9	34		12	31	
Tipo histológico						
Adenocarcinomas	8	27	22,8%	9	26	25,7%
Carcinomas adenoescamosos	1	6	14,3%	2	5	28,5%
Tumores mistos (adenocarc.+adenoescamoso)	0	1	0%	1	0	100,0%
Diferenciação histológica						
Bem diferenciados	2	18	10%	3	17	15%
Moderadamente diferenciados	3	6	33,3%	3	6	33,3%
Pouco diferenciados	1	4	20%	2	3	40%
Não classificados	3	6	33,3%	4	5	44,4%
Status menopausal						
Pré-menopausadas (< 50 anos)	4	16	20%	5	15	25%
Pós-menopausadas (≥ 50 anos)	5	18	21,7%	7	16	30,4%
Condição ao final do estudo						
Vivas	8	22	26,6%	9	21	30%
Óbitos	1	12	7,7%	3	10	23,0%

Expressão de c-erbB-2 e Ki-67: A hiperexpressão de c-erbB-2 é visualizada pela marcação intensa e contínua de toda extensão da membrana citoplasmática das células tumorais. A expressão fraca de c-erbB-2 foi visualizada em alguns dos tumores analisados (dados não apresentados). Entretanto, somente um caso de adenocarcinoma endocervical, classificado com estadio IIb, apresentou hiperexpressão de c-erbB-2, dentre todas as pacientes analisadas. Assim, a análise estatística não foi aplicada ao estudo desse marcador.

A marcação de Ki-67 foi considerada positiva quando presente no núcleo das células tumorais (figura 3) e a proporção de núcleos corados foi traduzida em termos percentuais. As freqüências de marcação de Ki-67 foram classificadas em dois grupos, um $< 50\%$ e outro $\geq 50\%$. A marcação de Ki-67 foi positiva em 35 casos (83,7%) e as freqüências correspondentes a cada parâmetro analisado encontram-se na tabela 4. Com relação ao estadiamento clínico, freqüências de expressão muito similares foram observadas para os tumores de estágio I (77,2%) e II (82,3%). A expressão de Ki-67 foi mais freqüente (100,0%) nos carcinomas adenoescamosos em comparação com os adenocarcinomas (80,0%). Com relação ao grau de diferenciação histológica, a expressão de Ki-67 foi mais freqüente (100%) nos tumores moderadamente diferenciados. As freqüências de expressão de Ki-67 foram muito semelhantes nas pacientes pré-menopausadas (85,0%) e pós-menopausadas (82,6). Dentre as 30 pacientes que estavam vivas ao final do estudo, 28 (93,0%) expressavam Ki-67 enquanto que dentre as 13 pacientes que evoluíram para o óbito, 5 (61,0%) expressavam Ki-67.

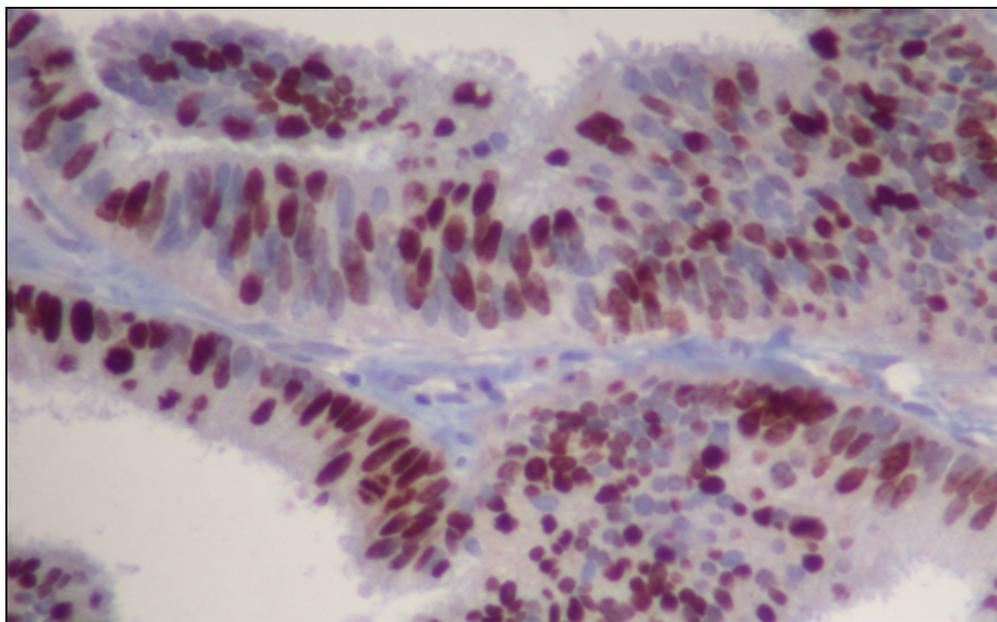


Figura 1. Fotomicrografia mostrando a detecção imuno-histoquímica de receptores de progesterona em núcleos celulares de adenocarcinoma de colo uterino.

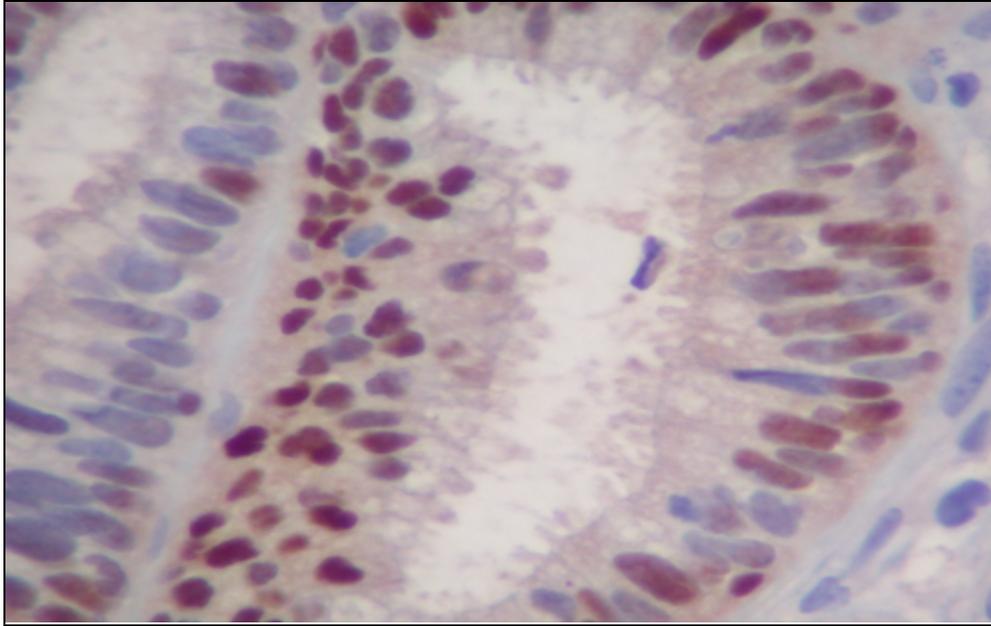


Figura 2. Fotomicrografia mostrando a detecção imuno-histoquímica de receptores de estrógenos em núcleos celulares de adenocarcinoma do colo uterino.

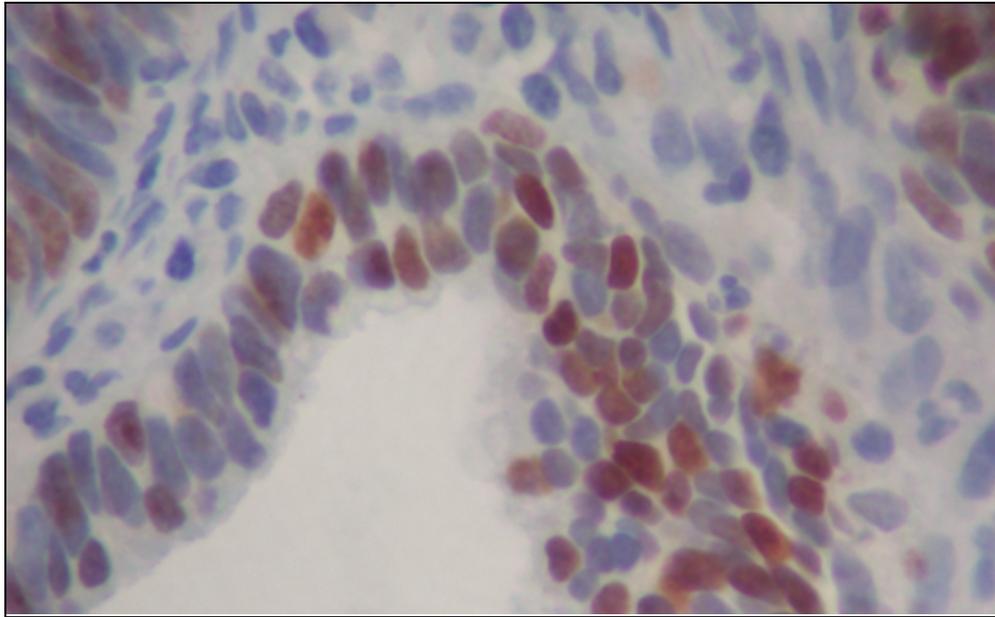


Figura 3. Fotomicrografia mostrando a detecção imuno-histoquímica de Ki-67 em núcleos celulares de adenocarcinoma de colo uterino.

Tabela 4. Expressão de Ki-67 de acordo com as características clínicas dos tumores.

Característica	Ki-67				
	(+)	(-)	Proporção (+)	(+) < 50%	(+) ≥ 50%
Estadiamento clínico					
Estádio I	17	5	77,2%	11 (65,0%)	6 (35,0%)
Estádio II	14	3	82,3%	5 (36,0%)	9 (64,0%)
Estádio III	1	0	100,0%	0 (0%)	1 (100,0%)
Estádio IV	1	0	100,0%	0 (0%)	1 (100,0%)
Não especificado	2	0	100,0%	1 (50%)	1 (50%)
Total	35	8			
Tipo histológico					
Adenocarcinomas	28	7	80,0%	17 (60,7%)	11 (39,3%)
Carcinomas adenoescamosos	7	0	100,0%	1 (14,2%)	6 (85,7%)
Tumores mistos (adenocarcinoma+adenoescamoso)	1	0	100,0%	1 (100,0%)	0 (0,0%)
Diferenciação histológica					
Bem diferenciados	16	4	80,0%	11 (68,7%)	5 (31,2%)
Moderadamente diferenciados	9	0	100,0%	4 (44%)	5 (55,5%)
Pouco diferenciados	4	1	80,0%	2 (50,0%)	2 (50,0%)
Não classificados	7	2	77,7%	2 (28,5%)	5 (71,4%)
Status menopausal					
Pré-menopausadas (< 50 anos)	17	3	85,0%	9 (52,9%)	8 (47,0%)
Pós-menopausadas (≥ 50 anos)	19	4	82,6%	10 (52,6%)	9 (47,3%)
Condição ao final do estudo					
Vivas	28	2	93%	16 (57,0%)	12 (42,8%)
Óbitos	8	5	61%	3 (37,0%)	5 (62,5%)

5.3 - Detecção de HPV e genotipagem do HPV-16: A detecção do genoma do HPV nos espécimes de tumores foi feita por ensaios de PCR (reação em cadeia da polimerase), utilizando os primers genéricos GP5+/GP6+. A presença do genoma viral é traduzida pela detecção de um fragmento, com cerca de 140 bp, correspondente à região L1 de vários tipos de HPVs. Controles negativos foram usados em cada experimento contendo todos os componentes necessários à reação de PCR, exceto DNA que era substituído por água. Controles positivos também foram utilizados e continham DNA extraído de células HeLa. Os testes dos controles positivos e negativos produziram os resultados esperados. A extração de DNA foi feita em todos os espécimes tumorais (43 casos), entretanto, somente 40 alíquotas (93,0%) se mostraram apropriadas para a realização da PCR. Dentre as amostras testadas, 37 (92,5%) apresentaram resultados positivos para detecção do genoma viral (tabela 5).

Utilizando ensaios de PCR com primers específicos para a região E6 do HPV-16, observou-se o aparecimento de uma banda com aproximadamente 120 bp nas amostras positivas. Em nosso estudo, o HPV-16 foi detectado em 30 das 40 amostras de tumores avaliadas (75,0%) (tabela 5).

Tabela 5. Detecção de HPV e genotipagem de HPV-16, por meio de PCR, de acordo com as características clínicas dos tumores.

Característica	HPV			HPV-16		
	(+)	(-)	Proporção (+)	(+)	(-)	Proporção (+)
Estadiamento clínico						
Estádio I	19	2	90,4%	17	2	89,4%
Estádio II	14	1	93,3%	11	3	78,5%
Estádio III	1	0	100,0%	0	1	0%
Estádio IV	1	0	100,0%	1	0	100,0%
Não especificado	2	0	100,0%	1	1	50,0%
Total	37	3		30	7	
Tipo histológico						
Adenocarcinomas	29	3	90,6%	23	6	79,3%
Carcinomas adenoescamosos	7	0	100,0%	6	1	85,7%
Tumores mistos (adenocarc.+adenoescamoso)	1	0	100,0%	1	0	100,0%
Diferenciação histológica						
Bem diferenciados	17	1	94,4%	14	3	82,3%
Moderadamente diferenciados	7	2	77,7%	7	0	100,0%
Pouco diferenciados	4	0	100,0%	3	1	75,0%
Não classificados	9	0	100,0%	6	3	66,3%
Status menopausal						
Pré-menopausadas (< 50 anos)	18	1	94,7%	14	4	77,7%
Pós-menopausadas (≥ 50 anos)	19	2	90,4%	16	3	84,2%
Condição ao final do estudo						
Vivas	26	2	92,8%	21	5	80,7%
Óbitos	11	1	84,6%	9	2	81,8%

5.4 - Diferenças estatísticas entre os parâmetros analisados: A expressão dos diferentes marcadores imuno-histoquímicos (RE, RP, c-erb-B2 e Ki-67) e os resultados da detecção de HPV, em relação aos parâmetros clinico-patológicos avaliados, foram organizados em tabelas de contingências (tabelas 3, 4 e 5). As diferenças entre os grupos foram analisadas pelo teste do chi-quadrado. Nenhuma diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) foi detectada para a expressão dos marcadores imuno-histoquímicos, ou para a detecção de HPV, em relação aos parâmetros analisados, conforme descrito na tabela 6, exceto para a frequência de marcação do Ki-67. A frequência de marcação do Ki-67, comparada entre as pacientes que permaneceram vivas ao final do trabalho (93,0%) e as que evoluíram ao óbito (61,0%) foi estatisticamente diferente, ou seja, uma proporção maior de pacientes que apresentavam expressão positiva de Ki-67 nos tumores permaneceu viva ao final do acompanhamento.

Tabela 6. Significado estatístico das diferenças entre a expressão dos marcadores imuno-histoquímicos, ou a detecção de HPV e HPV-16, em relação aos parâmetros clínico-patológicos analisados.

Variáveis	Valor de p
RE (+)	
Estadiamento clínico	0,2568
Tipo histológico	0,6139
Diferenciação histológica	0,3092
Status menopausal	0,8888
Condição ao final do estudo	0,1601
RP (+)	
Estadiamento clínico	0,3101
Tipo histológico	0,8753
Diferenciação histológica	0,3600
Status menopausal	0,6919
Condição ao final do estudo	0,6421
Ki-67 (+)	
Estadiamento clínico	0,8809
Tipo histológico	0,1949
Diferenciação histológica	0,3481
Status menopausal	0,8322
Condição ao final do estudo	0,0095 *
HPV (+)	
Estadiamento clínico	0,7598
Tipo histológico	0,3991
Diferenciação histológica	0,3014
Status menopausal	0,6094
Condição ao final do estudo	0,8958
HPV-16 (+)	
Estadiamento clínico	0,3880
Tipo histológico	0,7008
Diferenciação histológica	0,4277
Status menopausal	0,6175
Condição ao final do estudo	0,9406

* *Diferença estatisticamente significativa*

5.5 - Análise de sobrevida das pacientes: ao final de 5 anos, a sobrevida global das pacientes analisadas em nosso estudo foi de 31,3%. Utilizando o teste de log rank, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada na sobrevida global das pacientes que expressaram os marcadores imuno-histoquímicos analisados em nosso estudo. A detecção de HPV também não apresentou nenhum efeito estatisticamente significativo na sobrevida das pacientes. O tamanho da amostra (43 pacientes) certamente impediu a detecção de possíveis efeitos significativos dos fatores analisados na sobrevida das pacientes.

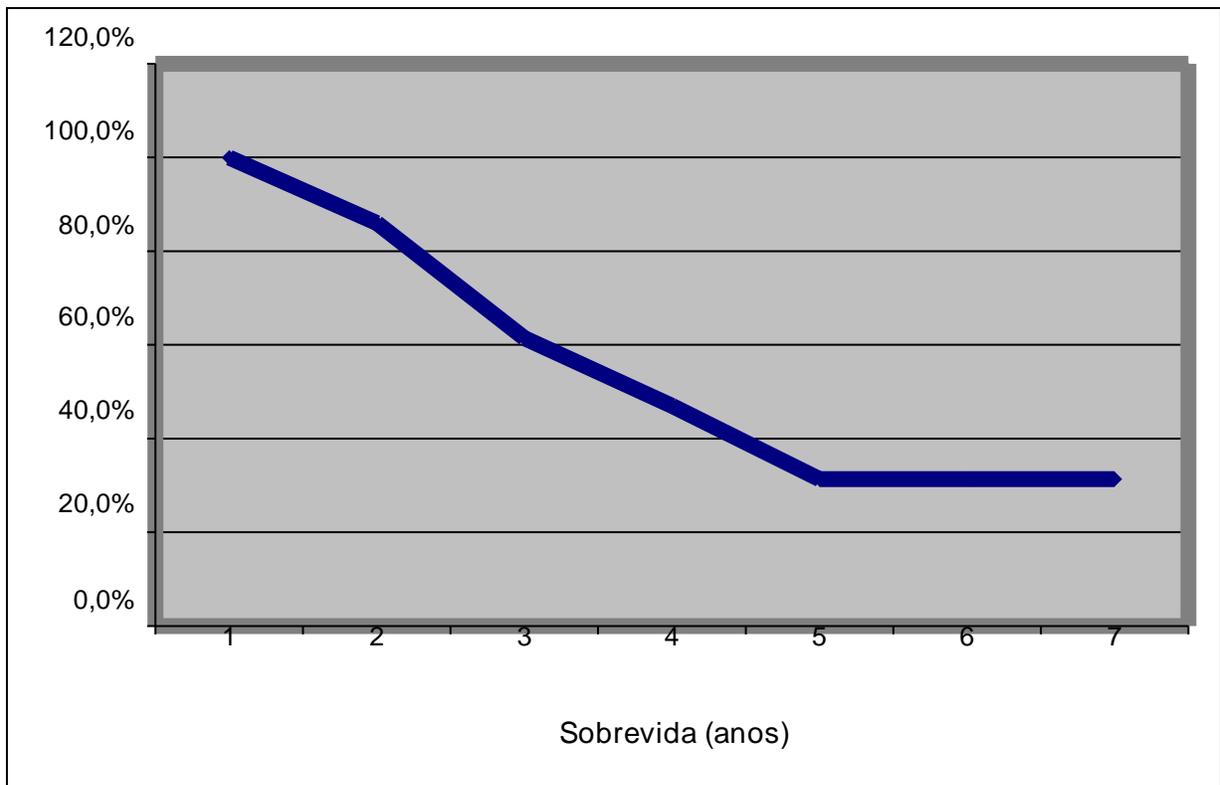


Gráfico 1. Sobrevida geral das pacientes com adenocarcinoma e pacientes com carcinoma adenoescamoso analisadas.

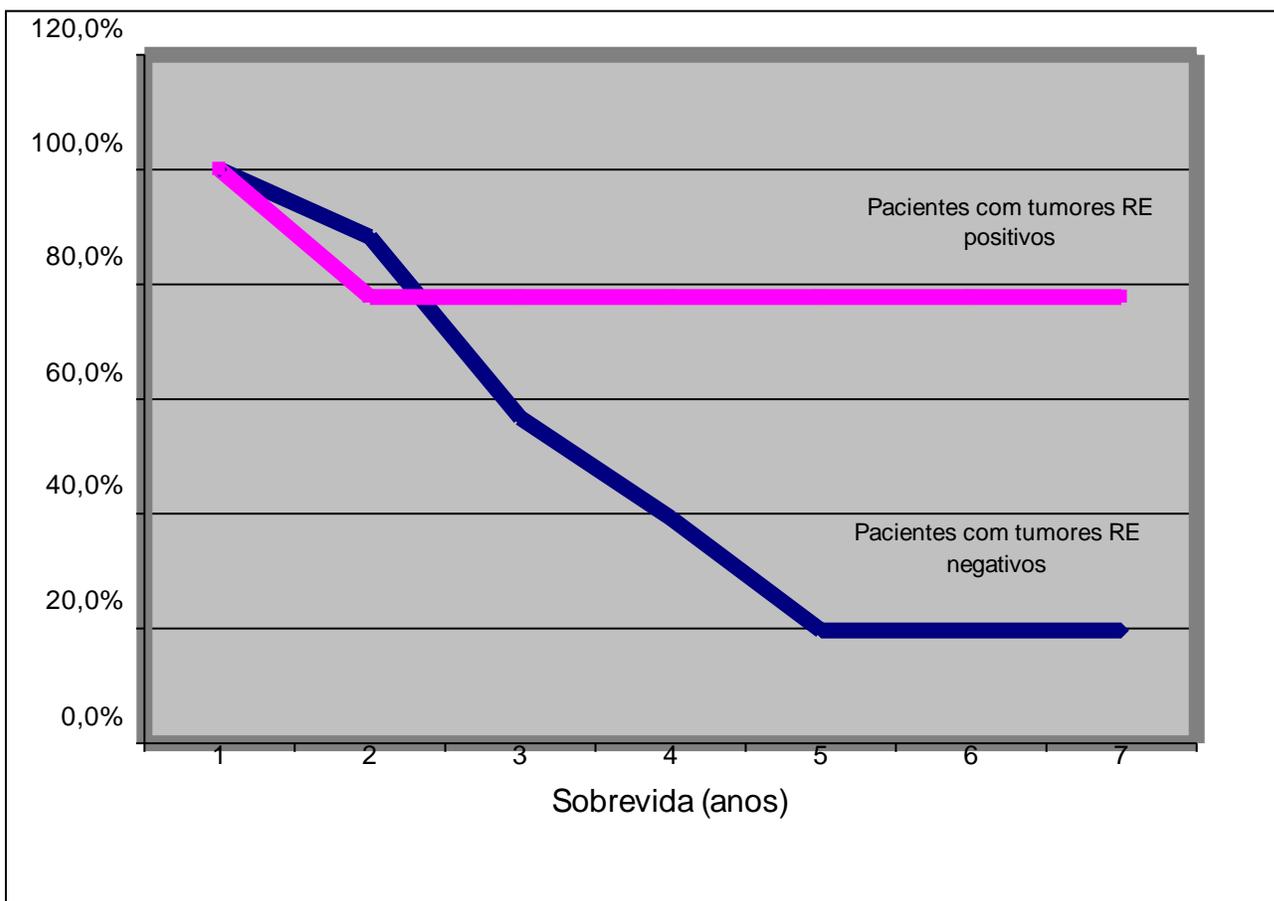


Gráfico 2. Sobrevida das pacientes em relação à expressão de receptores de estrógenos (RE).

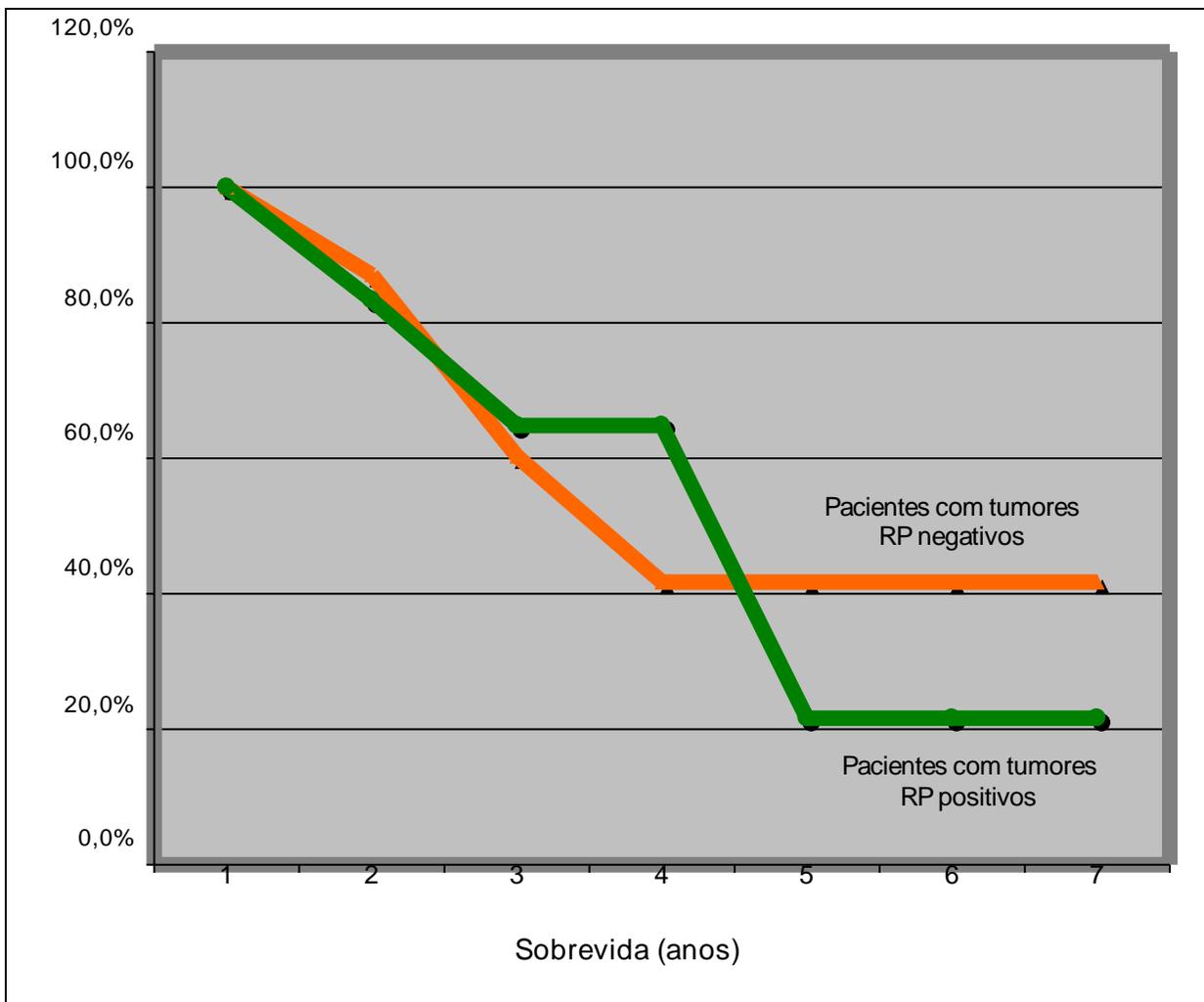


Gráfico 3. Sobrevida das pacientes em relação à expressão de receptores de progesterona (RP).

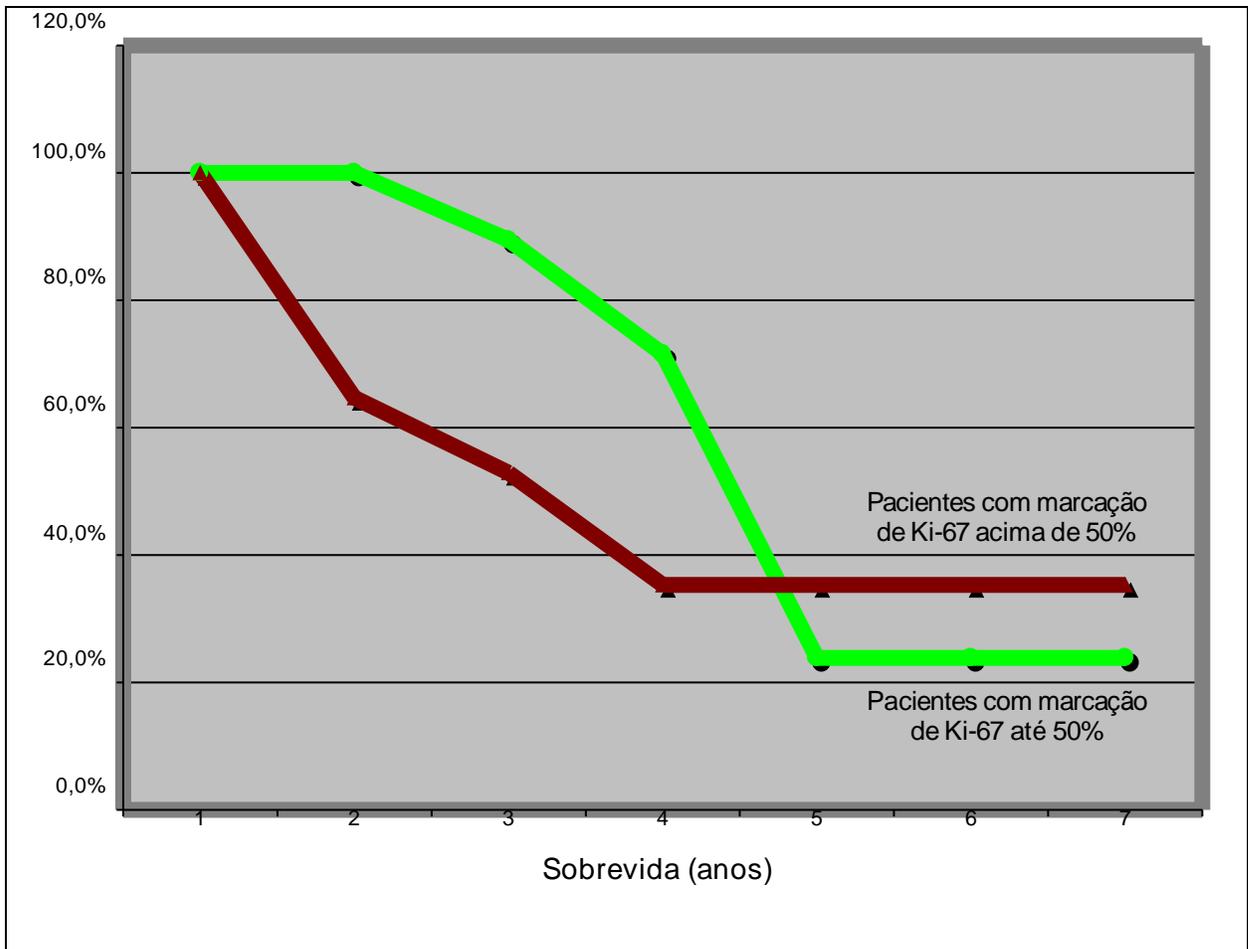


Gráfico 4. Sobrevida das pacientes em relação à marcação de Ki-67, com índices até 50% e com índices maiores que 50%.

6. DISCUSSÃO

A escolha da terapia mais apropriada e a formulação do prognóstico para uma paciente com câncer são feitas com base no conhecimento clínico sobre a extensão da doença e seu comportamento biológico. Os adenocarcinomas cervicais são lesões complexas e com diferentes tipos histológicos reconhecidos. Estudos demonstram que o carcinoma espinocelular cervical evolui a partir de uma série de mudanças histológicas progressivas e bem caracterizadas. Entretanto, para os adenocarcinomas, as lesões precursoras ainda são altamente discutidas, incluindo o adenocarcinoma *in situ*. As alterações genéticas envolvidas na tumorigênese do adenocarcinoma cervical não estão ainda bem claras (Mouron, 2000) e a radiosensibilidade dos adenocarcinomas também parece menor quando comparada com a do carcinoma espinocelular (Pomel C, 2004). Assim, nosso estudo consistiu de uma avaliação molecular do adenocarcinoma cervical invasivo, visando uma melhor compreensão da biologia desses tumores e da busca de marcadores moleculares potencialmente relacionados à resposta dos mesmos à radioterapia.

Dentre os 43 casos de tumores cervicais submetidos à extração de DNA para detecção do genoma do HPV, 40 (93,0%) forneceram DNA apropriado para a realização da PCR, dos quais, 37 (92,5%) apresentaram resultados positivos para detecção do genoma viral. O HPV-16 foi detectado em 30 dos 40 tumores avaliadas (75,0%). Estudos realizados na China (Lo *et al.*, 2002), Taiwan (Lee *et al.*, 1998; Shyu *et al.*, 2001), Japão (Sasagawa *et al.*, 2001), Suécia (Andersson S. *et al.*, 2003(a); 2003(b)) e algumas regiões dos Estados Unidos (Pirog *et al.*, 2000; Altekruise S.F. *et al.*, 2003) também identificaram o HPV-16

como o tipo viral mais prevalente nos adenocarcinomas. No Brasil, somente dois estudos analisaram a prevalência de diferentes tipos do HPV em lesões cervicais detectadas na região Centro Oeste (Saddi, 2004; Rabelo-Santos S.H. *et al.*, 2003) e ambos demonstraram o HPV-16 como o tipo viral mais prevalente nos adenocarcinomas cervicais. Diferenças geográficas relacionadas à ocorrência de diferentes tipos de HPVs têm sido relatadas entre países e também entre diferentes regiões de um mesmo país (Bosch *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1998; Walboomers *et al.*, 1999; Villa *et al.*, 2000).

Nosso estudo demonstrou a imunodeteção de receptores de estrógenos em 9 (21,0%) casos e a imunodeteção de RP em 12 (28,0%) casos de adenocarcinomas analisados. Análises bioquímicas e imunohistoquímicas identificaram os receptores de estrógenos e de progesterona no epitélio colunar endocervical, sugerindo a endocérvice normal como alvo dos hormônios esteróides, vez que a produção e a qualidade do muco endocervical flutua em resposta às mudanças verificadas no ciclo menstrual (Fujiwara *et al.*, 1997). Receptores de estrógenos e de progesterona são reconhecidos como indicadores prognósticos e preditivos em cânceres da mulher, incluído o câncer de mama, câncer de ovário e de endométrio. Alguns estudos sugerem que a expressão de receptores de estrógenos e de progesterona pode apresentar significado prognóstico no adenocarcinoma cervical (Fujiwara *et al.*, 1997; Lu *et al.*, 1999; Suzuki *et al.*, 2000). Nosso trabalho não demonstrou nenhuma correlação significativa entre a expressão dos receptores hormonais e os aspectos clínico-patológicos analisados, e relações entre a expressão dos receptores hormonais e

um aumento na sobrevida global das pacientes, que expressavam esses receptores, também não foi demonstrada.

Vários estudos têm analisado a hiper-expressão de c-erbB-2 em tumores humanos, relacionando este evento com um prognóstico mais sombrio. No que diz respeito aos adenocarcinomas cervicais, os resultados ainda são inconsistentes. Estudos demonstram que c-erbB-2 é freqüentemente expresso em lesões cervicais glandulares relacionadas ao HPV (Roland, 1997), entretanto, a hiperexpressão/amplificação do c-erbB-2 é um achado raro no carcinoma cervical invasivo (Rosty, 2004). A hiperexpressão de c-erbB-2 tem sido correlacionada de forma inversa com o estadiamento clínico (Lee, 2004), e de forma direta com grau tumoral (Ray A., 2002), a progressão e invasão tumoral (Leung TW, 2001) e com a atividade apoptótica em adenocarcinomas cervicais (Leung TW, 2004). Nosso estudo demonstrou a expressão de c-erbB-2 em alguns casos de adenocarcinoma, entretanto, somente um caso, classificado com estadio IIb, apresentou hiperexpressão de c-erbB-2. Em função da raridade do evento, a análise estatística não foi aplicada ao estudo desse marcador.

O índice de proliferação celular de uma neoplasia pode ser estimado pela expressão imuno-histoquímica do Ki-67. No tecido cervical normal, a expressão do Ki-67 é restrita às camadas basais e parabasais da ectocérvice, epitélio metaplásico e camada basal da endocérvice. No desenvolvimento de lesões intraepiteliais, a expressão do Ki-67 pode ser encontrada em camadas intermediárias e superficiais do epitélio. Nas lesões cervicais intraepiteliais, associadas com infecção com HPV tipo 16 e 18, a expressão do Ki-67 é maior do

que nas lesões não relacionadas à presença viral (Cambruzzi E, 2005). A expressão de Ki-67 também foi vista como mais alta em CIN III (Carrilho C, 2005). Nosso estudo demonstrou a marcação positiva de Ki-67 em 36 casos de adenocarcinomas (83,7%) e as freqüências de expressão foram muito similares para os tumores de estágio I (77,2%) e II (82,3%). Dentre as 30 pacientes que estavam vivas ao final do estudo, 28 (93,0%) expressavam Ki-67, enquanto que dentre as 13 pacientes que evoluíram para o óbito, somente 5 (61,0%) expressavam Ki-67. Essa diferença foi estatisticamente significativa, ou seja, uma proporção maior de pacientes que apresentavam expressão positiva de Ki-67 nos tumores permaneceu viva ao final do acompanhamento. Entretanto, quando a sobrevida global foi analisada para as pacientes em relação aos índices de marcação ($< 50\%$ e $\geq 50\%$), nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada.

Nossas análises não foram suficientes para estabelecer o papel dos diferentes marcadores analisados no prognóstico e na resposta das pacientes com adenocarcinoma que receberam radioterapia de forma exclusiva ou em algum momento do seu tratamento. O tamanho da amostra (43 pacientes) certamente impediu a detecção de possíveis efeitos significativos dos fatores analisados na sobrevida das pacientes.

7. CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados, concluímos que:

- (1) Dentre os 43 casos de tumores cervicais submetidos à extração de DNA para detecção do genoma do HPV, 40 (93,0%) forneceram DNA apropriado para a realização da PCR.
- (2) Dentre os quarenta casos testados, 37 (92,5%) apresentaram resultados positivos para detecção do genoma viral.
- (3) O HPV-16 foi detectado em 30 dos 40 tumores avaliados (75,0%).
- (4) A imunodeteção de RE foi positiva em 9 (21,0%) casos e a imunodeteção de RP foi positiva em 12 (28,0%) casos analisados.
- (5) Somente um caso de adenocarcinoma endocervical, classificado com estágio clínico IIb, apresentou hiperexpressão de c-erbB-2, dentre todos os tumores analisados.
- (6) A marcação de Ki-67 foi positiva em 35 (81,0%) casos, sendo que 17 (49,0%) apresentaram índice de marcação <50%, enquanto que 18 (51%) apresentaram índice de marcação $\geq 50\%$.
- (7) Utilizando o teste do chi-quadrado, nenhuma diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) foi detectada para a expressão dos marcadores imuno-histoquímicos, ou para a detecção de HPV, em relação aos parâmetros analisados, exceto para a frequência de marcação do Ki-67.

- (8) Dentre as 30 pacientes que estavam vivas ao final do estudo, 28 (93,0%) expressavam Ki-67 enquanto que dentre as 13 pacientes que evoluíram para o óbito, 5 (61,0%) expressavam Ki-67.
- (9) Utilizando o teste de log rank, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada na sobrevida global das pacientes em relação à expressão dos marcadores imuno-histoquímicos analisados em nosso estudo.
- (10) Nossos achados não foram suficientes para estabelecer o valor prognóstico ou preditivo dos marcadores analisados para os adenocarcinomas cervicais tratados com radioterapia com ou sem cirurgia.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abrão FS. 1995. Tratado de Oncologia Genital e Mamaria. Roca, São paulo, Brasil. 1ª edição: 257 – 310.

Agoff SN, Lin P, Morihara J. 2003. p16(INK4a) expression correlates with degree of cervical neoplasia: a comparison with Ki-67 expression and detection of high-risk HPV types. *Mod Pathol.* 16(7):665-73.

Alfsen GC, Thoresen SO, Kristensen GB. 2000. Histopathologic subtyping of cervical adenocarcinoma reveals increasing incidence rates of endometrioid tumors in all age groups. *Cancer.* 89(6):1291-1299.

Altekruse SF, Lacey JVV Jr, Brinton LA, Gravitt PE, Silverberg SG, Barnes WA Jr., Greenberg MD, Hadjimichael OC, McGowan L, Mortel R, Schwartz PE, Hildesheim A. 2003. Comparison of human papillomavirus genotypes, sexual, and reproductive factors of cervical adenocarcinoma: Northeastern United States. *Am J Gynecol.* 188(3):657-663.

Andersson S, Larson B, Hjerpe A, Silfversward C, Sallstrom J, Wilander E, Rylander E. 2003 (a). Adenocarcinoma of the uterine cervix: the presence of

human papillomavirus and the method of detection. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 82:960-965.

Andersson S, Rylander E, Larson B, Sigurdardottir S, Backlund I, Sallstrom J, Wilander E. 2003(b). Types of human papillomavirus in cervical adenocarcinomas after DNA sequencing. *Oncol Rep.* 10(1):175-179.

Angel C, DuBeshter B, Lin JY. 1992. Clinical presentation and management of stage I cervical adenocarcinoma : a 25 years experience. *Gynecol Oncol*; 44: 71 – 78.

Ayhan A, Al RA, Baykal C. 2005. A comparison of prognoses of FIGO stage IB adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Int J Gynecol Cancer.* 15(5):984

Azodi M, Chambers SK, Rutherford TJ. 1999. Adenocarcinoma in situ of the cervix: management and outcome. *Gynecol Oncol*; 73: 348.

Baalbergen A, Ewing-Grahan PC, Hop WC. 2004. Prognostic factors in adenocarcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol*; 92(1): 262 – 267.

Baalbergen A, Ewing-Graham PC, Hop WCJ. 2004. Prognostic factors in adenocarcinoma of the uterine cervix. *Gynecol. Oncol.* 92:262-267.

Bachtiaruy B, Obermair A, Dreier B. 2002. Impact of multiple HPV infection on response to treatment and survival in patients receiving radical radiotherapy for cervical cancer. *Int J Cancer*. 102(3):237-43.

Berchuck A, Rodriguez G, Kamel A. 1990. Expression of epidermal growth factor receptor and HER-2/neu in normal and neoplastic cervix, vulva, and vagina. *Obstet Gynecol*. 76(3 Pt 1):381-7.

Bhattacharya D, Redkar A, Mitra I. 1997. Oestrogen increase S-phase fraction and oestrogen and progesterone in human cervical cancer. *British Journal of Cancer*; 75(4): 554 – 558.

Bosch FX, Manos MM, Munos N, Scherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kurman R, Shan KV. 1995. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J Nat Cancer Inst*; 87:796-802.

Bosch FX, Mamos MM, Sherman ME. 1995. Prevalence of HPV DNA in cervical cancer in 22 countries. *J natl Cencer Inst (Bethesda)*; 87: 796 – 802.

Boshart M. *et al.*. 1984. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer and in cell lines derived from genital cancer. *EMBO J* 3. 1151 – 1157.

Bravo R, Frank R, Blundel PA, MacDonald-Bravo H. 1987. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase δ . *Nature*; 326:515-517.

Brinton LA, Reeves WC, Breeness MM, *et al.* 1989. Parity as a risk factor for cervical cancer. *Am J Epidemiol*; 130: 486-496.

Cambruzzi E, Zettler CG, Alexandre COP. 2005. Expression Ki-67 and Squamous Intraepithelial Lesions are Related with HPV in Endocervical Adenocarcinoma. *Pathology Oncology Research*. 11: 114-120.

Carrilho C, Cirnes L, Alberto M. 2005. Distribution of HPV infection and tumour markers in cervical intraepithelial neoplasia from cone biopsies of Mozambican women. *J Clin Pathol*. 58(1):61-8.

Chan WK, Klock G, Berbard HU. 1989. Progesterone and glucocorticoid response elements occur in the long control regions of several human papillomaviruses involved in anogenital neoplasia. *J Virol*; 63:3261-3269.

Chen RJ, Chang Daw Y, Yen ML. 1998. Prognostic factors of primary adenocarcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol*; 69: 157 – 164.

Chilvers C, Mant D, Pike MC. 1987. Cervical adenocarcinoma and oral

contraceptives. *Br Med Journal*; 295: 1446 – 1447.

Christopherson WM, Gray LA, Parker JE. 1964. Microinvasive carcinoma of the uterine cervix: a clinical-pathological. *Cancer*; 17: 1123 – 1131.

Christopherson WM, Parker JE. 1965. Relation of cervical cancer to early marriage and childbearing. *N Engl J Med*; 273: 235 – 239.

Cotran RS, Kumar V, Robins SL. 1994. Pathologic Basis of Disease. *W.B. Saunder Company*; 5ª edição: 1047 – 1053.

De Gonzales AB, Sweetland S, Green J. 2004. Comparison of risk factors for squamous and adenocarcinoma of the cervix: a meta-analysis. *Br. J. Cancer*. Advance online publication,

Devesa SS, Young JL, Brinton LA. 1989. Recent trends in cervix uterine cancer. *Cancer*; 64: 2184 – 2190.

Dellas A, Joachim T, Reto G. 2003. DNA Copy Number Changes in Cervical Adenocarcinoma. *Clinical August Research*.9:2985-2991.

DeVitta VT, Hellman S, Rosemberg SA. 2001. *CANCER Principles & Praticce of*

Oncology. Lippincott Willian & Wilkins, Philadelphia, USA. 6ª edição; 1526 – 1550.

Duchrow M, Schlüter C, Wohlenberg. 1995. Molecular characterization of the gene locus of the human cell proliferation-associated nuclear protein defined by monoclonal antibody Ki-67. *Cell Prolif.* 28:1-12

Dürst M Gissman L, Ikenberg H. 1983. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci USA* 80. 3812 – 3815.

Eifel PJ, Morris MO, Wharton JT. 1990. Adenocarcinoma of the uterine cervix: Prognostic and pattern of failure in 367 cases. *Cancer.* 65:2507-2514.

Fagundes H, Perez CA, Grigsby PW. 1992. Distant metastases after irradiation alone in carcinoma of the uterine cervix. *Inter J Radiat Oncol Biol Phys*; 24: 197 – 204.

Farnsworth A, Laveti C, Stoler MH. 1989. Human papillomavirus messenger RNA expression in adenocarcinoma *in situ* of the uterine cervix. *Int J Gynecol Pthol*; 8: 321 – 330.

Ferenczy A. 1997. Glandular lesions: an increasing problem, in: *New Development in Cervical Cancer Screening and Prevention*. Ed. Franco E and Monsonego J. pp 122 - 130.

Fonatsch C, Duchrow M, Rieder H. 1991. Assignet of the human Ki-67 gene (MK 167) to 10q25-qter. *Genomics*. 11:476.

Ford LC, Berek JS, Lagasse LD. 1983. Estrogen and progesterone receptor site in malignancies of the uterine cervix, vagina and vulva. *Gynecol oncol*; 15: 27 – 31.

Fujiwara H, Tortoleto-Luna G, Mitchell MF, KoulosJP, Wright TC. 1997. Adenocarcinoma of the cervix – expression and clinical significance of estrogen and progesterone receptors. *Cancer*. 79:505-512.

Gall SA, Bougeois CH, Maguire R. 1969 The morphologic effects of oral contraceptive agents on the cervix. *JAMA*; 207: 2243 – 2247.

Gerdes J, Schawb U, Lemke H. 1983. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int. J. Cancer*. 31:13-20.

Graflund M, Sorbe B, Hussein A. 2002. The prognostic value of histopathologic grading parameters and microvessel density in patients with early squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Int. J. Gynecol. Cancer*. 12: 32-41.

Gunderson LL, Tepper JE. 2000. Clinical Radiation Oncology. Churchill Livingstone; 1ª edição: 886 – 905.

Herbst AL, Cole PL, Norusis MJ. 1979. Epidemiologic aspects and factors related to survival in 384 registry cases of clear cell adenocarcinoma of the vagina and cervix. *Am J Obstet Gynecol*; 135: 876 – 886.

Instituto Nacional de Câncer – INCA. 2005. *Estimativa 2006: Incidência de cancer no Brasil*; 33 – 34.

International Agency for Research on Cancer. 1992. The epidemiology of human papillomavirus and cervical cancer. *IARC Scientific Publications*; N° 119.

Jaworski RD, Pacey NF, Greenberg ML. 1988. The histologic diagnosis of adenocarcinoma in situ and related lesions of the cervix uteri: adenocarcinoma in situ. *Cancer*; 61: 1171.

Jones MW, Kounelis S, Papadaki H. 2000. Well-differentiated villoglandular adenocarcinoma of the uterine cervix: oncogene/tumor suppressor gene alterations and human papillomavirus genotyping. *Int J Gynecol Pathol*. 19(2):110-7.

Kaku T, Kamura T, Shigematsu T. 1997. Adenocarcinoma of the uterine cervix with predominantly villoglandular papillary growth pattern. *Gynecol. Oncol.* 64: 147-52.

Khare S, Kumar KU, Tang SC, Pater MM, Pater A. 1996. Up-regulation of hormone response of human papillomavirus type 16 expression and increased DNA-protein binding by consensus mutations of viral glucocorticoid response elements. *J Med Virol*;50:254-262.

Kim RY, Weppelmann B, Salter MM. 1987. Skeletal metastases from cancer of the uterine cervix: Frequency, patterns, and radiotherapeutic significance. *Inter J Radiat Oncol Biol Phys*; 13: 705 – 708.

Kihana T, Tsuda H, Teshima S. 1994. Prognostic significance of the overexpression of c-erbB-2 protein in adenocarcinoma of the uterine cervix. *Cancer.* 73:148-153.

Kjaer SK, Brinton LA. 1993. Adenocarcinomas of the uterine cervix: the epidemiology of an increasing problem. *Epidemiologic Reviews*; 15:486 – 498.

Kleter B, van Doorn L-J, Ter Shegget J. 1998. Novel short-fragment PCR assay for highly sensitive broad-spectrum detection of anogenital human papillomavirus. *Am J Pathol*; 153:1731 – 1739.

Lacey JVJr., Swanson CA, Brinton LA. 2003. Obesity as potential risk factor for adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Cancer*; 98(4): 814 - 821.

Landis SH, Murray T, Bolden S. 1999. Cancer statistic. *CA Cancer Journal Clin*

Langosch KM, Riethdorf S, Loning T. 2000. Association of human papillomavirus infection with carcinoma of the cervix uteri and its precursor lesions: theoretical and practical implications. *Virchows Arch*; 437:227-233.

Lea JS, Sheets EE, Wenham RM. 2002. Stage IIB-IVB cervical adenocarcinoma: prognostic factors and survival. *Gynecol. Oncol.* 84:115-119.

Lea JS, Coleman RL, Garner EO. 2003. Adenosquamous histology predicts poor outcome in low-risk stage IB1 cervical adenocarcinoma. *Gynecol. Oncol.* 91: 558-562.

Lee CM, Lee RJ, Hammond E. 2004. Expression of HER2neu (c-erbB-2) and epidermal growth factor receptor in cervical cancer: prognostic correlation with clinical characteristics, and comparison of manual and automated imaging analysis. *Gynecol Oncol.* 93(1):209-14.

Lee CM, Shrieve DC, Zempolich KA. 2005. Correlation between human epidermal growth factor receptor family (EGFR, HER2, HER3, HER4), phosphorylated Akt (P-Akt), and clinical outcomes after radiation therapy in

carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol*; 99(2): 415-21.

Lee K, R. 1989. False positive diagnosis of adenocarcinoma *in situ* of the cervix. *Acta Citology*; 32: 276 – 277.

Lee JS, Kim HS, Jung JJ. 2002. Expression of vascular endothelial growth factor in adenocarcinomas of the uterine cervix and its relation to angiogenesis and p53 c-erbB-2 protein expression. *Gynecol Oncol*. 85(3):469-75.

Lee MF, Chang MC, Wu CH. 1998. Detection of human papillomavirus types in cervical adenocarcinoma by the polymerase chain reaction. *Int J Gynecol Obstet*. 63:265-270.

Leung TW, Cheung AN, Cheng DK. 2001. Expressions of c-erbB-2, epidermal growth factor receptor and pan-ras proto-oncogenes in adenocarcinoma of the cervix: correlation with clinical prognosis. *Oncol Rep*. 8(5):1159-64.

Leung TW, Xue WC, Cheung AN. 2004. Proliferation to apoptosis ratio as a prognostic marker in adenocarcinoma of uterine cervix. *Gynecol Oncol*. 92(3):866-72.

Levêque J, Laurent JF, Burtin F. 1998. Prognostic factors of the uterine adenocarcinoma. *Eur J Obst Gynecol*. 80:209-214.

Lo KW, Wong YF, Chan MK, Li JC, Poon JS, Wang VW, Zhu SN, Zhang TM, He ZG, Wu QL, Li GD, Tam JS, Kahn T, Lam P, Cheun TH, Chung TK. 2002. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a multicenter study in China. *Int J Cancer*. 100(3):327-331.

Lu X, Shiozawa T, Nakayama K, Toki T, Nikaido T, Fujii S. 1999. Abnormal expression of Sex-steroid receptors and cell cycle-molecules in adenocarcinoma in situ of the uterine cervix. *Int. J. Gynecol. Pathol*; 18:109-114.

McLellan R, Dilon MB, Woodruff JD. 1994. Long-term follow-up of stage I cervical adenocarcinoma treated by radical surgery. *Gynecol Oncol*; 42: 253 - 259.

Madeleine MM, Daling JR, Schwartz SM. 2001. Human papillomavirus and long-term oral contraceptive use increase the risk of adenocarcinoma in situ of the cervix. *Câncer Epidemiology, Biomarker &Prevention*; 10: 171 – 177.

Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AJ, Broker TR, Wolinsky SM. 1989. Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells*.; 7:209-213.

Martel P, Connan L, Bonnet F, Delannes M, Farnarier J, Mihura J, El Ghaorui. 2000. Cervical adenocarcinomas: diagnostic, prognostic and therapeutic aspects in a 49 case-control study. *J. Gynecol. Obstet Biol Reprod*; 29(1):48-

54.

Masood S, Rhatigan RM, Wilkinson EW. 1993; 72: 511 – 518.

Mathews CM, Burke TW, Tornos C, Eifel PJ. 1993. Stage I cervical adenocarcinoma: prognostic evaluation of surgically treated patients. *Gynecol Oncol*; 49: 19 - 23.

Mouron SA, Abba MC, Guerci A. 2000. Association between activated K-ras and c-erbB-2 oncogenes with “hegh-risk” and “low-risk” human papilloma virus types in preinvasive cervical lesions. *Mutat Res*. 469(1):127-34.

Nair P, Nair MK, Jayaprakash PG. 1999. Decreased programmed cell death in the uterine cervix associated with high risk human papillomavirus infection. *Pathol Oncol Res*; 5(2): 95 – 103.

Nakanishi T, Isikawa H, Suzuki Y. 2000. A comparison of prognoses of pathologic stage IB adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Gynecol. Oncol*. 79:289-293.

Nishioka T, West CML, Gupta N. 1999. Prognostic Significance of c-erbB-2 protein expression in carcinoma of the cervix treated with radiotherapy. *J Cancer Res Clin Oncol*. 125:96-100.

O' Leary JJ, Landers RJ, Crowley M. 1999. Genotypic mapping of HPV and assessment of EBV prevalence in endocervical lesions. *J Clin Pathol*; 50: 904 – 910.

Paganini –Hill A, Ross RK. 1982. Reliability of recall of drugs usage and other health-information. *Am J Epidemiol*; 116: 114 – 122.

Parazzini F, La Vecchia C. 1990. Epidemiology of adenocarcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol*; 39: 40 – 46.

Parazzini F, La Vecchia C, Franceschi S. 1997. Case control study of estrogen replacement therapy and risk of cervical cancer. *BMJ*; 315: 85 – 88.

Patter A, Bayatpour M, Patter MM. 1990. Oncogenic transformation by human papillomavirus type 16 deoxyribonucleic acid in the presence of progesterone or progestin from oral contraceptives. *Am J Obstet Gynecol*; 1099 – 1103.

Patter MM, Mittal R, Patter A. 1994. Role of steroid hormones in potentiating transformation of cervical cells by human papillomaviruses. *Trends Microbiol.*;2:229-234.

Pecorelli S and Odicino F. 2003. Cervical Cancer Staging. *The Cancer Journal*.2:229-234.

Pedersen D, Bentzen SM, Overgaard J. 1994. Early and late radiotherapeutic morbidity in 442 consecutive patients with locally advanced carcinoma of uterine cervix. *Int. J. Radiat Oncol Biol Phys*; 29: 941 – 952.

Perez CA, Brady LW, Halperin EC. 2004. Principles and Practice of Radiation Oncology. Lippincott Williams & Wilkins; 4ª edição: 1802 – 1915.

Peters RK, Chão A, Mack TM. 1986. Increased frequency of adenocarcinoma of the uterine cervix in young women in Los Angeles County. *JNCI*; 76:423 – 428.

Pinto SA. Estudo da correlação dos achados morfológicos dos tumores de colo uterino: carcinoma escamoso, adenocarcinoma e carcinoma adenoescamoso com a expressão dos marcadores biológicos (Ki-67, bcl-2/bax e E-caderina). Dissertação de Mestrado na área de Ciências da Saúde. Universidade Federal de Goiás, Consórcio UNB/UFG/UFMS, Goiânia-Goiás, Brasil, 2005.

Pirog EC, Kleter B., Olgac S, Bobkiewicz P, Lindeman J, Quint WG, Richart RM, Isacson C. 2000. Prevalence of human papillomavirus DNA in different histological subtypes of cervical adenocarcinoma. *Am. J. Pathol*; 157:1055-62.

Piura B, Dgarri R, Yanal – Inbar J. 1996. Adenocarcinoma of uterine cervix: a study of 37 casos. *J. Surg Oncol*; 61: 249 – 255.

Pomel C, Lhomme C, Duvillard P. 2004. Does adenocarcinoma of uterine

cervix have a worse prognosis than squamous carcinoma? *Gynecol Obstet Fertil.*32(2):116-21.

Prayson RA. 2005. The Utility of MIB-1/Ki-67 Immunostaining in the Evaluation of Central Nervous System Neoplasms. *Adv. Anat. Pathol.* 12:144-148.

Prelich G, Tan CK, Kostura M. 1987. Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and DNA polymerase δ auxiliary protein. *Nature*; 326:517-520.

Rabelo-Santos SH, Zeferino L, Villa LL, Sobrinho JP, Amaral RG, Magalhaes A V. Human papillomavirus prevalence among women with cervical intraepithelial neoplasia III and invasive cervical cancer from Goiania, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 98(2):181-184, 2003

Ray A, Naik SL, Sharma BK. 2002. Distribution of prognostically unfavourable product of c-erbB-2 oncogene and EGF-R in carcinomas of the breast and uterine cervix. *Indian J Physiol Pharmacol.* 46(4):423-33.

Riethdorf S, Riethdorf L, Langosch KM, Park TW, Loning T. 2000. Differences in HPV 16- and HPV 18 E6/E7 oncogene expression between in situ and invasive adenocarcinomas of the cervix uteri. *Virchows Archiv*; 5:491-500.

Roland PY, Stoler MH, Broker TR. 1997. The differential expression of the

HER-2/neu oncogene among high-risk human papillomavirus-infected glandular lesions of the uterine cervix. *Am J Obstet Gynecol.* 177(1):133-8

Rosty C, Couturier J, Vincent-Salomon A. 2004. Overexpression/amplification of HER-2/neu is uncommon in invasive carcinoma of the uterine cervix. *Int J Gynecol Pathol.* 23(1): 13-7.

Rotkin ID. 1967. Adolescent Coitus and cervical cancer association of related events with increased risk. *Cancer Res;* 27: 603 – 617.

Ruch RM, Pitcock JA, Ruch WA. 1976. Microinvasive carcinoma of the cervix. *Am J Obstet Gynecol;* 125: 87 – 92.

Saddi VA. Detecção de HPV e identificação de genes hiperexpressos em adenocarcinomas de colo uterino. Tese de Doutorado, na área de Fisiologia Humana. Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil, 2004.

Sasagawa T, Basha W, Yamazaki H, Inoue M. 2001. High-risk and multiple human papillomavirus infections associated with cervical abnormalities in Japanese women. *Cancer Epidemiol Biomark Prev.*10:45-52.

Schiffman MH and Brinton LA. 1995. *The epidemiology of cervical carcinogenesis.* *Cancer – Supplement;* 76(10): 1888 – 1901.

Schmauz R, Owor R. 1984. Epidemiological aspects of cervical cancer in tropical África. *IARC Sci Publ*; 63: 413 – 431.

Schwartz SM, Weiss NS. 1986. Increased incidence of adenocarcinoma of the cervix in young women in the United States. *Am J Epidemiol*; 124: 1045 – 1047.

Shen K, Yueng W, Ngan H. 1994. Estrogen and progesterone receptors in normal cervix and primary cervical carcinoma. *Chin Med J*; 107(9): 648 - 652.

Shingleton HM, Bell MC, Fremgen A. 1995 Is there really a difference in survival of women with squamous cell carcinoma, adenocarcinoma, and endocervical adenocarcinoma of the cervix? *Cancer*. 76; 1984-1995.

Shyu JS, Chen CJ, Chiu CC, Huang SC, Harn HJ. Correlation of human papillomavirus 16 and 18 with cervical neoplasia in histological typing and clinical stage in Taiwan: a in-situ polymerase chain reaction approach. *J Surg Oncol*. 78(2):101-109, 2001.

Silverberg SG and Ioffe OB. 2003. Pathology of Cervical Cancer. *The Cancer Journal*.:335-347.

Smith HO, Tiffany MF, Qualls CR, Key CR. 2000. The rising incidence of adenocarcinoma relative to squamous cell carcinoma of the uterine cervix in the United States – a 24 year population data-based study. *Gynecol Oncol*; 78: 97

– 105.

Smith JS, Green J, Gonzales AB, Appleby P. 2003. Cervical cancer and use of hormonal contraceptives: a systematic review. *The Lancet*; 361: 1159 - 1166.

Spitz MR, Mitchel MF, Fueger JJ. 1991. Risk profiles of women with cervical neoplasia. *J Câncer Educ*; 6: 241 – 246.

Stehman FB, Rose PG, Greer BE. 2003. Innovations in the treatment of invasive cervical cancer. *Cancer suppl.* 98(9):2052-2063.

Steren A, Nguyen HN, Averette HE. 1993. Radical hysterectomy for stage IB adenocarcinoma of the uterine cervix: the University of Miami experience. *Gynecol Oncol*; 48: 355 - 359.

Suzuki Y, Nakano T, Arai T, Morita S, Tsujii H, Oka K. 2000. Progesterone receptor is a favorable prognostic factor of radiation therapy for adenocarcinoma of the uterine cervix. *Int. J. Radiat Oncol Biol Phys*; 47:1229-24.

Syrjänen KJ and Syrjänen SM. 1999. HPV and Cervical Adenocarcinoma, in: Papillomavirus Infections in Human Pathology. Ed.: John Wiley & Sons, Ltd., pp.189-206.

Tase T, Okagaki T, Clark BA.1988. human papillomavirus type and localization

in adenocarcinoma and adenosquamous carcinoma of the uterine cervix: a study by *in situ* DNA hybridization. *Cancer Res*; 48: 993 – 998.

Tenti P, Romagnoli S, Silini E. 1996. 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*; 106: 52 – 56.

Ursin G, Pike MC, Martin SP. 1996. Sexual, reproductive, and others risk factors for adenocarcinoma of the cervix: results from a population-based case-control study (California, United States). *Cancer Causes and Control*; 7: 391 – 401.

Valentine PT, Uanjani P. 1986. Endocervical neoplasia in long-term users of oral contraceptives: clinical and pathologic observations. *Obstet. Gynecol*; 67:695 -794.

Villa LL, Slichero L, Rahal P, Caballero O, Ferenczy A, Rohan T, Franco EL. Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associates with cervical neoplasia. *J Gen Virol*. 81:2959-2968, 2000.

Vizcaino AP, Moreno V, Bosch FX, Munoz N, Barros-Dios XM, Parkin DM. 1998. International trends in the incidence of cervical cancer: 1. adenocarcinoma and adenosquamous cell carcinoma. *Int. J. Cancer*; 75:536 – 545.

von Knebel Doeberitz M, Spitkovsky D, Ridder R. 1997. Interactions between steroid hormones and viral oncogenes in the pathogenesis of cervical cancer. *Verh. Dtsch. Ges. Pathol*; 81:233-239.

Walboomers JMM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJF, Peto J, Meijer CJLM, Munoz N. 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathol*; 189:12-19.

Yeh L-T, Li Volsi VA, Noutboft JS. 1991. Endocervical carcinoma. *Pathol Res Pract*; 189: 129 – 144.

Young, RH and Clement, PB. 2002. Endocervical adenocarcinoma and its variants: their morphology and differential diagnosis. *Histopathology* 41:185-207.

Yuan F, Auborn K., James C. . 1999. Altered growth and viral gene expression in human papillomavirus type 16-containing cancer cell lines treated with progesterone. *Cancer Invest*;17(1):19-29.

Zhen T, Holford TR, Ma Z, Chen Y, Liu W, Ward BA , Boyle P. 1996. The continuing increase in adenocarcinoma of the uterine cervix: a birth cohort phenomenon. *International Journal of Epidemiology*; 25 (2): 252 – 258.

Zhan YE, Thomas DB, Ray RM. 1995. Combined oral contraceptives and risk

of cervical carcinoma *in situ*. *International Journal of Epidemiology*; 24(1): 19 – 26.

zur Hausen H, Meinhof W, Scheiber W. 1974. Attempts to detect virus-specific DNA sequences in human tumor : 1. Nucleic acid hybridization with complementary RNA of human wart virus. *Int J Cancer*; 13: 650 – 656.

First experiments to search for papillomavirus DNA in cervical cancer.

zur Hausen H. 1976. Condylomata acuminata and human genital cancer. *Cancer Res*; 36: 530.

zur Hausen H. 1977. Human papilloma viruses and their possible role in squamous cell carcinoma. *Curr Top Microbiol Immunol*; 78: 1 – 30.

zur Hausen H. 2002. Papillomavirus and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature Reviews Cancer*; 2: 342 – 350.