



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
MESTRADO EM PATOLOGIA**

THIAGO SILVA LIMA

**EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DA PROTEÍNA DE SUPRESSÃO
TUMORAL p16^{INK4a} COMO MARCADOR DE ADENOCARCINOMA DE COLO
UTERINO**

**FORTALEZA
2013**

THIAGO SILVA LIMA

EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DA PROTEÍNA DE SUPRESSÃO TUMORAL
p16^{INK4a} COMO MARCADOR DE ADENOCARCINOMA DE COLO UTERINO

Dissertação submetida à coordenação de Pós-Graduação em Patologia Tropical, do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. José Eleutério Junior

FORTALEZA
2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- L711e Lima, Thiago Silva.
Expressão imunohistoquímica da proteína de supressão tumoral p16^{INK4a} como marcador de adenocarcinoma de colo uterino/ Thiago Silva Lima. – 2013.
44 f. : il.
- Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Mestrado em Patologia, Fortaleza, 2013.
Orientação: Prof. Dr. José Eleutério Junior.
1. Adenocarcinoma. 2. Colo do Útero. 3. Proteínas Supressoras deTumor. 4. Infecções por Papillomavirus . I.Título.
-

CDD 616.994

THIAGO SILVA LIMA

EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DA PROTEÍNA DE SUPRESSÃO TUMORAL
p16^{INK4a} COMO MARCADOR DE ADENOCARCINOMA DE COLO UTERINO

Dissertação submetida à coordenação de Pós-Graduação em Patologia Tropical, do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de mestre.

Aprovado em: ____/____/2013

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Eleutério Júnior (Orientador)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^ª. Dra. Margarida Pompeu

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^ª. Dra. Romélia Gonçalves Pinheiro

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^ª. Dra. Zenilda Vieira Bruno

Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. José Eleutério Junior, por ajudar na concretização deste projeto. Que possamos unir forças e investir ainda mais tempo e esforços em prol da pesquisa.

Aos meus pais, Flávio e Elisoneide, pelo amor, proteção, incentivo e investimento pessoal e profissional não só durante este período, mas sempre. Para vocês meu eterno obrigado.

À Prof. Margarida Pompeu, pela compreensão e incentivo durante toda essa trajetória, que nossos caminhos continuem se cruzando por muitas e muitas vezes.

Ao meu irmão, pela amizade e companheirismo que tanto foram importantes nos momentos difíceis. Obrigado pelos momentos de descontração.

À Dra. Maria Perpétuo Socorro, patologista do Instituto do Câncer do Ceará, pelo apoio na obtenção dos casos.

À Dra. Diane Isabelle Magno Cavalcante, pela ajuda inestimável na realização dos testes imunohistoquímicos.

Aos colegas do mestrado em Patologia, pelos momentos felizes de convivência.

Obrigado especial ao bom Deus, pois sem ele nada disso seria possível.

RESUMO

O câncer cervical é o segundo mais comum na população feminina mundial e cerca de 20% desses tumores são classificados como adenocarcinomas. O diagnóstico histopatológico do adenocarcinoma de colo uterino, por ser subjetivo pode, em determinadas situações, tornar-se desafiador, pois faltam parâmetros para a sua definição, o que indica a necessidade de um marcador que seja adjuvante nesta afirmação e, que, possivelmente, aponte para o prognóstico da lesão. A proteína inibidora de quinase, p16^{ink4a} tem sido alvo de vários estudos, os quais apontam superexpressão como marcador de lesões cervicais induzidas pelo Papilomavírus Humano (HPV) e preditor de mau prognóstico. Esta pesquisa tem como objetivo principal avaliar a utilidade diagnóstica do biomarcador p16^{INK4a} no adenocarcinoma de colo uterino. Em estudo de corte transversal, não intervencional, foi feita a pesquisa por imunohistoquímica de p16 em 30 blocos de parafina com diagnóstico histológico, confirmado por dois patologistas como: adenocarcinoma endocervical (19), adenocarcinoma endocervical tipo endometrióide (3), adenocarcinoma de Células Claras (2), adenocarcinoma pouco diferenciado sólido (1), adenocarcinoma seroso (1), adenocarcinoma tipo endometrióide componente viloglandular (1), adenocarcinoma endocervical associado a carcinoma epidermóide *in situ* (1), carcinoma adenoescamosos (1), adenocarcinoma desvio mínimo (1). Aos resultados foi aplicada tabela de contingência e teste exato de Fisher (intervalo de confiança de 95%). Para concordância diagnóstica foi aplicado o índice de Kappa. Foram considerados positivos 80% (24/30) dos casos de adenocarcinoma Invasivo para a expressão da p16. Não houve expressão da p16 em nenhum dos casos de (0/18) pólipos adenomatosos utilizados como controle negativo. A performance do p16 no diagnóstico do adenocarcinoma de colo uterino, demonstrou alta sensibilidade (75%) , alta especificidade (100%) e principalmente alto valor preditivo negativo (80%). O índice de concordância diagnóstica demonstrou ser muito bom para o p16 ($\kappa = 0,75$). A forte associação do marcador p16 com adenocarcinoma do colo uterino pode representar uma importante ferramenta diagnóstica utilizada para diminuir os diagnósticos de lesões equívocas.

Palavras-chave: Adenocarcinoma. Colo do Útero. Proteínas Supressoras de Tumor. Infecções por Papillomavirus.

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADC - Adenocarcinoma
- AIS - Adenocarcinoma *in situ*
- CDK - Ciclin dependent kinase
- CEC - Carcinoma espinocelular
- CIS - Carcinoma epidermóide *in situ*
- DST - Doença sexualmente transmissível
- E - Região early do genoma do HPV
- E2F - Transcription factor (TF) in higher eukariotes
- E6 - Transforming protein, binds to p53
- E7 - Transforming protein, binds to pRb/p107
- FIGO - Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
- G1 - Fase da mitose que precede a síntese de DNA
- HPV - Papilomavírus humano
- HSIL - High grade intraepithelial lesion (lesão intraepitelial escamosa de alto grau)
- INCA - Instituto Nacional de Câncer
- L - Região late do genoma do HPV
- MCM - Minicromossomo
- OMS - Organização Mundial de Saúde
- p16 - Ou p16^{INK4a} biomarcador de alteração da função do pRb
- PCNA - Proliferação do Antígeno Nuclear da Célula
- pRB - Proteína do retinoblastoma
- RR - Risco relativo
- VPN - Valor preditivo negativo
- VPP - Valor preditivo positivo
- κ - Kappa

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Intensidade de Expressão do p16 em casos de adenocarcinomas do colo uterino.....	29
Tabela 2	Porcentagem de células positivas em casos de diagnóstico histopatológico de adenocarcinoma do colo uterino.....	29
Tabela 3	Escore médio de expressão do marcador p16 em células de biópsias com diagnóstico de pólipos endocervicais adenomatosos e adenocarcinoma do colo uterino.....	30
Tabela 4	Expressão do p16 entre casos com diagnóstico de pólipos endocervicais adenomatosos e adenocarcinoma do colo uterino.....	31
Tabela 5	Estudo de sensibilidade, especificidade e valores preditivos negativos e positivos para p16 no diagnóstico de adenocarcinoma do colo uterino.....	31

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Classificação histopatológica dos adenocarcinomas cervicais puros.....	14
Quadro 2	Estadiamento dos carcinomas cervicais de acordo com a FIGO.....	18

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 Representa uma ilustração simplificada demonstrando os biomarcadores de neoplasia cervical e seus efeitos no ciclo celular..... 17
- Figura 2 Números de estudos publicados por ano sobre p16INK4a, MIB-1, BD-ProEx C, e proteína do capsídeo L1..... 19

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	
1.1	Definição e Classificação histopatológica do adenocarcinoma endocervical	12
1.2	Etiologia e Fatores de risco	14
1.3	HPV e adenocarcinoma endocervical	15
1.4	Estadiamento Clínico	17
1.5	Biomarcadores de Lesões neoplásicas cervicais	18
1.6	p16	20
2	JUSTIFICATIVA	22
3	OBJETIVOS	23
3.1	Objetivo Geral	23
3.2	Objetivos Específicos	23
4	METODOLOGIA	24
4.1	Seleção de Casos	24
4.2	Análises de prontuários	24
4.3	Revisão histopatológica	24
4.4	Grupo Controle	25
4.5	Imunohistoquímica	25
4.5.1	Avaliação Qualitativa e Quantitativa da expressão do p16	25
4.6	Análise Estatística dos resultados	26
4.7	Aspectos Éticos	27

5	RESULTADOS	28
6	DISCUSSÃO	36
7	CONCLUSÃO	39
	REFERÊNCIAS	40
	ANEXOS	45

1 INTRODUÇÃO

Mundialmente, cerca de 500.000 novos casos de câncer do colo do útero (~ 1 caso por minuto) são diagnosticados e 275 mil mortes por câncer de colo do útero ocorrem anualmente. (PARKIN *et al.*, 2005).

O Câncer de colo uterino é a segunda neoplasia mais frequente na população feminina, atrás apenas do câncer de mama, e a quarta causa de morte de mulheres por câncer no Brasil. No ano de 2012, estima-se que 17.540 novos casos de câncer do colo do útero tenham sido registrados, com um risco de 17 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2012). Excetuando-se as neoplasias de pele não-melanoma, o câncer do colo do útero é o mais incidente na região Norte (24/100 mil). Nas regiões Centro-Oeste (28/100 mil) e Nordeste (18/100 mil) ocupa a segunda posição, na região Sudeste (15/100 mil), a terceira, e na região Sul (14/100 mil), a quarta posição. (INCA, 2012).

A incidência de câncer de colo do útero torna-se mais evidente na faixa etária de 20 a 29 anos e o risco aumenta até atingir seu pico máximo geralmente na faixa etária de 45 a 49 anos. Quase 80% dos novos casos de câncer de colo do útero ocorrem nos países em desenvolvimento (PARKIN *et al.*, 2005). Vários são os fatores responsáveis por diferenças epidemiológicas, tais como o padrão socioeconômico, imunodeficiência e infecção pelo HIV (SCHIFFMAN *et al.*, 1993).

Dentre os cânceres cervicais, o carcinoma espinocelular (CEC) é o mais frequente, enquanto os adenocarcinomas são relativamente incomuns (PETERS, 1986; SCHWARTZ, 1986; KIETPEERRAKOOL *et al.*, 2006). Entretanto, estudos epidemiológicos tem demonstrado um aumento na incidência de adenocarcinomas de cérvix uterina especialmente entre mulheres mais jovens (ABU BACKER; NIK MUSTAPHA; HAYATI OTTHMAN, 2011). Segundo dados do instituto nacional do câncer do Brasil (INCA), o adenocarcinoma já corresponde a segunda neoplasia mais frequente de colo uterino, com prevalência de 12 a 15% (CAMBRUZZI; ZETTLER; PEREIRA, 2005; GONÇALVES *et al.*, 2007).

Além disso, adenocarcinoma apresenta um pior prognóstico quando comparado ao carcinoma epidermóide, sendo que o aumento da sua prevalência pode está relacionado ao emprego difundido de métodos diagnósticos, como o exame citopatológico, a colposcopia e a biópsia (CAMBRUZZI; ZETTLER; PEREIRA, 2005). Permanece controverso se há relação entre o aumento na incidência e a detecção tardia pelo teste papanicolau, já que precursores de

adenocarcinoma são muitas vezes difíceis de serem identificados e adenocarcinoma invasivo está frequentemente presente no momento em que a neoplasia é detectada (ZALOUDEK, 2011).

1.1 Definição e classificação histopatológica do adenocarcinoma endocervical

Inicialmente reconhecidos como uma entidade distinta por Noris, em 1936, os adenocarcinomas originam-se nas glândulas endocervicais, mas raramente podem surgir a partir de remanescentes dos ductos mesonéfricos, podendo se apresentar sob a forma invasiva ou *in situ*. (SYRJANEN; SYRJANEN, 1999).

O adenocarcinoma *in situ* (AIS) é uma incomum mas bem definida lesão pré-invasiva de glândulas endocervicais. AIS é uma condição rara que acredita-se ser uma lesão precursora que pode progredir para adenocarcinoma invasivo. Displasia de células escamosas e carcinoma *in situ* de cérvix uterina, muitas vezes, coexistem com adenocarcinoma *in situ*. Essa associação sugere que o mesmo agente etiológico pode desempenhar um importante papel na transformação maligna das células de reserva, a qual é reconhecida como sendo a célula de origem para ambos os tipos de neoplasia cervical. (FRANCO; ROHAN, 2001).

O adenocarcinoma *in situ* é caracterizado por apresentar uma variedade de diferenciação celular, incluindo células calciformes. Os núcleos são geralmente em *cigar-shaped* e pseudo-estratificados, mostrando cromatina grosseira e numerosas mitoses. A displasia glandular, uma lesão com alterações menos acentuadas, em comparação com AIS, tem sido sugerido como um precursor do AIS, mas tem sido questionada, devido à sua fraca reprodutibilidade no diagnóstico e, em especial, ao seu valor clínico insignificante (GOLDSTEIN *et al.*, 1998; WRIGHT, 2002). Segundo Ioffe *et al.* (2003), um sistema de pontuação foi proposto para fazer a distinção entre a displasia glandular e AIS, mas devido ao seu valor clínico limitado, tem sido sugerido que o termo “displasia glandular” deixe de ser utilizado na prática clínica.

Adenocarcinoma cervical apresenta uma variedade de padrões (TAVASSOLI, 2003). Se vários componentes histológicos estão presentes em um tumor, a classificação deve

basear-se no padrão predominante, e o outro padrão, se presente em pelo menos 10% do tumor, deverá apenas ser mencionado no relatório (WRIGHT, 2002).

A morfologia diversificada desses tumores resulta em dificuldades para o diagnóstico diferencial. Estudos que visam elucidar 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; IOFFE, 2003).

Os adenocarcinomas de endocérvice uterina podem ser classificados em puros ou mistos e apresentam vários padrões histológicos, sendo os mais comuns os tipos endocervicais, adenocarcinoma mucinoso e endometrióide, que juntos correspondem cerca de 90% do total de casos (SMITH *et al.*, 2000; YOUNG, 2002).

Uma categoria de adenocarcinoma microinvasivo também foi estabelecida, mas, em contraste com o seu homólogo de células escamosas, o diagnóstico é mais difícil e tem sido controverso. Basicamente todos os tipos histológicos de adenocarcinoma podem ser encontrados nesta categoria. O critério mais importante para o diagnóstico, a invasão do estroma, nem sempre é visível em pequenas lesões glandulares do colo do útero. Em particular, as lesões glandulares são bem diferenciadas e superficialmente localizadas podendo ser difíceis de serem diagnosticadas (WHEELER, 2005).

A classificação histopatológica dos adenocarcinomas cervicais, proposta pela Organização Mundial de Saúde, encontra-se resumida no quadro 1 (SILVERBERG; IOFFE, 2003). 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 de 5% de crescimento glandular sólido; os de grau II, apresentam mais de 5% e menos que 50% de crescimento glandular sólido e os de grau III apresentam mais de 50% de crescimento glandular tumoral sólido (SILVERBERG; IOFFE, 2003).

Quadro 1 – Classificação histopatológica dos adenocarcinomas cervicais puros.

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

Fonte: Adaptado de Silverberg e Ioffe, 2003.

1.2 Etiologia e fatores de riscos

O reconhecimento dos fatores de risco, ligados ao comportamento sexual e ao câncer de colo uterino, levou à descoberta da importante relação entre o Papilomavírus humano (HPV) e o câncer cervical. Estudos epidemiológicos demonstram que, além de HPV de alto risco oncogênico, outros fatores estão relacionados ao desenvolvimento do câncer cervical, tais como: a idade do início da atividade sexual, números de parceiros sexuais e a promiscuidade do parceiro sexual. Fatores secundários, como número de partos, uso crônico de contraceptivo oral, tabagismo, imunodeficiência, doenças sexualmente transmissíveis (DST) e outros (BURD, 2003).

Crescentes evidências apoiam a hipótese de uma relação entre hormônios esteróides e adenocarcinoma cervicais. O risco de desenvolvimento de uma neoplasia cervical aumenta em mulheres que fizeram uso prolongado de anticoncepcionais orais, (5 anos ou mais), sendo mais relevante para o surgimento de adenocarcinomas (BERRINGTON DE GONZALES; SWEETLAND; GREEN, 2004).

No tocante a alta paridade, verificou-se que o risco para o desenvolvimento de neoplasias cervicais dobra em mulheres que apresentam o DNA do HPV e que tiveram quatro

filhos, quando comparado com as que tiveram um ou nenhum; isso porque, as alterações hormonais causadas pela multiparidade constituem por si só, um fator de risco (BURD, 2003).

Outro fator de risco, que vem sendo atribuído ao aparecimento do adenocarcinoma do colo uterino, inclui a obesidade e a distribuição da gordura corporal; Estabelecendo mais uma vez, a possível relação hormonal com os tumores glandulares (LACEY JUNIOR *et al.*, 2003).

1.3 HPV e adenocarcinoma endocervical

A ligação entre infecções genitais por HPV e câncer cervical foi demonstrada pela primeira vez, no início de 1980 por Harold Zur Hausen, virologista alemão. Desde então, a ligação entre o HPV e o carcinoma de células escamosas do colo do útero tem sido bem estabelecida (BURD, 2003).

O DNA do HPV pode ser encontrado tão assiduamente nos adenocarcinomas *in situ*, nos adenocarcinomas invasivos quanto nos CEC cervicais (BOSCH *et al.*, 1995). Nos adenocarcinomas *in situ*, por exemplo, aproximadamente 86% dos casos apresentam HPV integrado ao genoma (MADELEINE *et al.*, 2001).

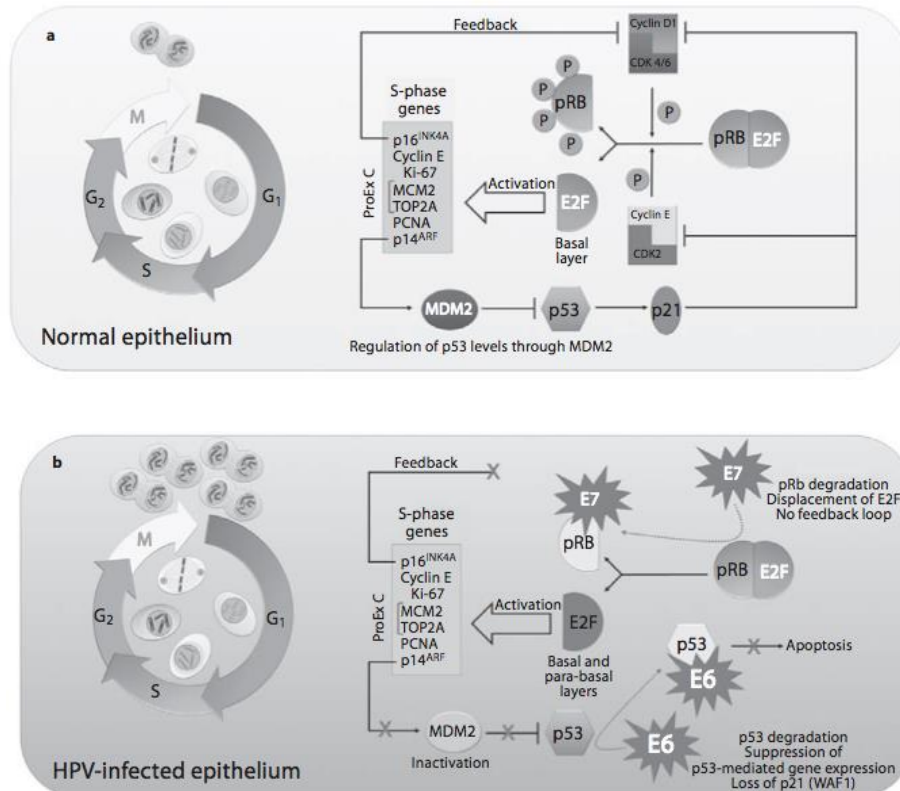
O evento inicial na transformação celular é a infecção com HPV de alto risco oncogênico e a interação dos produtos dos genes precoces E6 e E7, as oncoproteínas virais E6 e E7. O produto do HPV interage com as proteínas da célula do hospedeiro rompendo algumas funções biológicas e causando desequilíbrio na expressão das oncoproteínas E6 e E7 nas células basais. Tanto a oncoproteína E6 como a E7 atuam sobre proteínas supressoras de tumor, a p53 e a pRb, respectivamente. Normalmente, a ligação da pRb com o fator de transcrição E2F bloqueia a ativação do ciclo celular. Nas células em replicação, o E2F é regulado pela fosforilação da pRb (DOORBAR, 2006; MANSOUR *et al.*, 2007).

A fosforilação da pRb é normalmente inibida pelas quinases ciclina-dependentes (CdK) 4 e CdK-6, as quais são controladas por várias proteínas inibidoras de quinases, dentre elas, a p16^{INK4a}, da família INK4a. A E7 interage com a pRb de forma análoga à fosforilação mediada pelas CdKs, promovendo sua degradação via proteosomas (GIARRÉ *et al.*, 2001; DOORBAR, 2006). Isso resulta na liberação de E2Fs e ativação do ciclo celular estimulando o avanço da célula para a fase S. Normalmente, isso seria contrabalanceado pela ativação da

p53, com consequente ativação da via de apoptose da célula. Entretanto, a E6 aumenta a degradação da p53 impedindo a apoptose. A habilidade em promover a degradação da p53 é uma propriedade exclusiva da E6 de HPVs de alto risco, ressaltando a importância deste evento na carcinogênese induzida pelo vírus. Com o E2F livre, E7 dependente não é mediada pela fosforilação da pRb, a regulação pela p16^{INK4a} não tem efeito no ciclo celular ativado. Haverá superexpressão de p16^{INK4a}, pela perda da repressão habitualmente mediada pelo complexo pRb/E2F e pela forte ativação pela E2F livre. Já que as CdK-4 e CdK-6 não sofrem inibição pela p16^{INK4a}, os genes da fase S são continuamente ativados, imortalizando a célula (DOORBAR, 2006; MANSOUR *et al.*, 2007).

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. 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 (ZUR HAUSEN, 2002).

Figura 1 - Representa uma ilustração simplificada demonstrando os biomarcadores de neoplasia cervical e seus efeitos no ciclo celular.



a Epitélio normal: Fatores de crescimento ativam o complexo ciclina D1/CDK4/6 que, por sua vez, hiperfosforiliza a pRB. A E2F é então liberada e ativa genes que controlam a fase S do ciclo celular. A p16INK4a, através de um mecanismo de retroalimentação negativa, inativa as ciclinas D1/CDK4/6 e portanto a E2F. p14ARF controla os níveis de p53 nas células e ativa p21 o qual é inibidor de CDK.

b Epitélio infectado por HPV: O oncogene E7 do HPV se liga e inativa a pRB liberando E2F e ativando assim, a progressão do ciclo celular. A retroalimentação negativa realizada pelo p16INK4a é ignorada levando à atividade prolongada do E2F. O oncogene E6 do HPV liga-se a p53, resultando na sua supressão (PINTO *et al.*, 2012).

1.4 Estadiamento clínico

O estadiamento clínico dos adenocarcinomas cervicais é realizado de acordo com as recomendações preconizadas pela FIGO, definidas em 2009. Baseia-se na avaliação clínica (inspeção, toque vaginal e toque retal), colposcopia e exames radiológicos. O sistema, usado para carcinomas cervicais, contempla tanto carcinomas escamosos como adenocarcinomas e carcinomas adenoescamosos (Quadro 2) (PECORELLI; ODICINO, 2009).

Quadro 2 – Estadiamento dos carcinomas cervicais, de acordo com a FIGO.

Estádio I – Tumor restrito ao colo sem extensão ao corpo uterino.

- IA Tumor invasivo somente diagnosticado por microscópio com invasão < 5mm e extensão < 7mm.
- IA1 – Invasão estromal < 3mm e extensão < 7mm.
- IA2 – Invasão estromal entre 3 e 5mm e extensão < 7mm.
- IB Tumor clinicamente visível limitado ao colo ou tumores pré-clínicos > estágio IA.
- IB1 – Tumor clinicamente visível < 4cm em seu maior diâmetro.
- IB2 – Tumor clinicamente visível > 4cm em seu maior diâmetro.

Estádio II – Tumor invadindo o útero mas não a parede pélvica ou terço inferior da vagina.

- IIA Não há invasão parametrial
- IIA1 – Tumor clinicamente visível < 4cm em seu maior diâmetro
- IIA2 – Tumor clinicamente visível > 4cm em seu maior diâmetro
- IIB Tumor com invasão parametrial

Estádio III – Tumor com extensão a parede pélvica e/ou comprometido terço inferior da vagina e/ou causa hidronefrose ou rim não funcionante.

- IIIA Tumor invade terço inferior da vagina sem extensão à rede pélvica
- IIIB Extensão à parede pélvica e/ou hidronefrose ou rim não funcionante

Estádio IV – Tumor estende-se além da pelve ou invade a mucosavesical ou do reto.

- IVA Extensão a órgãos adjacentes
 - IVB Extensão a órgãos a distância
-

Fonte: Adaptado de Pecorelli e Odicino (2009).

1.5 Biomarcadores de lesões neoplásicas cervicais

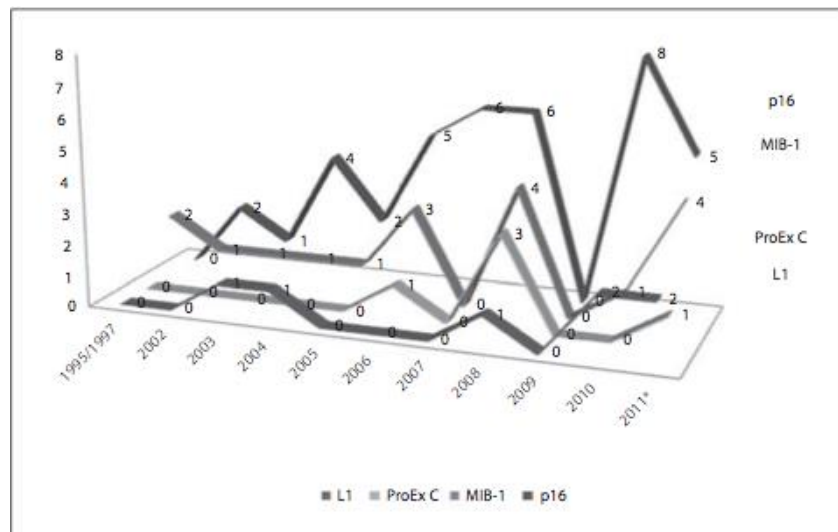
Por definição, biomarcador refere-se a qualquer molécula ou característica biológica detectável e/ou quantificável que possa, em determinado momento, refletir condições de normalidade ou anormalidade dos diversos processos bioquímicos e biológicos. No rastreamento do carcinoma cervical, um marcador eficiente precisa ser sensível para que os casos que requerem tratamento não sejam sub-diagnosticados. Precisa também ser específico, para detectar apenas casos realmente positivos. Além disso, deve ter um bom valor preditivo positivo, que indicará a proporção de mulheres diagnosticadas como de alto risco e que realmente o são; e um bom valor preditivo negativo, o qual mostra que um resultado negativo representa realmente ausência da doença. Um bom marcador deve estar especificamente

associado à progressão da doença, ou seja, ter a capacidade de discriminar lesões de baixo ou alto grau, com risco de progredir, daquelas com maior chance de regredir espontaneamente (WENTZENSEN, 2007).

Um marcador molecular ideal não é, necessariamente, um substituto para a presença de HPV de alto risco, pelo contrário, o marcador iria refletir a interrupção do ciclo celular, oriunda da soma de todos os estímulos que atuam sobre a célula, durante a carcinogênese. Grande parte dos marcadores, disponíveis atualmente, são alvos moleculares da família do fator de transcrição E2F. Estas incluem as moléculas necessárias para a progressão do ciclo celular (por exemplo, a ciclina E), a replicação do DNA (Proteínas de Manutenção de Minicromossomo – MCM), a síntese de DNA (PCNA – Proliferação do Antígeno Nuclear da Célula) e controle do ciclo celular (p16^{INK4a} e p21/WAF1) (BALDWIN; LASKEY; COLEMAN, 2003).

De acordo com Pinto *et al.* (2012), os biomarcadores de lesões neoplásicas cervicais têm sido o foco de pesquisa há mais de uma década. Estudos, como o de Baldwin, Laskey e Coleman (2003), demonstram que a coloração positiva para os marcadores p16^{INK4a}, MIB-1 e BD-ProEx CTM está altamente correlacionada com a presença de lesão intra-epitelial escamosa de alto grau (HSIL).

Figura 2 - Números de estudos publicados por ano sobre p16INK4a, MIB-1, BD-ProEx C, e proteína do capsídeo L1



Fonte: Pinto *et al.*, 2012.

Marcadores de proliferação celular, de prognóstico e de supressão tumoral vêm sendo

testados em busca de indicadores mais confiáveis na identificação de lesões cervicais com real risco de evolução para carcinomas escamosos (CAMERON *et al.*, 2002). No entanto, pouco se tem feito em relação a estudos destes testes em adenocarcinomas endocervicais.

1.6 P16^{ink4a}

O difícil diagnóstico de adenocarcinoma *in situ*, a partir de lesões benignas, tais como, a metaplasia tubária, alterações reativas e outros processos benignos, particularmente em pequenas amostras de biópsias, torna-se desafiador. Porém, o uso de alguns marcadores de diagnóstico, como o P16^{ink4a}, tem demonstrado potencial para discriminar lesões glandulares endocervicais benignas das malignas. Do mesmo modo, é um excelente marcador para diferenciar adenocarcinoma de cérvix uterina de adenocarcinoma endometrial (CAMERON *et al.*, 2002; ABU BACKER; NIK MUSTAPHA; HAYATI OTTHMAN, 2011).

P16^{ink4a} (P16) foi proposta como um marcador de lesões neoplásicas do epitélio cervical. Como a p16 é um marcador da atividade do oncogene E7 do papilomavírus humano, pode ser encontrado em quase todas as lesões escamosas de alto grau, como também em adenocarcinomas de colo uterino (LIANG *et al.*, 2007; MULLER *et al.*, 2008).

O Gene *p16* (CDKN2/INK4a), classificado como supressor tumoral, está localizado no cromossomo 9p21 e codifica uma proteína de 16 kDa, que controla negativamente a progressão do ciclo celular no *checkpoint* G1/S. Normalmente, o gene TP53, através de sua proteína, envia sinal para o *p16* que é um gene inibidor de CDK/ciclina e há parada do ciclo celular (ROCCO; SINDRANSKY, 2001). O gene *p16* inibe o grupo de proteínas reguladoras, denominadas kinases dependentes de ciclina (CDK), as quais inibem ou ativam fases específicas do ciclo celular. Uma das formas de silenciamento deste gene é a hipermetilação, inativando sua transcrição e contribuindo para o desenvolvimento tumoral (BRENNAN, 2000).

Dessa forma, a presença da proteína p16 expressa a possibilidade de existência de um tumor. Com o uso de métodos imunohistoquímicos é possível avaliar a positividade dessa proteína. Em células do colo do útero, tal positividade está ligada à presença de HPV de alto risco (McCLUGGAGE *et al.*, 2006).

Entre os biomarcadores, relacionados com a expressão oncogênica do HPV, a proteína inibidora de quinase P16^{ink4a} tem sido alvo de vários estudos, os quais apontam

superexpressão como marcador de lesões cervicais induzidas pelo HPV e preditor de mau prognóstico (WANG *et al.*, 2004; ELEUTERIO *et al.*, 2007; KONG *et al.*, 2007).

2 JUSTIFICATIVA

A enorme variabilidade de padrões histológicos do adenocarcinoma de colo uterino, resulta em lesões superficiais as quais são dificilmente detectadas. Sendo assim, o diagnóstico histopatológico, por ser subjetivo, pode em determinadas situações, tornar-se desafiador, pois faltam parâmetros para a sua definição, o que indica a necessidade de um marcador que seja adjuvante nesta afirmação e, que, possivelmente aponte para o prognóstico da lesão.

Apesar do marcador P16^{INK4a} apresentar potencial diagnóstico em vários tumores, o *status* desse marcador no adenocarcinoma invasivo de colo uterino não está totalmente definido, haja vista se tratar de um tumor pouco recorrente dificultando sua análise e abordagem com fins de diagnóstico. Portanto, há a necessidade de avaliar o marcador P16^{INK4a} nos adenocarcinomas de colo uterino, objetivando uma melhor abordagem diagnóstica dessa neoplasia.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a utilidade diagnóstica da proteína P16^{INK4a} como marcador de adenocarcinoma de colo uterino.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a expressão do p16 no adenocarcinoma invasivo;
- Avaliar a expressão do p16 em outros subtipos histológicos de adenocarcinoma do colo uterino.
- Determinação da sensibilidade, especificidade e valor preditivo positivo e negativo do p16 em relação ao adenocarcinoma de colo uterino.

4 METODOLOGIA

4.1 Seleção de casos

Trata-se de um estudo de corte transversal, não intervencional. Foram estudados casos à partir de blocos de parafina dos arquivos do Instituto do Câncer do Ceará e do Departamento de Patologia – UFC. Casos de pacientes com diagnóstico histopatológico de adenocarcinoma de colo uterino, por meio de listagens fornecidas pelo Registro de Câncer do Instituto do Câncer do Ceará e do arquivo do Departamento de Patologia – UFC, cujos tecidos remanescentes nos blocos permitissem a confecção de novos cortes histológicos para novo HE e imunohistoquímica para p16, foram incluídos no estudo.

Foram considerados critérios de exclusão: material insuficiente para revisão e para aplicação de testes, assim com falta de dados em prontuário.

4.2 Análise de prontuários

Foi realizado análise de prontuário para arrolamento de dados pessoais das pacientes e de aspectos clínicos, de diagnóstico e de estadiamento da lesão, baseado nos critérios da Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia, FIGO, 2009.

4.3 Revisão histopatológica

Todos os blocos obtidos foram submetidos a corte de 5 micras para confecção de lâminas que foram coradas em hematoxilina-eosina (HE) e avaliadas de forma cega em microscópio óptico Nikon eclipse E 200 por dois patologistas para que se incluíssem apenas casos com diagnósticos concordantes e inequívocos de adenocarcinoma. Os critérios adotados para a classificação e graduação histológica foram os da FIGO (PECORELLI; ODICINO, 2009) e da Organização Mundial de Saúde, OMS (SILVERBERG; IOFFE, 2003).

4.4 Grupo controle

Como grupo controle, foram utilizadas biópsias de pólipos adenomatosos endocervicais sem metaplasia tubária associada, provenientes dos mesmos arquivos.

4.5 Imunohistoquímica

Dos mesmos blocos (grupos de estudo e controle) foram realizados cortes de 4 micras para confecção de lâminas com Poli-L-lisina a 10% (Sigma, USA) para imunohistoquímica de p16^{INK4a} usando CINtec® Histology kit (MTM Laboratories, Heidelberg, Germany). O CINtec® Histology kit tem como base o anticorpo monoclonal de camundongo (clone E6H4®) contra a proteína humana p16^{INK4a}. De acordo com o protocolo do fabricante, procede-se a recuperação antigênica em banho-maria (95-99 °C) por 10min, em seguida bloqueio da peroxidase endógena por 10 min, incubação com anticorpo de camundongo anti-p16^{INK4a} humano (anticorpo pré-diluído) por 30 min, incubação com anticorpo secundário conjugado a polímero por 30 min, seguida de revelação pelo substrato de cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB), leve contra-coloração com hematoxilina de Harris (1 min) e montagem com bálsamo sintético. Todos os reagentes do kit usados na reação eram prontos pra uso (prediluídos ou concentrados 10x).

4.5.1 Avaliação qualitativa e quantitativa da expressão do p16^{INK4a}

A avaliação da expressão do marcador p16 foi realizada, segundo o preconizado por Schorge *et al.* (2004), através da utilização de escores obtidos a partir da soma dos escores utilizados para intensidade de expressão do p16 e de porcentagem de células positivas.

Para cada diagnóstico histopatológico foi realizada uma média obtida, pela soma dos escores e o número de casos de cada tipo histológico.

A intensidade da expressão do p16, determinada em escores, foi baseada nos critérios de Schorge *et al.* (2004):

I - 0: Sem coloração;

II - 1: Fraca coloração;

III - 2: Moderada coloração;

IV - 3: Forte coloração

Para determinação da frequência de células marcadas com p16, foi utilizado o seguinte critério (SCHORGE *et al.*, 2004):

I - 0: Nenhum;

II - 1: <5%;

III - 2: 6% - 25%;

IV - 3: 26% - 50%;

V - 4: 51% - 75%;

VI - 5: > 75%

A avaliação da expressão pode variar no intervalo de 0 a 8, sendo 0 sem expressão e 8 expressão máxima do marcador. (SCHORGE *et al.*, 2004).

Os resultados foram interpretados conforme critérios já validados em outros estudos (GUIMARAES *et al.*, 2005; ELEUTERIO *et al.*, 2007; CAVALCANTE *et al.*, 2012).

4.6 Análise estatística dos resultados

Foi aplicada tabela de contingência convencional para cálculo de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo e risco relativo para o marcador em relação ao diagnóstico de adenocarcinoma de colo uterino, bem como o teste exato de Fisher para significância estatística com intervalo de confiança de 95%.

Ao final foi aplicado o índice de Kappa para concordância diagnóstica entre o diagnóstico duplo cego morfológico e a marcação pelo p16. Considerando-se os seguintes

resultados : <0 = muito ruim; 0 a 0,2 = ruim; 0,2 a 0,4 = razoável; 0,4 a 0,6 = bom; 0,6 a 0,8 = muito bom e 0,8 a 1 = excelente.

4.7 Aspectos éticos

Este projeto de pesquisa foi submetido à avaliação e aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa do Instituto do Câncer do Ceará (protocolo 042/2011).

As normas preconizadas pela “Declaração de Helsink” e suas modificações (DECLARAÇÃO DE HELSINKI, 1990), como também, as normas da Resolução 196 do ministério da saúde (BRASIL,1996), foram seguidas.

5 RESULTADOS

Foram selecionados 30 (trinta) casos de biópsias/conização de colo uterino dos arquivos do Departamento de Patologia oriundos da Maternidade Escola Assis Chateaubriand – MEAC, Hospital Universitário Walter Cantídio – UFC e do Instituto do Câncer do Ceará. – ICC.

Dos 30 casos, 19 (63,3%) foram diagnosticados como adenocarcinoma endocervical, 3 (10%) tiveram diagnósticos como adenocarcinoma endocervical tipo endometrióide, 2 (6,6%) foram diagnosticados como adenocarcinoma de Células Claras, 1(3,3%) foi diagnosticado como adenocarcinoma pouco diferenciado sólido, 1 (3,3%) como adenocarcinoma seroso, 1 (3,3%) como adenocarcinoma tipo endometrióide componente viloglandular, 1 (3,3%) como adenocarcinoma endocervical associado a carcinoma epidermóide *in situ* (CIS), 1 (3,3%) como carcinoma adenoescamoso e 1 (3,3%) como adenocarcinoma desvio mínimo.

A expressão da proteína p16 foi avaliada nos 30 casos. As amostras com coloração nuclear e citoplasmática intensa, moderada e difusa, foram consideradas positivas para p16. Os casos que expressaram a proteína de forma fraca, esporádica ou que não expressaram, foram considerados negativos.

As tabelas 1 e 2 apresentam os escores obtidos segundo Schorge *et al* (2004) para a intensidade de expressão do p16 e percentual de células tumorais positivas, respectivamente

Tabela 1 - Intensidade de Expressão do p16 em casos de adenocarcinomas do colo uterino

Tipo Histológico	Intensidade de Expressão			
	Negativo	Fraco	Moderado	Forte
Pólipo Endocervical	18/18	0/18	0/18	0/18
ADC Endocervical	4/19	3/19	4/19	8/19
ADC Tipo Endometrióide	0/3	0/3	1/3	2/3
ADC Pouco Diferenciado Sólido	0/1	0/1	1/1	0/1
ADC Seroso	0/1	0/1	1/1	0/1
ADC Tipo Endometrióide Componente Viloglandular	0/1	0/1	0/1	1/1
ADC Endocervical + CIS	0/1	0/1	0/1	1/1
Adenoescamoso	0/1	1/1	0/1	0/1
ADC Células Claras	1/2	0/2	0/2	1/2
ADC Desvio Mínimo	1/1	0/1	0/1	0/1

ADC: Adenocarcinoma

Tabela 2 - Porcentagem de células positivas em casos de diagnóstico histopatológico de adenocarcinoma do colo uterino.

Tipo Histológico	% de Células Tumorais Positivas					
	Negativo	< 5%	6% - 25%	26% - 50%	51% - 75%	> 75%
Pólipo Endocervical	18/18	0/18	0/18	0/18	0/18	0/18
ADC Endocervical	4/19	2/19	1/19	2/19	3/19	7/19
ADC Tipo Endometrióide	0/3	0/3	0/3	2/3	0/3	1/3
ADC Pouco Diferenciado Sólido	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1/1
ADC Seroso	0/1	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1
ADC Tipo Endometrióide Componente Viloglandular	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1/1
ADC Endocervical + CIS	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1/1
Adenoescamoso	0/1	0/1	1/1	0/1	0/1	0/1
ADC Células Claras	1/2	0/2	0/2	0/2	0/2	1/2
ADC Desvio Mínimo	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1

ADC: Adenocarcinoma

Diante a totalidade de casos de adenocarcinomas invasivos submetidos à imunohistoquímica: 7 casos de adenocarcinomas endocervicais, 1 caso de adenocarcinoma de células claras, 1 caso de adenocarcinoma desvio mínimo e 1 caso de adenoescamoso apresentaram expressão negativa para o marcador p16.

Aproximadamente um terço dos casos de adenocarcinomas invasivos, com exceção de 7 casos de adenocarcinomas endocervicais, 1 adenocarcinoma de células claras e 1 adenocarcinoma desvio mínimo, apresentaram expressão positiva para o marcador p16.

Dentre os 2 casos de adenocarcinomas de células claras, 1 apresentou porcentagem de células tumorais positivas superior a 75% com intensidade forte para expressão do p16; o mesmo pode ser notado em 7 dos 19 casos de adenocarcinomas endocervicais.

Identificou-se, em 43,3% dos casos de adenocarcinomas invasivos, intensidade forte para expressão do p16 e 40% apresentaram percentual de células tumorais positivas superior a 75%.

Foram considerados positivos, 66,6% (20/30) dos casos de Adenocarcinoma Invasivo. Não houve expressão de p16 em nenhum dos casos utilizados como controle (0/18) (Tabela 4).

A tabela 3 apresenta a média do escore obtido através da análise da intensidade e do percentual de células tumorais positivas para a expressão de p16 (Schorge *et al.*, 2004).

Tabela 3 - Expressão do marcador p16 em células de biópsias com diagnóstico de pólipos endocervical adenomatoso e adenocarcinoma do colo uterino.

Tipo Histológico	p16ink4a Negativo	P16ink4a Positivo	Total
Polipo Endocervical	18 (100%)	0 (0%)	18 (100%)
ADC Endocervical	7 (36.8%)	12 (63.2%)	19 (100%)
ADC Endometrióide	0 (0%)	3 (100%)	3 (100%)
ADC Pouco Diferenciado Sólido	0 (0%)	1 (100%)	1 (100%)
ADC Seroso	0 (0%)	1 (100%)	1 (100%)
ADC Tipo Endometrióide Componente Viloglandular	0 (0%)	1 (100%)	1 (100%)
ADC Endocervical + CIS	0 (0%)	1 (100%)	1 (100%)
Adenoescamoso	1 (100%)	0 (0%)	1 (100%)
ADC Células Claras	1 (50%)	1 (50%)	2 (100%)
ADC Desvio Mínimo	1 (100%)	0 (0%)	1 (100%)
Total	28 (50%)	20 (50%)	48 (100%)

Tabela 4- Expressão do p16 entre casos com diagnóstico de pólipos endocervical adenomatoso e adenocarcinoma do colo uterino.

Tipo Histopatológico	P16ink4a Negativo	P16ink4a Positivo
Polipo Endocervical	18 (100%)	0 (0%)
Adenocarcinoma Invasivo	10 (33.4%)	20 (66.6%)

Considerando-se a correlação entre a expressão de p16 e o diagnóstico de adenocarcinoma de colo uterino, a sensibilidade foi de 66.7%, a especificidade foi de 100%, os valores preditivos positivo (VPP) e negativo (VPN) foram de 100% e 64.29%, respectivamente. O índice Kappa que avaliou a concordância diagnóstica entre o histopatológico e a marcação do p16ink4a foi de 0,60. (Tabela 5).

Tabela 5 - Estudo de sensibilidade, especificidade e valores preditivos negativo e positivo para p16 no diagnóstico de adenocarcinoma do colo uterino.

Marcador Imunohistoquímico	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN	Kappa (IC)	EP
P16ink4a	66.7%	100%	100%	64.29%	0.6 (0.398 - 0.802)	0.103

Abreviações: IC, Intervalo de confiança (95%); VPP, Valor preditivo positivo; VPN, Valor preditivo negativo; EP, Erro padrão.

Kappa;

< 0 - Muito Ruim

0 - 0,2 - Ruim

0,2 - 0,4 - Razoável

0,41-0,6 - Bom

0,61-0,8 - Muito Bom

0,81-1 - Excelente

Figura 3 - Imunoexpressão moderada de p16ink4a em adenocarcinoma do colo uterino (50x)

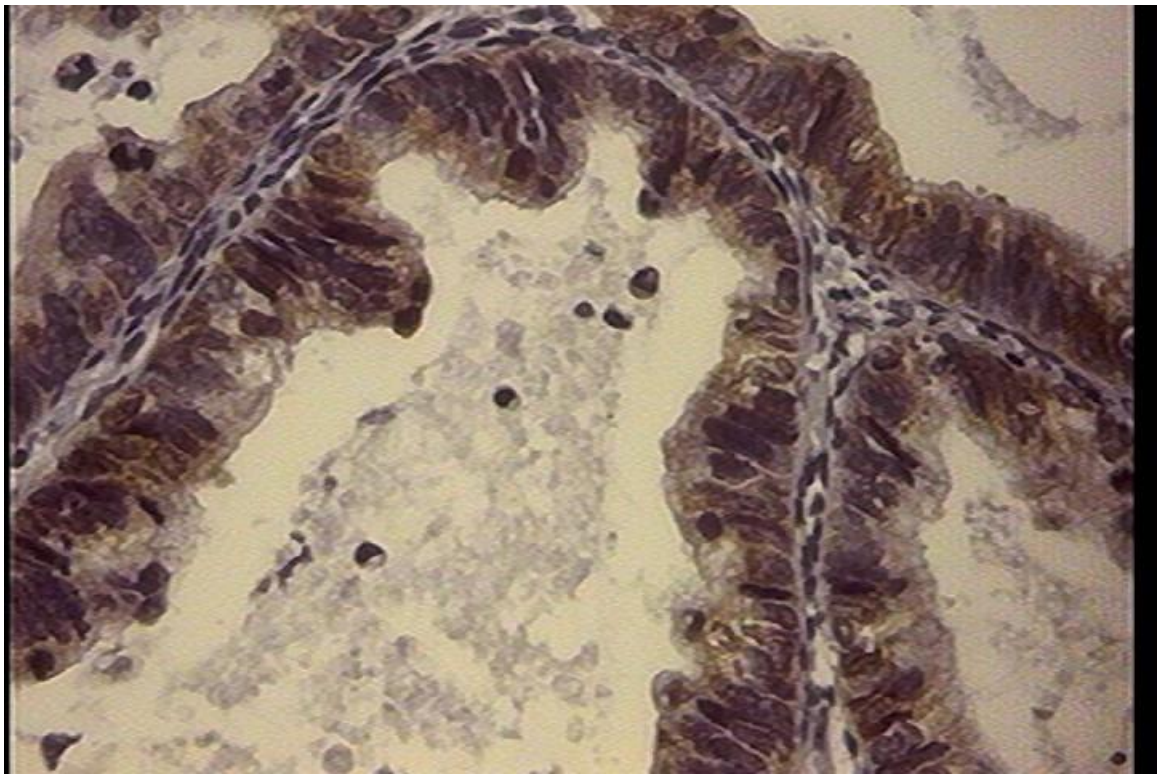


Figura 4 - Expressão imunohistoquímica moderada de p16 ink4a em adenocarcinoma (50x)

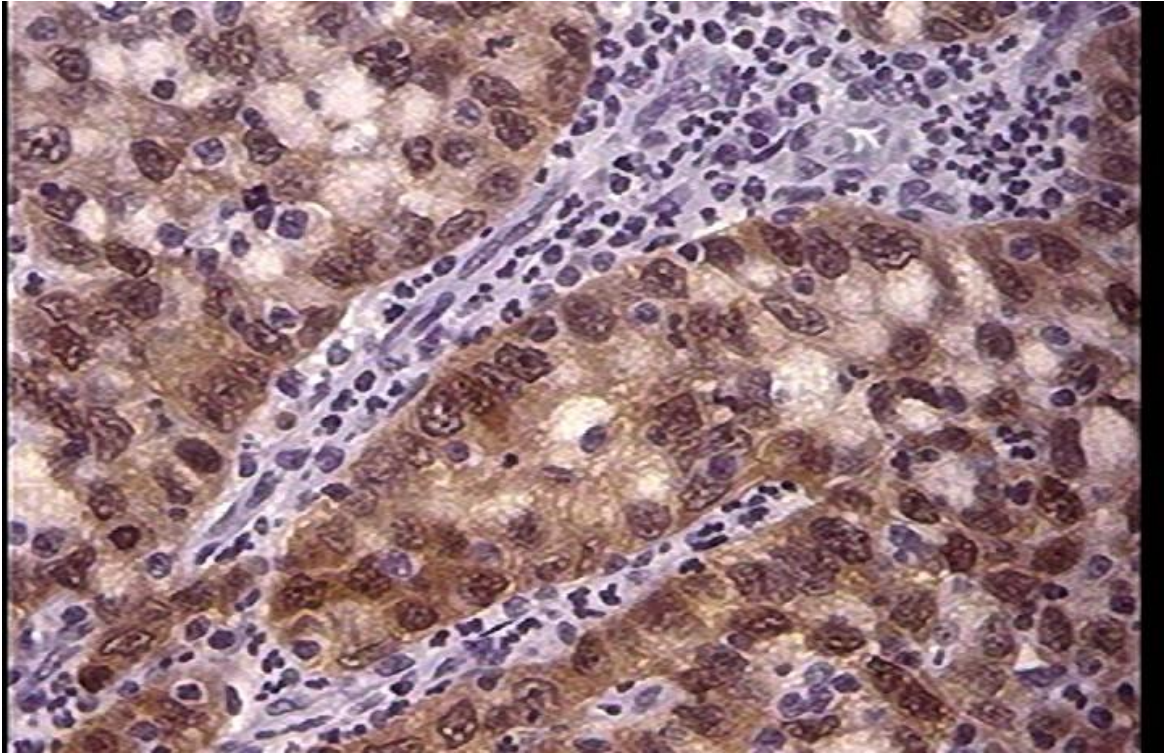


Figura 5 - Expressão imunohistoquímica forte de p16 ink4a em adenocarcinoma do colo (50X)

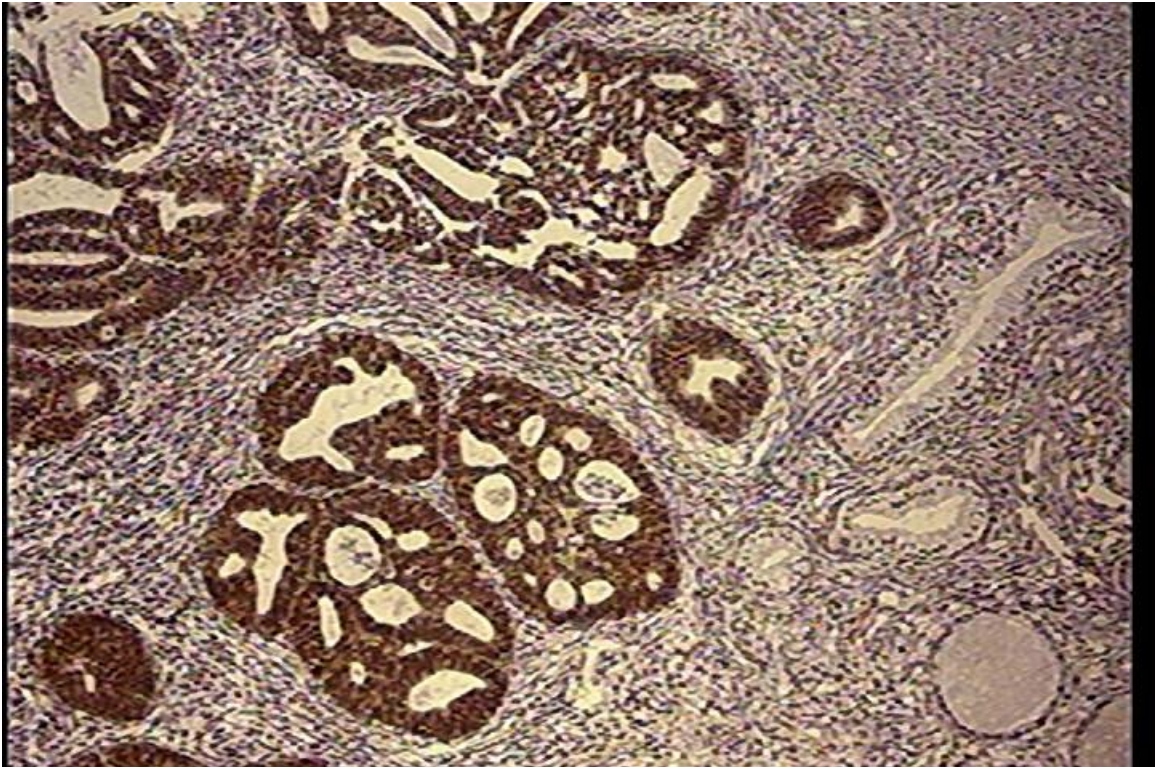


Figura 6 - Expressão imunohistoquímica forte de p16ink4a em adenocarcinoma do colo (100X)

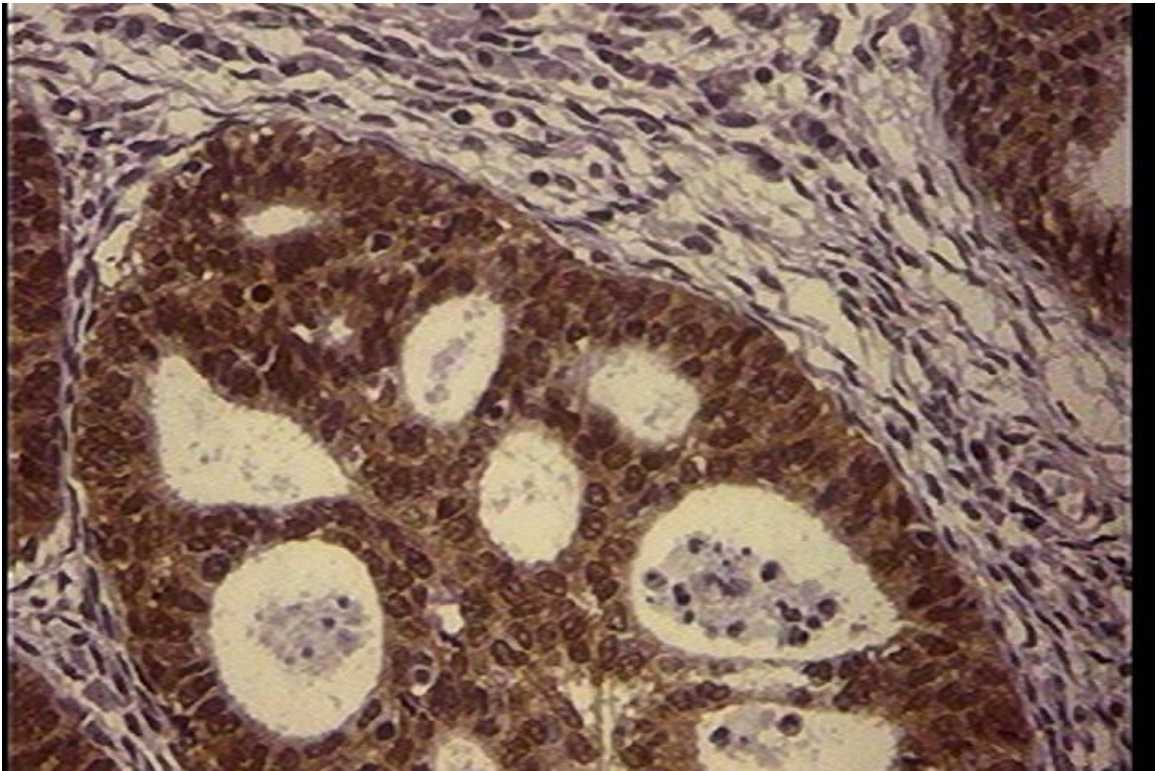


Figura 7 - Expressão imunohistoquímica forte de p16ink4a em adenocarcinoma de células claras. (100x)

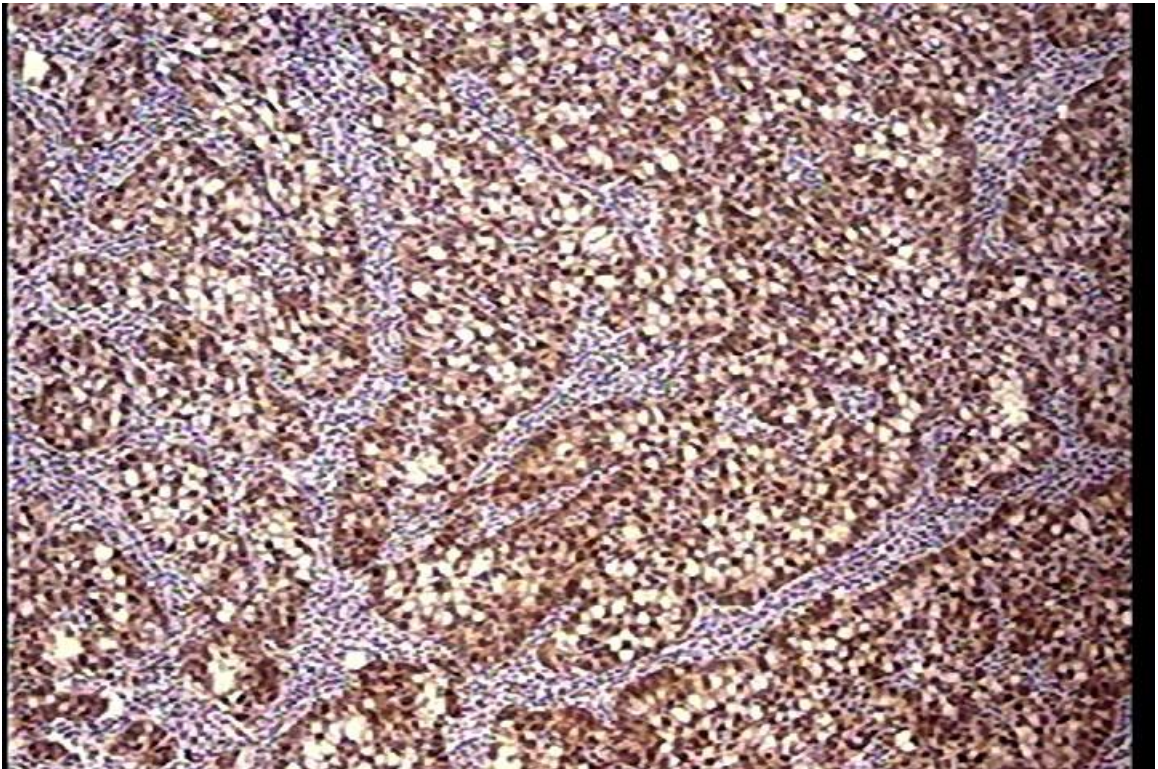


Figura 8 - Ausência de expressão imunohistoquímica de p16ink4a em adenocarcinoma do colo uterino (100x)

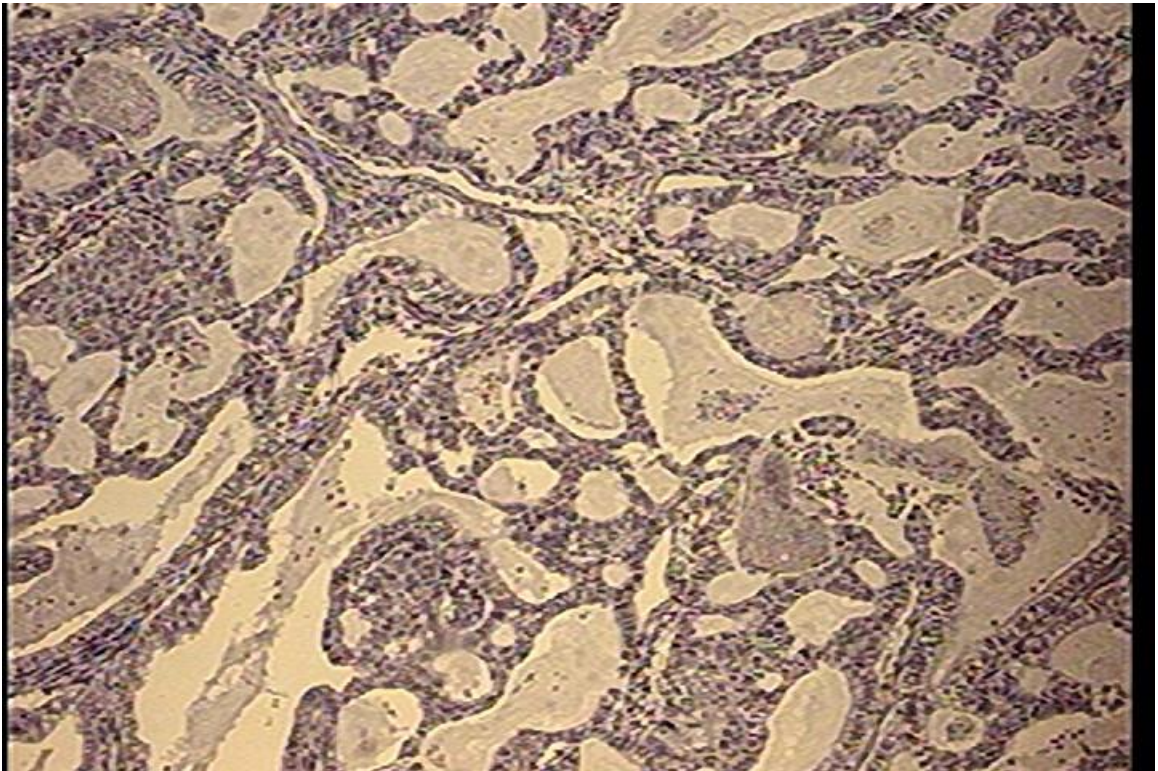
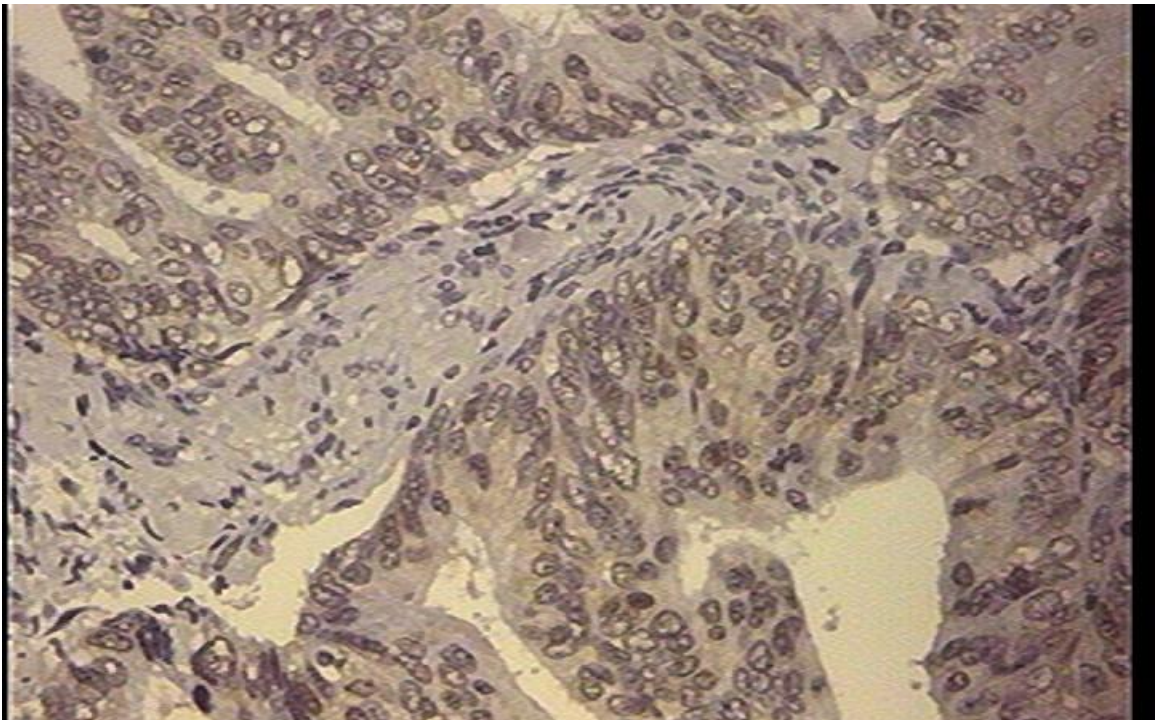


Figura 9 - Ausência de expressão imunohistoquímica de p16ink4a em adenocarcinoma do colo uterino (50x)



6 DISCUSSÃO

A taxa de incidência de adenocarcinoma do colo uterino aumentou nas últimas décadas (ABU BACKER; NIK MUSTAPHA; HAYATI OTTHMAN, 2011). Atribui-se tal fato, ao melhor controle clínico e anatomopatológico das lesões intra-epiteliais escamosas e o do carcinoma epidermóide. (CAMBRUZZI; ZETTLER; PEREIRA, 2005). Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (Brasil), o adenocarcinoma corresponde à segunda neoplasia mais frequente do colo, com prevalência de 12 a 15% (CAMBRUZZI; ZETTLER; PEREIRA, 2005; GONÇALVES *et al.*, 2007).

Os tumores glandulares de cérvix uterina podem ser classificados em seis tipos histológicos: adenocarcinoma sem outras especificações, adenocarcinoma mucinoso, endometrióide, de células claras, seroso e mesonéfricos. O carcinoma mucinoso responde pela maioria dos casos de adenocarcinoma de colo uterino e é subdividido em cinco subtipos: endocervical, intestinal, de células em anel de sinete, de desvio mínimo e viloglandular (GONÇALVES *et al.*, 2007).

Dentre os 30 casos de adenocarcinoma avaliados nesse estudo, houve uma equivalência relativa na frequência de cada subtipo com aqueles citados na literatura. Young *et al.* (2002) esclarecem a incidência de 70 a 80% para o subtipo mucinoso. Outros autores determinam taxas de 5% para o viloglandular bem diferenciado (ALFSEN *et al.*, 2000; YOUNG; CLEMENT, 2002; LAI *et al.*, 2011), 4% para o seroso (ALFSEN *et al.*, 2000; SMITH *et al.*, 2000; YOUNG; CLEMENT, 2002), 4% para o de células claras (ALFSEN *et al.*, 2000; YOUNG; CLEMENT, 2002), 1 a 3% para o de desvio mínimo (ALFSEN *et al.*, 2000; YOUNG; CLEMENT, 2002) e 10 a 15% para o subtipo endometrióide (YOUNG; CLEMENT, 2002). Quanto a esses subtipos, os dados encontrados pelo estudo se equivalem, pois foi determinado (63,3%) para o mucinoso, (3,3%) para o viloglandular, (3,3%) para o seroso, (6,6%) para o de células claras, (3,3%) para o desvio mínimo e (10%) para o subtipo endometrióide.

A associação do adenocarcinoma com HPV tem sido bastante demonstrada, em especial com o tipo 18 (BJERSING *et al.*, 1991; ANDERSSON *et al.*, 2000; BULK *et al.*, 2006). Na maioria dos casos, a superexpressão de p16^{INK4a} reflete a desregulação do ciclo

celular, induzida por infecção do HPV. Milde *et al.* (2001) observou imunorreatividade de p16^{INK4a} em 93% dos tumores HPV positivos, em comparação com apenas 41% dos tumores HPV negativos, demonstrando a estrita relação entre o adenocarcinoma de colo uterino e seu principal fator de risco, o HPV.

De acordo com Yemelyanova *et al.* (2009), adenocarcinomas endocervicais são caracterizados por expressão difusa (90 a 100% das células tumorais) e de moderada a forte para a proteína de supressão tumoral p16. Estudos demonstram uma elevada expressão da proteína p16 em adenocarcinomas in situ (NEGRI *et al.*, 2003; LI *et al.*, 2007). Contudo, não foi encontrado na literatura estudos comparativos de sensibilidade para o p16^{INK4a} em adenocarcinoma in situ e invasivo.

A avaliação do percentual de células positivas para o p16^{INK4a} foi realizada por Negri *et al.* (2011), observando que em 10 (66.7%) de 15 casos de adenocarcinoma invasivo de colo uterino apresentaram coloração positiva em mais de 50% das células. Em 4 (26.6) casos a expressão foi mais focal com menos de 50% de células positivas para expressão do p16. No presente estudo, obtivemos 15 (50%) de 30 casos de adenocarcinoma invasivo de colo uterino apresentando coloração positiva para o p16^{INK4a} em mais de 50% das células. Em 9 (30%) de 30 casos, menos de 50% de células positivas para a expressão do p16^{INK4a} foi evidenciado. Esta discrepância pode ter se dado devido ao menor número de casos de adenocarcinoma invasivo de colo uterino (15 casos de adenocarcinoma invasivo do colo uterino).

De acordo com Anghebem-Oliveira e Merlin (2010), a presença de raros focos de positividade para a coloração imunohistoquímica de p16 em pequena proporção de epitélios escamosos e metaplásicos normais pode ser notada, já que sob condições fisiológicas, como estresse genômico, a p16^{INK4a} é expressa para frear o ciclo celular e, finalmente induzir a apoptose. Tais achados também foram observados nos estudos realizados por Cuizhen Li *et al.* (2007) e Negri *et al.* (2011).

Yonamine *et al.* (2009) ressalta que a frequência de expressão positiva de p16 em adenocarcinoma de colo uterino é de 80%, percentual esse compatível ao (66,7%) demonstrado no presente estudo.

Em nosso estudo, não foi visualizado foco de expressão imunohistoquímica de p16^{INK4a} em nenhum dos 18 casos de pólipo endocervical utilizados como controle negativo, tendo esse achado sido observado por Matsumoto *et al.* (2003) avaliando 10 casos.

Até o presente, em pesquisa no banco de dados do MEDLINE, não se encontrou nenhum estudo fazendo a correlação da intensidade de expressão do p16^{INK4a} e percentual de células positivas com os subtipos de adenocarcinoma invasivo. Aqui foi possível constatar que 8 de 19 casos de adenocarcinoma endocervical apresentaram intensidade forte para a expressão da proteína p16; seguido por 2 de 3 casos de adenocarcinoma do tipo endometrióide, 1 caso de adenocarcinoma tipo endometrióide componente viloglandular, 1 caso de adenocarcinoma endocervical associado a carcinoma epidermóide *in situ* (CIS) e 1 de 2 casos de adenocarcinomas de células claras.

O estudo da performance da proteína de supressão P16^{INK4a}, como marcador de malignidade em adenocarcinomas invasivos do colo uterino, demonstrou alta sensibilidade (66,7%), alta especificidade (100%) e principalmente alto valor preditivo negativo (64,29%) e positivo (100%). O índice de concordância diagnóstica demonstrou ser bom para a p16 ($k=0,6$). Isto pode ser importante, quando se pensa nos casos de difícil diagnóstico. Assim a p16 pode ajudar na confirmação de adenocarcinoma endocervical como acontece com lesões escamosas (GUIMARAES *et al.*, 2005; ELEUTERIO *et al.*, 2007; CAVALCANTE *et al.*, 2012).

Schorge *et al.* (2004) realizaram um estudo da performance do p16 sem, entretanto, estratificar adenocarcinomas *in situ* e invasivo o que embora possa ter aumentado os valores de sensibilidade e especificidade pode ter comprometido os valores preditivos negativo e positivo; Uma vez que, estudos realizados por Negri *et al.* (2003) e Li *et al.* (2007) observaram uma superexpressão da proteína de supressão tumoral p16^{INK4a}, indicando sensibilidade de 100%, em casos de adenocarcinoma *in situ*.

Kong *et al.* (2007) consideraram a imunohistoquímica para p16 como o melhor candidato para conduta inicial de biópsias de diagnóstico indeterminado em virtude da viabilidade, altas sensibilidade e especificidade.

7 CONCLUSÃO

- De todos os casos do controle negativo (18), nenhum apresentou foco de expressão imunohistoquímica para o p16. Contudo, demonstrou-se uma alta representatividade (66,7%) nos casos de adenocarcinoma invasivo de colo uterino quanto a positividade de expressão para o p16. O biomarcador p16^{INK4a} apresentou intensa expressão quando utilizado nos casos de adenocarcinoma invasivo de colo uterino (43,3%), em especial no subtipo de células claras (50%). O único caso de adenocarcinoma de desvio mínimo, apresentado nesse estudo, não demonstrou qualquer expressão para o p16. Em contra partida, o único caso de adenocarcinoma endocervical associado a carcinoma epidermóide *in situ* (CIS) apresentou intensidade forte para a expressão do p16;
- O biomarcador apresentou uma alta especificidade e sensibilidade com uma boa concordância diagnóstica para a identificação de casos de adenocarcinoma invasivo de colo uterino;
- Considerando-se a forte associação do marcador p16, com adenocarcinoma do colo uterino, o seu uso representa uma importante ferramenta para o patologista, diminuindo os diagnósticos de lesões equívocas.

REFERÊNCIAS

- ABU BACKER, F. M.; NIK MUSTAPHA, N. R.; HAYATI OTTHMAN, N. Clinicopathological comparison of adenocarcinoma of the cervix and endometrium using cell cycle markers: P16ink4a, P21waf1, and p27Kip1 on 132 cancers. **Infect. Dis. Obstet. Gynecol.**, 2011.
- ALFSEN, G. C.; THORESEN, S. O.; KRISTENSEN, G. B.; SKOVLUND, E.; ABELER, V. M. Histopathologic subtyping of cervical adenocarcinoma reveals increasing incidence rates of endometrioid tumors in all age groups. **Cancer**, v. 89, p. 1291- 1299, 2000.
- ANDERSSON, S.; RYLANDER, R.; LARSSON, B.; STRAND, C.; SILFVERSVARD, C.; WILANDER, E. The role of human papillomavirus in cervical adenocarcinoma carcinogenesis. **Eur. J. Cancer**, v. 37, p. 246-250, 2001.
- ANGHEBEM-OLIVEIRA, M. I.; MERLIN, J. C. A proteína p16 é um novo marcador para progressão neoplásica no colo uterino? **RBAC**, v. 42, n. 3, p. 181-185, 2010.
- BALDWIN, P.; LASKEY, R.; COLEMAN, N. Translational approaches to improving cervical screening. **Nat. Rev. Cancer**, v. 3, p. 217–226, 2003.
- BANIYASH, M. Chronic inflammation, immunosuppression in cancer: new insights and outlook. **Semin. Cancer Biol.**, v. 16, n. 1, p. 80 – 88, 2006.
- BERRINGTON DE GONZALES, A.; SWEETLAND, S.; GREEN, J. Comparison of risk factors for squamous and adenocarcinoma of the cervix: a meta-analysis. **Br. J. Cancer**, v. 90, n. 9, p. 1787-1791, 2004.
- BJERSING, L.; ROGO, K.; EVANDER, M.; GERDES, U.; STENDAHL, U.; WADELL G. HPV 18 and cervical adenocarcinomas. **Anticancer Res.**, v. 11, n. 1, p. 123-127, 1991.
- BOSCH, F. X.; MANOS, M. M.; MUNOS, N.; SCHERMAN, M.; JANSEN, A. M.; PETO, J.; SCHIFFMAN, M. H.; MORENO, V.; KURMAN, R.; SHAN, K. V. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 87, p. 796-802, 1995.
- BRENNA, S. M. F. Expressão protéica de p53 e c-myc como marcadores no prognóstico do carcinoma de colo uterino. Resumo de Tese. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, v. 22, n. 8, p. 529, 2000.
- BULK, S.; BERKHOF, J.; BULKMANS, N.W. J.; ZIELINSKI, G. D.; ROZENDAAL, L.; VAN KEMENADE, V. J.; SNIJDERS, P. J. F.; MEIJER, C. J. L. M. Preferential risk of HPV16 for squamous cell carcinoma and of HPV18 for adenocarcinoma of the cervix compared to women with normal cytology in The Netherlands. **Br. J. Cancer**, v. 94, n. 1, p. 171–175, 2006.

BURD, E. M. Human papillomavirus and cervical cancer. **Clin. Microbiol. Rev.**, p. 1-17, Jan. 2003.

CAMBRUZZI, E.; ZETTLER, C. G.; PEREIRA, C. A. O. Adenocarcinoma endocervical em porto alegre e região metropolitana: morfologia e prevalência. **Rev. AMRIGS**, Porto Alegre, v. 49, n. 1, p. 27 – 33, jan./mar. 2005.

CAMERON, R. I.; MAXWELL, P.; JENKINS, D.; MCCLUGGAGE, W. G. Immunohistochemical staining with MIB1, bcl-2, and p16 assists in the distinction of cervical glandular intraepithelial neoplasia from tubo-endometrial metaplasia, endometriosis and microglandular hyperplasia. **Histopathology**, v. 41, p. 313-321, 2002.

CHARGUI, R.; DAMAK, T.; KHOMSI, F.; HASSOUNA, J. B.; CHAIEB, W.; HECHICHE, M.; GAMOUDI, A.; BOUSSEN, H.; BENNA, F.; RAHAL, K. Prognostic factors and clinicopathologic characteristics of invasive adenocarcinoma of the uterine cervix. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 194, p. 43-48, 2006.

DOORBAR, J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. **Clin. Sci.**, v. 110, p. 525-541, 2006

ELEUTÉRIO JUNIOR, P. C.; GONÇALVES, A. K. S.; CAVALCANTE, D. I. M.; FERREIRA, F. V. A.; MESQUITA, S. M.; MORAIS, S. S. Prognostic markers of high-grade squamous intraepithelial lesions: the role of p16INK4a and high-risk human papillomavirus. **Acta Obstet. Gynecol. Scand.**, v. 86, n. 1, p. 94-98, 2007.

FRANCO, E. L.; ROHAN, T. E.; Cancer precursors: epidemiology, detection, and prevention. 2001.

GIARRÈ, M.; CALDEIRA, S.; MALANCHI, I.; CICCOLINI, F.; LEA, M.J.; TOMMASINO, M. Induction of pRb degradation by the human papillomavirus Type 16E7 protein is essential to efficiently overcome p16INK4a –imposed G1 cell cycle arrest. **J. Virol.**, v. 75, p. 4705-4712, 2001.

GOLDSTEIN, N. S.; AHMAD, E.; HUSSAIN, M.; HANKIN, R. C.; PEREZ-REYES, N. Endocervical glandular atypia: does a preneoplastic lesion os adenocarcinoma in situ existe? **Am. J. Surg. Pathol.**, v. 110, n. 2, p. 200-209, 1998.

GONÇALVES, M. A. G.; ANSCHAU, F.; MARC, C.; MEURER, L. Adenocarcinoma viloglandular de cérvix uterina. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, v. 29, n. 11, p. 575-579, 2007.

INCA. **Estimativa 2012**: incidência de câncer no Brasil. Disponível em:<<http://www1.inca.gov.br/estimativa/2012/index.asp?ID=5>>. Acesso em: 14 jan. 2012.

International Journal of Gynecology & Obstetrics, v. 105, n. 2, p. 103-194, May 2009.

IOFFE, O. B.; SAGAE, S.; MORITANI, S.; DAHMOUSH, L.; CHEN, T. T.; SILVERBERG, S. G. Proposal of a new scoring scheme for the diagnosis of noninvasive endocervical glandular lesions. **Am. J. Surg. Pathol.**, v. 27, n. 4, p. 452 -460, 2003

KELLY, R. W. Immunosuppressive mechanism in semen: Implications for contraceptions. **Hum. Rep.**, v. 10. n. 7, p. 1686- 1693, 1995.

KIETPEERAKOOL, C.; SRISOMBOON, J.; PROMPITTAYARAT, W.; KANJANAVAHA, P.; PEUWSAI, R.; DHEERAKUL, C. Can adenocarcinoma *in situ* of the uterine cervix be predicted before cervical conization. **Asian Pacific J. Cancer Prev.**, v. 7, p. 522 – 524, 2006.

KONG, C. S.; BALZER, B. L.; TROXELL, M. L.; PATTERSON, B. K.; LON- GACRE, T. A. p16INK4a immunohistochemistry is superior to HPV in situ hybridization for the detection of high-risk HPV in atypical squamous meta- plasia. **Am. J. Surg. Pathol.**, v. 31, p. 33-43, 2007.

KONG, C.S.; BALZER, B.L.; TROXELL, M. L.; PATTERSON, B.K.; LON- GACRE, T.A. p16INK4a immunohistochemistry is superior to HPV in situ hybridization for the detection of high-risk HPV in atypical squamous meta- plasia. **Am. J. Surg. Pathol.**, v. 31, p. 33-43, 2007.

LACEY JUNIOR, J. V.; SWANSON, C. A.; BRINTON, L. A.; ALTEKRUSE, S. F.; BARNES, W. A.; GRAVITT, P. E.; GREENBERG, M. D.; HADJIMICHAEL, O. C.; MCGOWAN, L.; MORTEL, R.; SCHWARTZ, P. E.; KURMAN, R. J.; HILDESHEIM, A. Obesity as potential risk factor for adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the uterine cervix. **Cancer**, v. 98, n. 4, p. 814 – 821, 2003.

LAI, J. C.; CHEN, J.; CHEN, Y.; HSU, C.; WANG, T.; YANG, Y.; SU, T.; TSAI, T.; WANG, K. Villoglandular Adenocarcinoma of the Uterine Cervix: an analysis of 12 clinical cases. **Int. J. Gerontol.**, v. 5, p. 49-52, 2011.

LI, C.; ROCK, K. L.; WODA, B. A.; JIANG, Z.; FRAIRE, A. E. DRESSER, K. IMP3 is a novel biomarker for adenocarcinoma in situ of the uterine cervix: an immunohistochemical study in comparison with p16INK4a expression. **Mod. Pathol.**, v. 20, n. 2, p. 242-247, 2007.

LIANG, J.; MITTAL, K. R.; WEI, J. J.; YEE, H.; CHIRIBOGA, L.; SHUKLA, P. Utility of p16INK4a, CEA, ki-67, P53 and ER/PR in the differential diagnosis of benign, premalignant, and malignant glandular lesions of the uterine cervix and their relationship with Silverberg scoring system for endocervical glandular lesions. **Int. J. Gynecol. Pathol.**, v. 26, p. 71-75, 2007.

MADELEINE, M. M.; DALING, J. R.; SCHWARTZ, S. M.; SHERA, K.; MCKNIGHT, B.; CARTER, J. J.; WIPF, G. C.; CRITCHLOW, C. W.; MCDUGALL, J. K.; PORTER, P.; GALLOWAY, D. A. Human papillomavirus and long-term oral contraceptive use increase the risk of adenocarcinoma in situ of the cervix. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v. 10, p. 171 – 177, 2001.

MANSOUR, M.; TOUKA, M.; HASAN, U.; BELLOPEDE, A.; SMET, A.; ACCARDI, R.; GABET, A.-S.; SYLLA, B.S.; TOMMASINO, M. E7 properties of mucosal human papillomavirus types 26,53 and 66 correlate with their intermediate risk for cervical development. **Virology**, v. 367, n. 1, p.1-9, 2007

MCCLUGGAGE, W. G. Immunohistochemical and functional biomarkers of value in female genital tract lesions. **Int. J. Gynecol. Pathol.**, v. 25, n. 2, p. 101-120, 2006.

- MULLER, S.; FLORES-STAINO, C.; SKYLDBERG, B.; HELLSTRÖM, A. C.; JOHANSSON, B.; HAGMAR, B.; WALLIN, K. L.; ANDERSSON, S. Expression of p16INK4a and MIB -1 in relation to histopathology and HPV types in cervical adenocarcinoma. **Int. J. Oncol.**, v. 32, n. 2, p. 333-340, 2008.
- NEGRI, G.; BELLISANO, G.; CARICO, E.; FAA, G.; KASAL, A.; ANTONIAZZI, S.; EGARTER-VIGL, E.; PICCIN, A.; DALLA PALMA, P.; VITTADELLO, F. Usefulness of p16ink4a, ProEX C, and adenocarcinoma of the cervix uteri. **Int. J. Gynecol. Pathol.**, v. 30, p. 407 – 413, 2011.
- NEGRI, G.; EGARTER-VIGL, E.; KASAL, A.; ROMANO, F.; HAITEL, A.; MIAN, C. p16INK4a is a useful marker for the diagnosis of adenocarcinoma of the cervix uteri and its precursors: an immunohistochemical study with immuno- cytochemical correlations. **Am. J. Surg. Pathol.**, v. 27, n. 2, p. 187-193, 2003.
- PARKIN, D. M.; BRAY, F.; FERLAY, J.; PISANY, P. Global cancer statistics, 2002. **CA Cancer J. Clin.**, v. 55, n. 2, p. 74-108, 2005.
- PETERS, R. K.; CHÃO, A.; MACK, T. M.; THOMAS, D.; BERNSTEIN, L.; HENDERSON, B. E. Increased frequency of adenocarcinoma of the uterine cervix in young women in Los Angeles County. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 76, p. 423–428, 1986.
- PINTO, P.; DEGEN, M.; VILLA, L. L.; CIBAS, E. S. Immunomarkers in gynecologic cytology: The search for the ideal ‘Biomolecular papanicolaou test’. **Acta Cytological**, v. 56, p. 109 – 121, 2012.
- ROCCO, J. W.; SIDRANSKY, D. (MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression. **Exp. Cell Res.**, v. 264, n. 1, p. 42-55, 2001.
- SCHIFFMAN, M. H.; BAUER, H. M.; HOOVER, R. N.; GLASS, A. G.; CADELL, D. M.; RUSH, B. B. *et al.* Epidemiology evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 85, n. 12, p. 958-964, 1993.
- SCHORGE, J. O.; LEA, J. S.; ELIAS, K. J.; RAJANBABU, R.; COLEMAN, R. L.; MILLER, D. S.; ASHFAQ, R. P16 as a molecular biomarker of cervical adenocarcinoma. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v.190, p. 668 – 773, 2004.
- SCHWARTZ, S. M.; WEISS, N. S. Increased incidence of adenocarcinoma of the cervix in young women in the United States. **Am. J. Epidemiol.**, v. 124, p. 1045 – 1047, 1986.
- SHARKEY, D. J.; MACPHERSON, A. M.; TREMELLEN, K. P.; ROBERTSON, S. A. Seminal plasma differentially regulates inflammatory cytokine gene expression in human cervical and vaginal epithelial cells. **Mol. Hum. Rep.**, v. 13, n. 7, p. 491 – 501, 2007.
- SILVERBERG, S. G.; IOFFE, O. B. Pathology of cervical cancer. **Cancer J.**, p. 335-347, 2003.
- SMITH, L. M.; BURKE, M. F.; QUALLS, C. R.; KEY, C. R. The rising incidence of

adenocarcinoma relative to squamous cell carcinoma of the uterine cervix in the United States – a 24 - year population-based study. **Gynecol. Oncol.**, v. 78, n. 2, p. 97-105, 2000.

SYRJÄNEN, K. J.; SYRJÄNEN, S. M. HPV and Cervical Adenocarcinoma. In: _____. **Papillomavirus infections in human pathology**. [S.l.]: John Wiley & Sons, Ltd., 1999. p.189-206.

TAVASSOLI, F. A.; DEVILEE, P. (Ed.). **Tumours of the breast and female genital organs**. Lyon: IARCPress, 2003.

WANG, J.-L.; ZHENG, B.-Y.; LI, X.-D.; ANGSTRÖM, T.; LINDSTRÖM, M.S.; WALLIN, K.-L. Predictive significance of the alterations of p16INK4A, p14ARF, p53, and proliferating cell nuclear antigen expression in the progression of cervical cancer. **Clin. Cancer Res.**, v. 10, p. 2407-2414, 2004.

WENTZENSEN, N.; BERGERON, C.; CAS, F.; VINOKUROVA, S.; VON KNEBEL DOEBERITZ, M. Triage of women with ASCUS and LSIL cytology: use of qualitative assessment of p16INK4a positive cells to identify patients with high-grade cervical intraepithelial neoplasia. **Cancer**, v. 111, n. 1, p. 58-66, 2007.

WHEELER, D. T.; KURMAN, R. J. The relationship of glands to thick-wall blood vessels as a marker of invasion in endocervical adenocarcinoma. **Int. J. Gynecol. Pathol.**, v. 24, n. 2, p. 125-130, 2005.

WRIGHT, T. C.; KURMAN, R. J.; FERENCZY, A. Precancerous lesions of the cervix. In: KURMAN, R. J. (Ed.). **Blaustein's: pathology of the female genital tract**. 5th ed. New York: Springer Verlag, 2002. p. 325-385.

YONAMINE, P. T. K.; JUNQUEIRA, M. S. G.; RODRIGUES, J. O.; PEREIRA, S. F.; PANDOSSIO, T.; RODRIGUES, D. A.; PEDREGOSA, J. F.; MUNHOZ, N. G.; CORDEIRO, J. A.; CURY, P. M.; BONILHA, J. L. Associação entre a expressão de p16 e neoplasia intra-epitelial cervical. **Arq. Ciênc. Saúde**, v. 16, n. 4, p. 161-165, 2009.

YOUNG, R. H.; CLEMENT, P. B. Endocervical adenocarcinoma and its variants: their morphology and differential diagnosis. **Histopathology**, v. 41, p. 185-175, 2000.

ZALOUDEK, C. **Adenocarcinoma of the cervix**. Disponível em:<labmed.ucsf.edu/uploads/237/114_ci_2010_adenocarcinoma_of_the_cervix.pdf>. Acesso em: 2 Mar. 2012.

ZUR HAUSEN, H. Papillomavirus and cancer: from basic studies to clinical application. **Nat. Rev. Cancer**, v. 2, p. 342 – 350, 2002.