

**AVALIAÇÃO DO CONTROLE LOCAL DOS
CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS
AVANÇADOS DO COLO DO ÚTERO
SUBMETIDO À RADIOTERAPIA ATRAVÉS DA
ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA DA COX-2,
EGFR, CD44v6, HIF-1 E HIF2**

ELZA MIEKO FUKAZAWA

**Tese apresentada à Fundação Antônio Prudente
para obtenção do título de Doutor em Ciências**

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Fernando Augusto Soares

Co-Orientador: Dr. Paulo Eduardo Ribeiro Novaes

São Paulo

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Fukazawa, Elza Mieko

Avaliação do controle local dos carcinomas de células escamosas avançados do colo do útero submetidos à radioterapia através da análise imunoistoquímica da COX-2, EGFR, CD44v6, HIF-1 e HIF-2 / Elza Mieko Fukazawa, 2012.

90p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Fernando Augusto Soares.

Descritores: 1. NEOPLASIAS DO COLO DO ÚTERO. 2. CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS. 3. CÉLULAS-TRONCO. 4. RADIOTERAPIA. 5. IMUNOISTOQUÍMICA. 6. RECEPTOR DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO. 7. CICLOOXIGENASE 8. ANTÍGENOS CD44. 9. FATOR 1 INDUZÍVEL POR HIPÓXIA.

DEDICATORIA

É com profundo carinho que dedico este trabalho aos meus pais Masaiuki Fukazawa e Eiko Fukazawa

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que colaboraram com a realização deste, em especial aos:

Prof. Dr. Fernando Augusto Soares a quem devo a orientação deste trabalho e confiança depositada na realização deste trabalho.

Severino da Silva Ferreira técnico do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo pelo constante apoio.

Suely Nonogaki pesquisadora científica do Laboratório de Imunoistoquímica da divisão de Anatomia Patológica do Instituto Adolpho Lutz, pela dedicação, esmero e eficiência na execução das reações imunoistoquímicas.

Inês Nishimoto pela amizade, paciência e dedicação na realização da análise estatística.

Ana Maria Kuninari pela amizade e constante estímulo

Suely Francisco pelo auxílio na apresentação do texto e revisão da referência bibliográfica

Dr. Levon Badiglian Filho pela amizade e revisão do texto

RESUMO

Fukazawa EM. **Avaliação do controle local dos carcinomas de células escamosas avançados do colo do útero submetidos à radioterapia através da análise imunoistoquímica da COX-2, EGFR, CD44v6, HIF-1 E HIF-2.** São Paulo; 2012. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

O câncer do colo do útero é diagnosticado na maioria das vezes em estádios avançados do tumor sendo a radioterapia a principal ferramenta terapêutica para estes casos. A principal causa de morte nos carcinomas avançados do colo do útero é a doença não controlada na pelve. Não há um marcador da resposta ao tratamento no câncer do colo do útero avançado, portanto, a descoberta de marcadores moleculares que auxiliem prever que pacientes são de risco para falha terapêutica permitiria individualizar e adequar estratégias de tratamento essenciais para obter o controle local do tumor. O objetivo deste estudo foi avaliar o valor preditivo de resposta à radioterapia da expressão imunoistoquímica de COX-2, EGFR, CD44v6, HIF-1 e HIF-2 em 116 casos de carcinomas epidermóides avançados do colo uterino (estádios IIB, IIIA, IIB e IVA) e avaliar da mesma maneira a imunoexpressão diferencial nas células neoplásicas do tumor primário, tumor recidivado, tumor residual pós-radioterapia e tumor metastático. Nossos resultados indicam valor preditivo de resposta à radioterapia apenas da expressão de HIF-2, que foi mais expresso em casos sem falha falhas terapêuticas nas pacientes tratadas por radioterapia exclusiva. Houve aumento apenas do EGFR e CD44v6 das amostras pós-radioterapia com doença residual quando comparadas às amostras iniciais; este achado pode indicar que nesses casos, esses dois marcadores estejam relacionados de alguma forma à resistência do tumor à radioterapia.

SUMMARY

Fukazawa EM. **[Evaluation of local control of advanced squamous cell carcinoma of the cervix undergoing radiation therapy by immunohistochemical analysis of COX-2, EGFR, CD44v6, HIF-1 and HIF-2]**. São Paulo; 2012. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Cancer of the cervix is most often diagnosed in advanced stages of tumor radiotherapy is the main therapeutic tool for these cases. The main cause of death in advanced carcinomas of the cervix is uncontrolled disease in the pelvis. There is a marker of treatment response in cervical cancer advanced, so the discovery of molecular markers that help predict which patients are at risk for treatment failure would individualize and tailor treatment strategies essential to obtain local tumor control. The aim of this study was to evaluate the predictive value of response to radiotherapy of immunohistochemical expression of COX-2, EGFR, CD44v6, HIF-1 and HIF-2 in 116 advanced squamous cell carcinoma of the cervix (stage IIB, IIIA, IIB and VAT) and evaluate the same way the differential immunostaining in tumor cells from the primary tumor, tumor recurrence, residual tumor post-radiotherapy and metastatic tumor. Our results indicate predictive of response to radiotherapy only the expression of HIF-2, which was expressed in most cases without failure treatment failure in patients treated with radiotherapy alone. There was an increase of only EGFR and CD44v6 samples after radiotherapy with residual disease compared to initial samples, this finding may indicate that in these cases, these two markers are related somehow to the tumor resistance to radiotherapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Taxas de mortalidade das 5 localizações primárias mais frequentes em 2008.....	1
Figura 2	A via de sinalização do EGFR.....	10
Figura 3	O gene CD44 e estrutura proteica.....	23
Figura 4	Regulação das vias de sinalização pela interação do ácido hialurônico com o CD44.....	25
Figura 5	Delineamento do estudo.....	31
Figura 6	Curva de Sobrevida Global Falha x Sem falha.....	46
Figura 7	Curva de Sobrevida Livre de Doença Falha x Sem falha.....	46
Figura 8	Curva de Sobrevida Global Resposta Completa x Parcial.....	47
Figura 9	Curva de Sobrevida Livre de Doença Resposta Completa x Parcial	47
Figura 10	Sobrevida Livre de Doença em Pacientes com Histerectomia Tempo de Radioterapia <45 dias x >45 dias.....	48
Figura 11	Valores máximos, mínimos e mediana da intensidade de expressão em pixel do EGFR, CD44v6 e COX-2.....	58
Figura 12	Valores máximos, mínimos e mediana da intensidade de expressão em pixel da HIF-2 e HIF-1.....	59

LISTA DE TABELAS

Quadro 1	Anticorpos utilizados.....	34
Tabela 1	Distribuição da casuística de acordo com variáveis demográficas e de estilo de vida.....	42
Tabela 2	Distribuição da casuística de acordo com variáveis clínicas e de tratamento.....	43
Tabela 3	Distribuição da casuística de acordo com informações clínicas e da radioterapia.....	49
Tabela 4	Probabilidade de Sobrevida Global 5 anos e 10 anos.....	50
Tabela 5	Probabilidade de Sobrevida Livre de Doença 5 anos e 10 anos.....	50
Tabela 6	Distribuição das variáveis demográficas e de estilo de vida de acordo com ocorrência de falhas dos casos Sem histerectomia.....	52
Tabela 7	Distribuição das variáveis demográficas e de estilo de vida de acordo com resposta dos casos com histerectomia.....	53
Tabela 8	Distribuição dos escores dos marcadores moleculares.....	56
Tabela 9	Medidas dos escores dos marcadores moleculares.....	57
Tabela 10	Medidas dos escores dos marcadores moleculares pré RXT de acordo com ocorrência de falhas dos casos sem histerectomia.....	63
Tabela 11	Medidas dos escores dos marcadores moleculares de acordo com resposta RXT e com histerectomia.....	64

Tabela 12	Medida dos escores dos marcadores moleculares de acordo com resposta RXT parcial e com histerectomia.....	65
------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AKT	<i>Protein Kinase B (Oncogene in transforming retrovirus AKT8)</i>
ATM	<i>Ataxia telandictasia mutated</i>
ALDH	<i>Aldehyde dehydrogenase protein</i>
cMet	<i>Met Tyrosine kinase</i>
CTT	Célula-tronco tumoral
CD 34	<i>Cluster of differentiation 34</i>
CD 38	<i>Cyclic ADP ribose hydrolase</i>
CD 44	<i>Lymphocyte homing adhesion receptor</i>
CD 133	<i>Prominin-like protein 1</i>
cGy	centigray
COX-2	<i>Cyclooxygenase-2</i>
CK 17	<i>Cytokeratin 17</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DNA-PK	DNA-dependent protein kinase
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EpCAM	<i>Epithelial cell adhesion molecule</i>
ERM	<i>Ezrin/ Radixin/ Moesin</i>
FIGO	Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
Gab-1	<i>GABA receptor subunit Family member</i>
GOG	<i>Gynecology Oncology Group</i>
Gy	Gray
Grb2	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
HIF-1	<i>Hypoxia-inducible factor 1</i>
HIF-2	<i>Hypoxia-inducible factor 2</i>
HDR	<i>High dose rate</i>
HPV	<i>Human papillomavirus</i>
HTA	Histerectomia total abdominal
H&E	<i>Hematoxylin and Eosin</i>
INCA	Instituto Nacional de Câncer

LDR	<i>Low dose rate</i>
MAPK	<i>Mitogen activated Protein Kinase</i>
NIC	Neoplastic intraepithelial cervical
O2	Oxigênio
OCT-4	<i>Octamer-binding transcription factor 4</i>
p53	proteína 53 , gene supressor tumoral.
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PTEN	<i>Phosphate and Tensin Homolog</i>
Piwil 2	<i>P element induced wimpy testis</i>
Rac 1	<i>ras related C3 botulinum substrate 1</i>
RAS	<i>Rat Sarcoma; GTPase que funciona, com um oncogene</i>
Rb	Proteína retinoblastoma
RC	Resposta completa
RP	Resposta Parcial
RhoA	ras homolog Family member A
RXT	Radioterapia
RX	Raio X
Ser	Serina
SG	Sobrevida Global
SLD	Sobrevida Livre de Doença
Src	<i>Sarcoma viral oncogene homolog</i>
Stat 3	<i>Signal transducer activator of transcription protein</i>
Sox-2	<i>SRY-box containing gene 2</i>
TGFβ1	<i>Transforming growth factor beta 1</i>
TMA	<i>Tissue Micro Array (Micro arranjo de tecidos)</i>

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	EGFR e Radioresistência	9
1.2	COX-2 e Radioresistência.....	11
1.3	O HPV e Resposta a Radioterapia	12
1.4	Hipóxia (HIF-1 e HIF-2) e Radioterapia.....	14
1.5	Marcadores Moleculares de Radioresistência e Terapia Alvo.....	15
1.6	Célula-Tronco Tumoral e Radioresistência	17
1.7	CD44	21
1.8	Hipóxia e Manutenção da Célula-Tronco Tumoral	27
2	OBJETIVOS	29
3	CASUÍSTICA E MÉTODOS	30
3.1	Casuística	30
3.2	Crítérios de Inclusão	32
3.3	Crítérios de Exclusão	33
3.4	Métodos.....	33
3.4.1	Leitura das Lâminas	35
3.4.2	Análise Estatística	37
4	RESULTADOS	40
4.1	População do Estudo.....	40
4.2	Tratamento	44
4.3	Expressão das proteínas COX-2, EGFR, CD44v6, HIF-1 e HIF-2	55
5	DISCUSSÃO	66
6	CONCLUSÃO	77

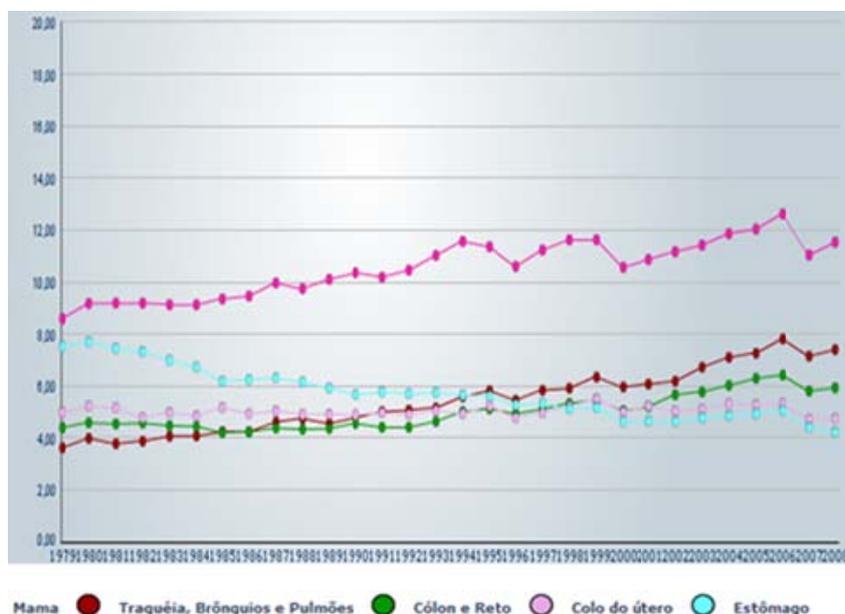
ANEXOS

- Anexo 1** Estadiamento do Câncer do colo do útero
- Anexo 2** Ficha de Coleta de Dados
- Anexo 3** Expressão citoplasmática da COX-2
- Anexo 4** Expressão do EGDR na Membrana
- Anexo 5** Expressão da CD44v6 na Membrana
- Anexo 6** Expressão Nuclear da HIF-2
- Anexo 7** Expressão Nuclear da HIF-1
- Anexo 8** Expressão da COX-2, EGFR, CD44v6, HIF-2 e HIF-1 na metástase cerebral
- Anexo 9** Expressão da COX-02, EGFR, CD44v6, HIF-2 e HIF-1 em metástase de pele do antebraço
- Anexo 10** Expressão da COX-2, EGFR, CD44v6, HIF-2 e HIF-1 na metástase para linfonodo supraclavicular
- Anexo 11** Expressão da COX-2, EGFR, CD44v6, HIF-2 e HIF-1 na metástase para peritônio
- Anexo 12** Expressão negativa-fraca da COX-2, CD44v6, HIF-2 e HIF-1 e controle negativo do EGFR

1 INTRODUÇÃO

O câncer do colo do útero é a terceira neoplasia mais comum e a quarta causa de óbito entre mulheres no mundo sendo responsável por 9 % (529.800) dos casos novos de câncer e 8% (275.100) do total de mortes entre mulheres. Mais de 85 % destes casos novos e mortes ocorrem nos países em desenvolvimento devido à falta de um programa de rastreamento adequado (JEMAL et al. 2011).

Para o Brasil dados do Instituto Nacional de Câncer-INCA no ano de 2012, esperam-se 17.540 casos novos de câncer do colo do útero, com um risco estimado de 17 casos a cada 100 mil mulheres (Ministério da Saúde 2011). As taxas de mortalidade são elevadas e de acordo com os dados do INCA é a quarta causa de morte de mulheres por câncer como demonstrado na figura abaixo.



Fonte: Ministério da Saúde (2011)

Figura 1 – Taxas de mortalidade das 5 localizações mais frequentes em 2008. Ajustados por idade, pela população mundial, por 100.000 Mulheres, Brasil, entre 1979 e 2008.

A maioria das mortes por câncer do colo do útero ocorre em mulheres com doença localmente avançada estágio II a IV da Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO) (Anexo 1) quando as lesões não são passíveis de cura com cirurgia (MONK et al. 2007). As taxas de recorrência em quatro anos no campo irradiado em mulheres com estágio IIB e IIIB de doença são de 20% e 47 % respectivamente, sugerindo que falhas no controle local e a distancia contribuem para a mortalidade em mulheres com doença avançada (RANDALL et al. 2010).

A radioterapia é a modalidade de tratamento padrão para a maioria das pacientes portadoras de câncer do colo do útero avançado e o tratamento definitivo com radioterapia consiste na combinação da irradiação externa da pelve (que visa à esterilização dos paramétrios e linfonodos pélvicos), com a braquiterapia (esterilização da doença central em colo e vagina). A radioterapia pélvica possibilita a redução do tumor no colo melhorando as condições locais para a braquiterapia, promove a diminuição do sangramento e da dor pélvica permitindo a recuperação do estado geral da paciente e atua de maneira profilática em áreas de envolvimento subclínico potencial (NOVAES et al. 2008).

A braquiterapia constitui a mais importante etapa do tratamento do carcinoma cervical, pois permite a liberação de dose tumoricida ao colo e tecidos para-cervicais. Muitos sistemas e vários aplicadores podem ser utilizados para inserção intracavitária, porém os mais utilizados são os de Fletcher-Suit. Braquiterapia pode ser realizada em regime de baixa taxa de dose (LDR- *low dose rate*) usando tubos de Césio 137 ou através da alta taxa de dose (HDR-*high dose rate*) com micro fonte de Irídio 192 operada por controle remoto e comandada por

computador. A baixa taxa de dose utiliza isótopos que liberam menos de 2Gy/hora, enquanto a alta taxa de dose libera mais de 2Gy/minuto. As vantagens operacionais e de proteção radiológica tem feito com que os tratamentos de alta taxa de dose sejam preferíveis aos de baixa taxa de dose. Modelos radiobiológicos, estudos retrospectivos e ensaios randomizados mostram equivalente efetividade em termos de controle local e complicações tardias entre os dois tipos de braquiterapia (NOVAES et al. 2008).

Diferentes sistemas, escolas e pontos de prescrição de dose podem ser adotados, porém, no Brasil generalizou-se a Escola de Manchester que utiliza como parâmetros para a prescrição da dose os clássicos pontos A e B. O ponto A é definido como situado a 2 cm para acima e 2 cm para o lado do orifício externo do colo, acompanhando o eixo uterino. O ponto B está situado a 3 cm para o lado do ponto A. Corresponde a inserção do paramétrio na parede pélvica (NOVAES et al. 2008).

A capacidade da radioterapia de curar o carcinoma de colo localmente avançado é limitada pelo volume tumoral, pois a dose requerida excede os limites de tolerabilidade dos tecidos normais vizinhos. A principal causa de morte é a doença não controlada na pelve. Muita tentativa tem sido feita para melhorar os resultados da radioterapia (NOVAES 2008).

Estratégias envolvendo o uso concomitante de quimioterapia e radiação passou a ser utilizada, pois teoricamente a quimioterapia pode agir sinergicamente com a radioterapia inibindo o reparo do dano radiação-induzida, promovendo a sincronização celular em uma fase radiosensível do ciclo, iniciando a proliferação

de células do compartimento tumoral não proliferativo e reduzindo a fração de células hipóxicas, resistentes à radiação (NOVAES et al. 2008).

Cinco ensaios randomizados prospectivos demonstraram melhor sobrevida livre de doença e sobrevida global quando a cisplatina foi adicionada a radioterapia para doença avançada (MONK et al. 2007). Estes resultados foram confirmados pela revisão sistemática e meta análise de 18 ensaios randomizados publicado em 2008 (Chemoradiotherapy for Cervical Cancer Meta-Analysis Collaboration). Apesar destes resultados promissores estes ensaios clínicos relataram 16-15% de falha terapêutica para todos os estádios da doença (RANDALL et al. 2010). TAN e ZAHRA (2008) observaram a presença de doença persistente em 10,6% dos casos após radio quimioterapia e recidiva em 36,4% no campo pélvico após seis meses de tratamento.

Os fatores clínicos como a idade, a raça, o tipo histológico, o estágio do tumor, o tamanho e a extensão do tumor para a parede pélvica e vagina, a presença de linfonodos pélvicos e para-aórticos e a anemia foram intensamente avaliados nos tumores de colo do útero avançados, como fatores relacionados à recidiva local, regional e à distância. Estes fatores são geralmente determinados através de estudos retrospectivos de uma série de pacientes tratadas e geralmente falham em 30% das vezes em predizer a resposta terapêutica (WINTER et al. 2004; MONK et al. 2007; YEUNG et al. 2007; TAN e ZAHRA 2008; KIM et al. 2009).

O clássico sistema de estadiamento da FIGO para o câncer de colo do útero (Anexo 1), baseado nos parâmetros clínicos e exames complementares (cistoscopia, retossigmoidoscopia, RX tórax e urografia excretora) é amplamente

criticado, pois falha em determinar a real extensão do tumor localmente e regionalmente em 24% dos estádios iniciais e em 67% dos estádios avançados. Os principais sítios de falha são as metástases ocultas em linfonodos pélvicos e para-aórticos. Portanto o estadiamento não cirúrgico no câncer do colo do útero resulta em altas taxas de classificação incorreta, especialmente o subestadiamento (HACKER e FRIEDLANDER 2010).

Acredita-se que a resistência biológica intrínseca à radioterapia contribua pelo menos em parte com a recorrência e morte nos tumores localmente avançados do colo do útero, da mama, cabeça e pescoço e tumores do reto para os quais a irradiação é a modalidade de tratamento primário. A hipóxia, a proliferação celular, os mecanismos de controle do ciclo celular e a apoptose foram propostos como mecanismos associados com a resistência biológica à radiação ionizante, no entanto, estas associações têm de ser claramente elucidadas (RANDALL et al. 2010; NAKANO et al. 2010).

O critério de avaliação da resposta terapêutica em tumores sólidos é amplamente aceito e no câncer do colo do útero são frequentemente avaliados pelo exame pélvico ginecológico, citologia oncótica e/ou tomografia começando 3 meses após a compleição da terapia. Esta estratégia pode não reconhecer a verdadeira resposta histopatológica para o tratamento devido à subjetividade na avaliação clínica da resposta (KUNOS et al. 2010).

Não há um marcador seguro para monitorizar a resposta ao tratamento no câncer do colo do útero avançado. Portanto a identificação de fatores moleculares que auxiliem a predizer que pacientes são de risco para falha terapêutica nos

carcinomas do colo do útero localmente avançado permitirá individualizar e adequar estratégias de tratamento essenciais para obter o controle local do tumor.

O conhecimento dos fenômenos ligados à interação da radiação com a unidade celular propiciou melhor compreensão das bases radiobiológicas da resposta tumoral à radiação. O efeito biológico da radiação é influenciado pela dose (dose total, dose diária, taxa de dose), pelo número de frações, volume irradiado e pelo tempo de tratamento. Os fatores que controlam a influência da dose, do tempo e do fracionamento da radioterapia na resposta celular à radiação ionizante são: Reparo, Reoxigenação, Redistribuição e Repopulação. Estes processos também são conhecidos como os 4 Rs da radiobiologia (KIM et al. 2005; BRISTOW e HILL 2005; HARRINGTON et al. 2007; EIFEL 2010).

Quando a célula é atingida pela radiação ionizante, ela pode sofrer morte celular ou dano subletal onde o efeito não foi suficiente para levar à morte da célula e há possibilidade de recuperação deste dano. O esquema de tratamento da radioterapia externa geralmente é administrado de forma fracionada e este esquema de administração permite uma recuperação maior dos tecidos normais, quando comparados com o tumor, possibilitando administração de doses maiores, com maior efeito biológico diferencial (BRISTOW e HILL 2005; EIFEL 2010).

Ao fracionar o tratamento conseguimos que as células normais que sofreram dano subletal consigam se recuperar do mesmo entre uma fração e outra de radioterapia. Esta capacidade de recuperação do dano é maior entre as células normais. Desta maneira, quando for realizada a segunda fração, a célula normal que sofreu o dano estará recuperada e o mesmo não acontecerá com a célula tumoral. Para esta, a segunda fração de radioterapia irá contribuir para o acúmulo

de danos até levá-la a morte. A causa mais frequente de morte celular induzida pela radiação ionizante é devido à incapacidade da célula em reparar as lesões na cadeia do DNA (BRISTOW e HILL 2005; EIFEL 2010).

Para que o dano causado pelo radical livre ao DNA da célula se consolide é muito importante a presença do oxigênio. Assim os tumores bem oxigenados respondem melhor à radioterapia do que os poucos oxigenados. O tumor possui áreas bem oxigenadas, geralmente localizadas na periferia do tumor e áreas com baixo índice de oxigenação que são mais centrais. Quando o tumor recebe o efeito da radioterapia, as células periféricas morrem mais do que as centrais. O intervalo entre uma fração e outra da radioterapia permite que o oxigênio que era utilizado por esta célula que morreu seja desviado para as células com baixa concentração de oxigênio. Portanto, numa fração seguinte do tratamento teremos maior número de células oxigenadas, conseqüentemente mais sensíveis à radiação (BRISTOW e HILL 2005; EIFEL 2010).

Existe um equilíbrio numérico entre as células nas diferentes fases do ciclo celular. Estas fases diferem em relação a sensibilidade à radiação. As células geralmente são mais sensíveis à radiação na fase G2 e durante a mitose e mais resistente na fase S e G1. Com uma fração de radioterapia, as células da fase mais sensível morrem mais do que as das outras fases. As células remanescentes na fase S então começam a progredir para uma fase mais sensível do ciclo celular durante o intervalo antes da próxima fração de radioterapia. Na próxima fração haverá novamente um número maior de células na fase mais sensível do ciclo celular (BRISTOW e HILL 2005; EIFEL 2010).

A proliferação de células normais e tumorais sobreviventes a uma fração de radioterapia pode aumentar o número de células durante o curso do tratamento e reduzir a resposta global à radiação. O efeito da proliferação celular durante o tratamento conhecido como repopulação é a principal causa de falha terapêutica. Para os tumores malignos de origem epitelial, a probabilidade de o tumor crescer fora de controle aumenta cerca de 1- 1,5% por cada dia em que o tratamento é prolongado além de um período de tempo de aproximadamente 4- 6 semanas. Dose de irradiação adicional para superar o processo de repopulação está em torno de 0,5-1,0 Gy por dia de atraso no tratamento. O efeito prejudicial da extensão total do tempo de tratamento para o controle local do tumor está estabelecido para muitas neoplasias malignas incluindo o câncer do colo do útero (PEREZ et al. 1995; FERRIGNO et al. 2001; KIM et al. 2005; BRISTOW e HILL 2005; HARRINGTON et al. 2007; EIFEL 2010).

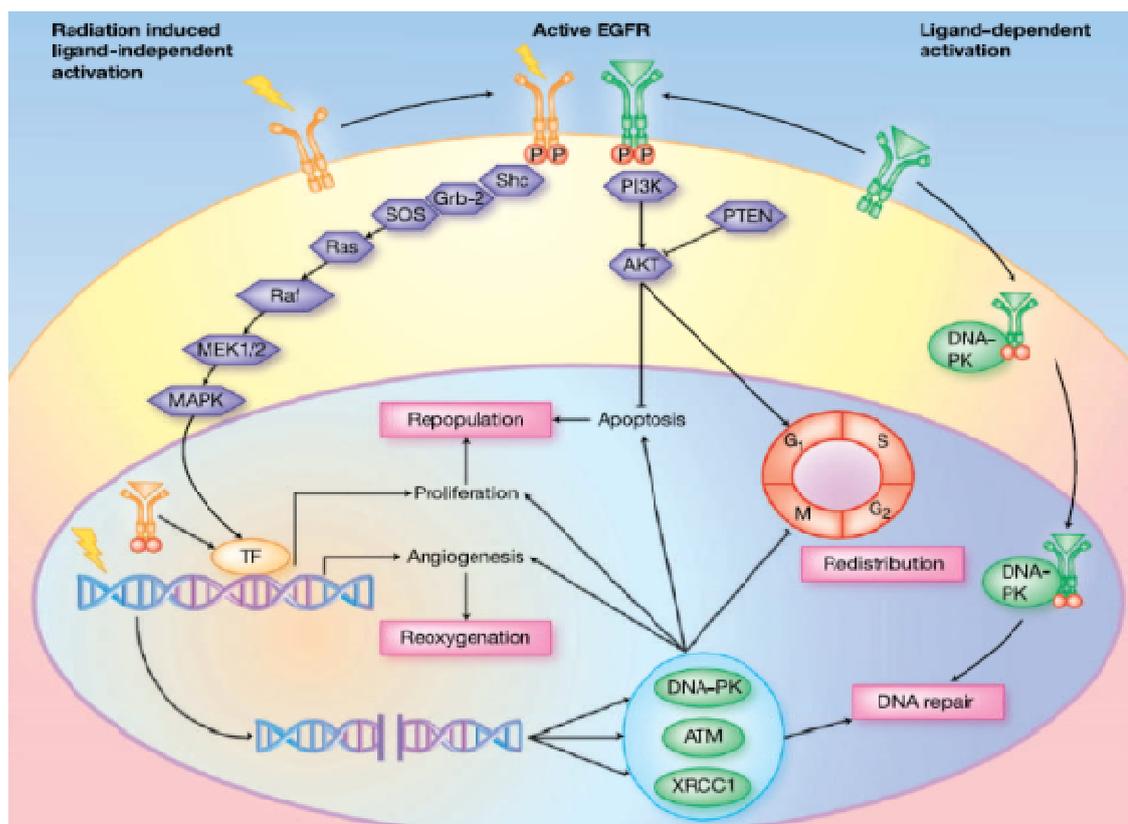
Os 4 Rs da radiobiologia descritos acima permitiram uma melhor maneira de compreender o sucesso ou a falha da radioterapia. Cada um dos Rs pode ser visto como uma faca de dois gumes, pois, cada R pode possibilitar tanto o aumento como a diminuição do efeito terapêutico. Portanto a ativação da rede de sinalização que estimule a proliferação de células tumorais ou que influencie os mecanismos de reparo do DNA, de controle do ciclo celular e apoptose pode afetar o processo de redistribuição, de reoxigenação, de repopulação e de reparo durante o curso da radioterapia, permitindo que as células tumorais sobrevivam à radiação formando clones celulares resistentes à radioterapia (BRISTOW e HILL 2005; HARRINGTON et al. 2007).

A ativação das vias de sinalização celular em prol da sobrevivência e evasão da apoptose resulta do próprio processo de múltiplas etapas da carcinogênese tumoral. Cada etapa deste processo representa uma oportunidade para intervenção terapêutica e, portanto pode ser relevante na prática da radiação oncológica. Por outro lado, a radiação ionizante pode por ela mesma ativar as vias de sinalização celular através de sua ação no núcleo da célula e na membrana plasmática (COLEMAN 1996; HARRINGTON et al. 2007; SZUMIEL 2007).

1.1 EGFR E RADIOTERAPIA

Quando as células são expostas à radiação ionizante, o dano ao DNA e a produção de radicais livres através da radiólise (ionização da água citoplasmática) induz a ativação ou repressão de proteínas que facilitam o reparo do DNA, e em nível de membrana plasmática ocorre à ativação do receptor de EGFR (DEBUCQUOY et al. 2010).

Estudos recentes demonstraram que a ativação da via de sinalização do EGFR está envolvida principalmente com reparo e repopulação das células tumorais e a inibição do EGFR poderia aumentar a resposta tumoral à radioterapia. Além deste mecanismo foi demonstrado que as células cancerosas que sobrevivem à irradiação apresentam aumento da regulação do EGFR, e assim maior ativação das vias de sinalização do EGFR com efeito proliferativo (MAPK) e efeito anti apoptótico (PI3K) como demonstrado na Figura 2 (DEBUCQUOY et al. 2010).



A via de sinalização do EGFR é ativada pela interação de ligantes ao receptor ou de maneira independente de ligantes como exemplo, a ativação pela radiação ionizante. Ativação da via MAPK leva a transcrição de fatores de crescimento com efeito proliferativo e angiogênico. A ativação da via AKT resulta na evasão da apoptose e progressão do ciclo celular. A ativação do EGFR também pode ter função direta no núcleo pela translocação da proteína de reparo do DNA (DNA-PK) do citoplasma para o núcleo e ativar fatores de transcrição. A dupla quebra da cadeia do DNA causado pela irradiação ativa sensores de danos do DNA (DNA-PK, ATM, XRCC1, etc), que ativam vias efetoras para reparar o dano ao DNA, parar o ciclo celular (redistribuição), promover a angiogênese (reoxigenação), inibir a apoptose e promover a proliferação (repopulação). A inibição da via do EGFR leva a inibição da translocação do DNA-PK (menos reparo do DNA), o bloqueio do ciclo celular, a inibição da via anti apoptótica do AKT e inibição da via MAPK levando a menor proliferação e angiogênese. A inibição destas vias previne a recuperação das células após irradiação levando a morte celular e assim melhor resposta tumoral

Fonte: DEBUCQUOY et al. (2010)

Figura 2 - A via de sinalização do EGFR

A expressão do EGFR no câncer cervical varia de 6% a 90% dependendo da metodologia do estudo, e a correlação de sua expressão como biomarcador ou preditor de resposta terapêutica é controversa. O aumento da expressão foi associado com pior prognóstico em alguns estudos, mas não em outros (SOONTHORRMTHUM et al. 2011).

Em nível tecidual, a radiação pode alterar o microambiente da célula tumoral estimulando as células do estroma tumoral a secretarem fatores de crescimento, citocinas e quimocinas que agem na célula do parênquima tumoral estimulando ou inibindo a proliferação celular (BARCELLOS-HOFF et al. 2005). Estes fatores pró- inflamatórios podem estimular a expressão da ciclooxigenase-2 (COX-2) e promover a proliferação celular e inibir a apoptose (MILAS 2001; PRISE e O'SULLIVAN 2009).

1.2 COX-2 E RADIOTERAPIA

A expressão da COX-2 prejudica o efeito do tratamento radioterápico inibindo a apoptose induzida pela radiação. Pacientes com expressão positiva para a COX-2 no tumor apresentam menor taxa de resposta completa à radioterapia do que pacientes com COX-2 negativo (ISHIKAWA et al. 2007).

A enzima COX-2 converte o ácido araquidônico em prostaglandinas, sendo a prostaglandina E₂ a mais abundante prostaglandina detectada nas neoplasias epiteliais malignas. Os mecanismos implicados na carcinogênese ligada à COX-2 estão relacionados à capacidade da prostaglandina E em estimular a proliferação celular, a angiogênese, o maior poder de invasão, a inibição da

apoptose e a diminuição da resposta imunológica (YOUNG et al. 2008). A radiação ionizante ativa fosfolipase A2 citoplasmática, e inicia a liberação do ácido araquidônico da membrana fosfolípide resultando no aumento de prostaglandinas através da COX-2 (CHOY e MILAS 2003).

No câncer do colo do útero a expressão da COX-2 está relacionada com os diversos graus da neoplasia intraepitelial e carcinoma invasor, sugerindo que a COX-2 pode participar da carcinogênese do colo do útero e do processo de invasão. A elevada expressão da COX-2 relaciona-se com pior fator prognóstico nas pacientes com doença localmente avançada (YOUNG et al. 2008).

1.3 O HPV E RESPOSTA À RADIOTERAPIA

Durante a carcinogênese induzida pelo HPV (*human papillomavirus*) de alto risco no colo do útero ocorre o acúmulo de mutações que resulta na ativação constitutiva de várias vias de sinalização intracelular. Estes eventos moleculares podem estar relacionados com a radioresistência intrínseca da célula tumoral no câncer do colo do útero.

Cerca de 99,7% dos casos do câncer do colo do útero estão associados com o HPV de alto risco principalmente os tipos 16 e 18. Os HPVs de alto risco codificam duas proteínas transformantes E6 e E7 que são capazes de imortalizar ceratinócitos primários e a expressão contínua destas oncoproteínas é a etapa essencial e necessária para o desenvolvimento da neoplasia maligna (BOCCARDO e VILLA 2007; HELLNER e MÜNGER 2011).

Estas proteínas são capazes de desregular os mecanismos de controle do ciclo celular e apoptose ao interagir com a proteína supressora de tumor p53 e proteína do retinoblastoma (pRB). Esta interação provoca a degradação e a inativação destas proteínas alterando a capacidade das células de controlar os mecanismos de reparo do DNA, favorecendo assim o acúmulo de mutações (DOOBAR 2006; BOCCARDO e VILLA 2007; HELLNER e MÜNGER 2011).

Os modelos de carcinogênese *in vitro* têm demonstrado várias atividades das proteínas E6, E7 e E5 como a ativação de várias vias de sinalização celular como o do EGFR, COX-2 e HIF-1 α (AKERMAN et al. 2001; SUBBARAMAIAH et al. 2007; TANG et al. 2007; NAKAMURA et al. 2009; KIM et al. 2010). A persistência do DNA viral nas pacientes tratadas com radioterapia poderia resultar na contínua estimulação das vias de sinalização da COX-2, EGFR e HIF-1.

A presença do HPV avaliado tanto em citologia oncológica, como em biópsias realizada antes e após radioterapia demonstraram que a persistência do HPV após tratamento foi fortemente associada com a recorrência local, e a infecção com mais de um tipo de HPV foi fator prognóstico independente, correlacionada com falha terapêutica (NAGAY et al. 2004; DATTA et al. 2006; MUNAGALA et al. 2009; BADARACCO et al. 2009; SONG et al. 2010; WANG et al. 2010).

O bloqueio da expressão contínua de E6 e E7 através de um agente antiviral (Cidofovir), junto com a irradiação resultou na radiosensibilização de células HPV positivas (ABDULKARIN et al. 2002). Tal fato vem a corroborar com a hipótese de que o HPV pode participar dos mecanismos de radioresistência

no câncer do colo do útero (ABDULKARIN et al. 2002). O Instituto Gustav Roussy (França) está realizando ensaio de fase I, com a utilização do cidofovir junto com o esquema de radioterapia e quimioterapia concomitante nas pacientes com estágio IB, II, III e IVa do câncer do colo do útero (clinical trials.gov/ct2/show/NCT00811408).

1.4 HIPÓXIA (HIF-1 E HIF-2) E RADIORESISTÊNCIA

Além dos mecanismos citados acima a hipóxia tecidual é um importante mecanismo relacionado à radioresistência no câncer do colo do útero. O efeito biológico da radiação nas células é amplificado pelo oxigênio (O₂). O O₂ interage com radicais formados pela radiação resultando em produtos que causam dano ao DNA. Células irradiadas na presença do O₂ são cerca de 3 vezes mais sensíveis do que as células irradiadas em condições de severa hipóxia (BRISTOW e HILL 2008).

Nas últimas décadas vários trabalhos indicam que o microambiente hipóxico contribui para a progressão do câncer pela ativação dos programas transcricionais adaptativos que promovem a sobrevivência celular, a mobilidade e a angiogênese tumoral. Aproximadamente 1% a 1,5% do genoma é transcricionalmente regulado pela hipóxia, e muitos destes genes são controlados pela hipóxia induzível fator 1 (HIF-1), dentre estes genes estão o do COX-2 e EGFR (KEITH e SIMON 2007; HILL et al. 2009; MAZUMDAR et al. 2009).

HIF-1 é um complexo heterodimérico consistindo de subunidades α e β . HIF-1 β é constitutivamente expressado em todos os tipos de célula, e não é

controlado pelos níveis de oxigênio. Existem 3 genes HIF α humanos (HIF-1 α , HIF-2 α e HIF-3 α) que são oxigênio sensíveis, porém somente os dois primeiros foram intensamente estudados. HIF-1 é a mais ubiquitosamente expressada, e funciona como regulador da homeostase do oxigênio em muitos tipos de célula. Altos níveis da HIF-1 foram positivamente correlacionados com progressão de tumor e pior prognóstico em pacientes com câncer de cérebro, pulmão não pequenas células, mama, ovário, útero e colo do útero. HIF-2 é predominantemente expressada em células endoteliais normais, mas é expressa de maneira aberrante em alguns cânceres. A expressão aumentada da HIF-2 foi correlacionada com progressão do tumor em pacientes com câncer de pulmão não pequenas células, células escamosas de cabeça e pescoço e células do câncer renal (BACHTIARY et al. 2003; KOUKOURAKS et al. 2006; HILL et al. 2009; WANG et al. 2010).

1.5 MARCADORES MOLECULARES DE RADIORESISTÊNCIA E TERAPIA ALVO

NOORDHUIS et al. em 2011 realizaram uma revisão sistemática dos marcadores biológicos de prognóstico em pacientes com diagnóstico de câncer do colo do útero tratadas com radioterapia e quimioterapia concomitante, concluindo que de 82 marcadores estudados, os mais relevantes foram COX-2, EGFR e hipóxia tecidual (HIF-1). Estes marcadores estavam associados com pior prognóstico e pior resposta terapêutica e, portanto a inibição destas vias em combinação com a quimioterapia poderia melhorar a sobrevida nas pacientes com

câncer do colo do útero avançado. Diante de tais evidências, ensaio clínico com a inibição do EGFR, COX-2 e eliminação das células em hipóxia por fármaco biorredutível foram realizadas.

Ensaio clínico de fase I e II com inibidores de EGFR como monoterapia ou associado ao esquema de radio e quimioterapia no câncer de colo do útero avançado e metastático demonstram respostas variadas, trazendo benefício modesto apenas para uma parcela dos pacientes (SOONTHORRMTHUM et al. 2011; FARLEY et al. 2011). Em relação aos ensaios clínicos de fase I e II com inibidor da COX-2 demonstraram que a inibição da COX-2 não altera a sobrevida global e nem o controle local do tumor (GAFFNEY et al. 2007). Da mesma maneira os ensaios com a Tirazapamina um fármaco biorredutível que é tóxica para as células em hipóxia em combinação com radioterapia e cisplatina semanal aumentou a toxicidade do tratamento, sem trazer resultados efetivos na sobrevida das pacientes (MALUF et al. 2006; RISCHIN et al. 2010).

Novas terapias para tratamento de tumores sólidos falharam em melhorar a sobrevida global dos pacientes como descrito acima. O alvo desta abordagem terapêutica foi focado nas vias de sinalização implicadas na proliferação e sobrevivência celular, para diminuir a massa tumoral e encontrar resposta clínica objetiva, no entanto, esta resposta frequentemente foi seguida por um eventual crescimento do tumor. Portanto apesar da contínua melhoria no controle do câncer, a recorrência local ou metástase ainda ocorrem em alta proporção de pacientes após radioterapia ou tratamentos combinados. Este enigma clínico atualmente é explicado pela baixa eficácia do corrente tratamento na erradicação

da célula tronco tumoral (CTT) (BAUMANN et al. 2008; MILAS e HITTELMAN 2009; HITTELMAN et al. 2010; KOCH et al. 2010).

1.6 CÉLULA- TRONCO TUMORAL E RADIORESISTÊNCIA

As células estaminais ou células-tronco estão presentes nos órgãos e tecidos fetais e adultos correspondendo a um grupo heterogêneo de células de diferentes proveniências, desde as isoladas a partir do cordão umbilical, da placenta e até às provenientes de tecidos maduros. A principal função da célula estaminal adulta é a manutenção e reparação dos tecidos específicos e órgãos onde se encontram. Para exercerem esta função, as células estaminais possuem três propriedades distintivas: a autorenovação (durante a divisão celular uma ou ambas as células filhas retêm a mesma propriedade biológica da célula parental), a capacidade de desenvolver múltiplas linhagens e a elevada capacidade proliferativa (JORDAN e GUZMAN 2006).

Normalmente as células estaminais em processo de diferenciação geram um tipo de célula transitória antes de atingir o seu estágio final de diferenciação. Estas células intermediárias são chamadas de células precursoras ou progenitoras, e são parcialmente diferenciadas que, por divisão celular originam apenas células diferenciadas. As células estaminais são mantidas em um microambiente particular dentro de cada tecido denominado de nicho (JORDAN e GUZMAN 2006; MAROTTA e POLYAK 2009; RAIMONDI et al. 2010).

O nicho compreende estruturas celulares em tecidos e órgãos formando microambientes, que fornecem sinais extrínsecos (sejam moléculas de sinalização

intercelulares ou interações entre células-tronco e células vizinhas ou ainda interações com a matriz extracelular), que em combinação com fatores intrínsecos determinam o comportamento e o destino das células-tronco. Este microambiente tridimensional influencia e controla a expressão de genes que definem as propriedades estaminais, ou seja, a autorenovação ou a diferenciação. É provável que, nos organismos adultos a maior parte das células- tronco estejam num estado quiescente, mas que possam ser ativadas por fatores exógenos, entrando em divisão e diferenciação, e assim contribuam para a renovação ou reparação seguidos de um estresse ou injúria (MAROTTA e POLYAK 2009; RAIMONDI et al. 2010).

Em condições particulares, o preciso mecanismo de controle da célula tronco quiescente pode ser alterado por mudanças genéticas e epigenéticas na célula- tronco levando a sua insensibilidade aos estímulos que inibem o crescimento ou pela sua proliferação através de sinais aberrantes liberados do nicho. Nesta visão um microambiente disfuncional pode ser responsável pela emergência das CTT (MAROTTA e POLYAK 2009; RAIMONDI et al. 2010).

Muitos estudos realizados nos últimos 30 a 40 anos, quando vistos coletivamente, demonstram que as características do sistema das células tronco, as propriedades específicas descritas acima, ou ambos, são relevantes para algumas formas de câncer. Uma população relativamente rara e biologicamente distinta de células que iniciam um tumor foi identificada nos tumores malignos do sistema hematopoiético, cérebro e mama. Estes tipos de células possuem a capacidade de autorenovação, o potencial para se desenvolver em qualquer tipo de célula da população total de um tumor e a habilidade para dirigir a expansão da população

de células malignas. Portanto as propriedades destas células que iniciam o tumor são semelhantes aos três aspectos que definem a célula tronco-normal. Células malignas com estas propriedades foram denominadas de células tronco-tumorais (CTT) (JORDAN e GUZMAN 2006).

A Associação Americana de Pesquisa do Câncer definiu a CTT, como a célula dentro de um tumor, que possui a capacidade para se autorenovar e originar uma linhagem heterogênea das células cancerosas, que formam a massa tumoral. Esta definição não indica a fonte destas células, estas células poderiam hipoteticamente originar-se da célula tronco-adulta normal, das células progenitoras ou das células diferenciadas (GOLDTHWAITE 2011).

Dados estes aspectos é possível que a célula- tronco tumoral origine-se da mutação de células tronco-normais, assim como da mutação de células progenitoras. Cada célula progenitora (também chamada de célula transiente) possui habilidade replicativa, mas geralmente elas não possuem a capacidade de autorenovação da célula-tronco. Para se tornarem uma célula-tronco tumoral, a célula progenitora deve adquirir mutações que causem o ganho da propriedade de autorenovação. Além destas duas hipóteses para a origem da célula-tronco tumoral, alguns pesquisadores sugeriram que células mais diferenciadas podem reiniciar um programa de autorenovação como parte ou consequência da transformação maligna (GOLDTHWAITE 2011).

Acredita-se que as CTT adquiram os armamentos moleculares da célula tronco-normal que capacita as CTT para a autorenovação, a apresentarem um longo tempo de vida, apresentar resistência a estímulos químicos e eletromagnéticos, a se manter em dormência por tempo prolongado e colonizar

outras partes do corpo. Assim a hipótese das CTT pode explicar o motivo pelo qual uma pessoa com câncer pode não ser considerada curada mesmo quando a sua resposta inicial a radioterapia e a quimioterapia são consideradas excelentes. Uma pequena população de CTT pode sobreviver a estes regimes terapêuticos sendo responsáveis pela recorrência local após tratamento efetivo dos tumores sólidos (SCHATTON et al. 2009).

As primeiras evidências de CTT foram descritas nas leucemias, em que um grupo específico de células tumorais foi capaz de replicar tumores in vitro com grande facilidade, enquanto o mesmo não era obtido com o restante das células leucêmicas. Estas células foram diferenciadas das outras por sua capacidade de expressar a molécula CD34 e não expressar a molécula CD38, sendo então denominadas como CTT (BOMKEN et al. 2010).

Posteriormente, as CTT foram descritos em tumores sólidos. Na mama, verificou-se que o implante de cerca de 100 células CD44 positivas e CD24 negativas foram capazes de formar tumores primários e secundários, enquanto o mesmo efeito não foi obtido com o implante de dezenas de milhares de células tumorais diferenciadas (BOMKEN et al. 2010). Em um estudo similar realizado com tumores do sistema nervoso central, um pequeno conjunto de 100 células tumorais CD133 positivas reproduziram em ratos um tumor idêntico ao original, enquanto 100.000 células CD133 negativas não puderam fazer o mesmo. Desde então as CTT têm sido descritas em diversos outros tumores, como o câncer de próstata, melanoma, pâncreas, fígado, cabeça e pescoço e colorretais (BOMKEN et al. 2010).

No câncer de colo do útero FENG et al. em 2009 demonstraram que células tumorais CD44 positivas foram capazes de proliferar e formar novos tumores quando enxertado em animais imunodeficientes e estas células foram positivas para CK 17 um marcador de células de reserva do colo do útero. Além disso, as células que apresentavam CD44 e CK17 também expressavam genes relacionados com as células-tronco embrionárias e adultas (Oct-4, Piwil2, C-myc, Stat 3e Sox 2).

Acredita-se que o câncer devido a mutações induzidas quimicamente, as infecções virais, as mutações somáticas ou inerentes ou as mudanças epigenéticas, a lesão molecular ou infecção geralmente ocorram no compartimento das células tronco (SELL 2010).

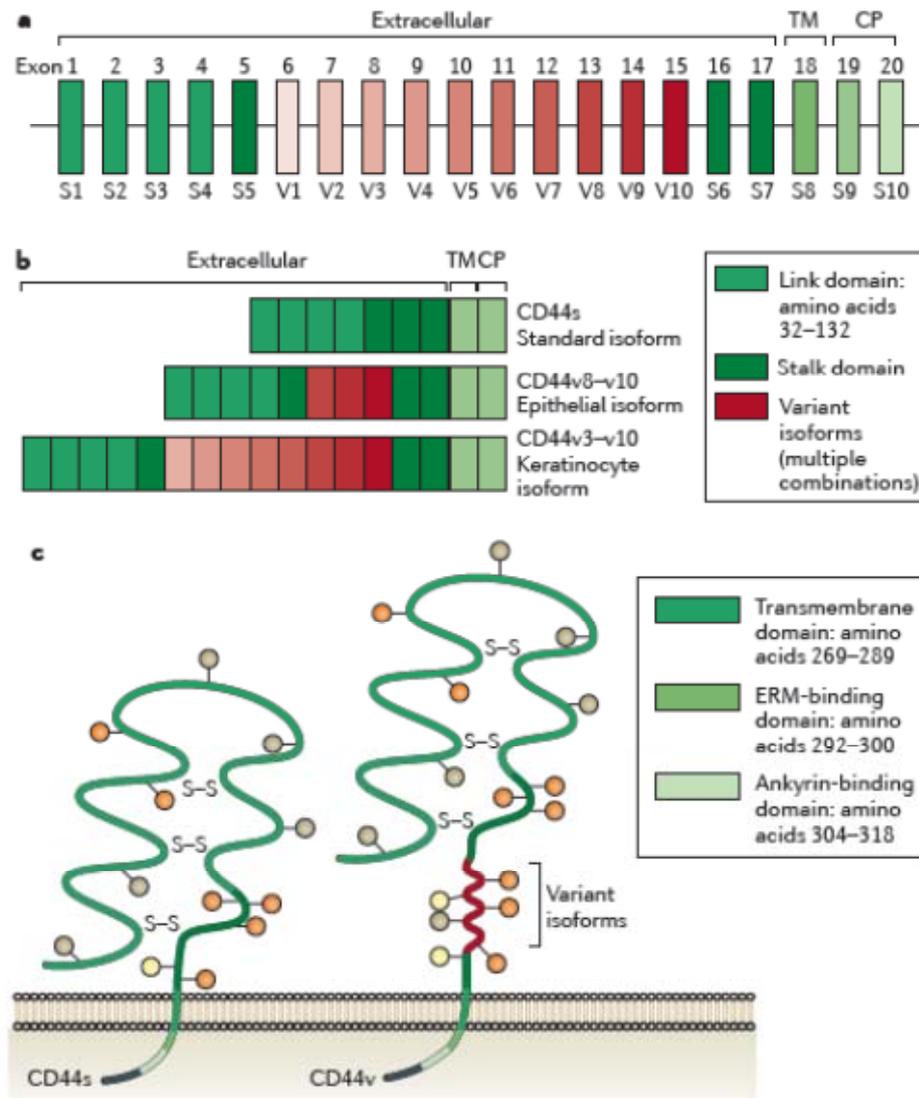
O método mais utilizado para identificar CTT envolve a expressão de marcadores de superfície incluindo CD133, CD44, CD24, moléculas de adesão epitelial (EpCAM), CD90, CD117, aldeído desidrogenase (ALDH), nestina, integrina e o CD44 é o marcador de CTT mais frequentemente observado (VISVADER e LINDEMAN 2008; ZÖLLER 2011).

1.7 CD44

As proteínas CD44 são codificadas por um simples gene localizado no braço curto do cromossomo 11 humano que compreende 20 exons. A menor e a mais abundante isoforma da proteína CD44 é denominada de forma padrão (CD44s) também chamada de forma hematopoiética (CD44H). Variações do

domínio extracelular são geradas por "*splicing*" de 10 exons variantes (v1-v10). A estrutura proteica e o gene CD44 estão demonstrados na Figura 3.

Geralmente a molécula padrão (CD44s) é expressa no epitélio normal, e a CD44v é expressa somente em algumas células epiteliais durante o desenvolvimento embrionário, maturação e ativação de linfócitos e em vários tipos de câncer (leucemias, e nos carcinoma de mama, próstata, colorretal e pâncreas). As isoformas variantes do CD44 v2-10 foram encontrados no epitélio escamoso e as variantes v8-10 em outros epitélios (HEIDER et al. 2004; ZÖLLER 2011). O modo pela qual a CD44 age como marcador de CTT ainda não está definido.

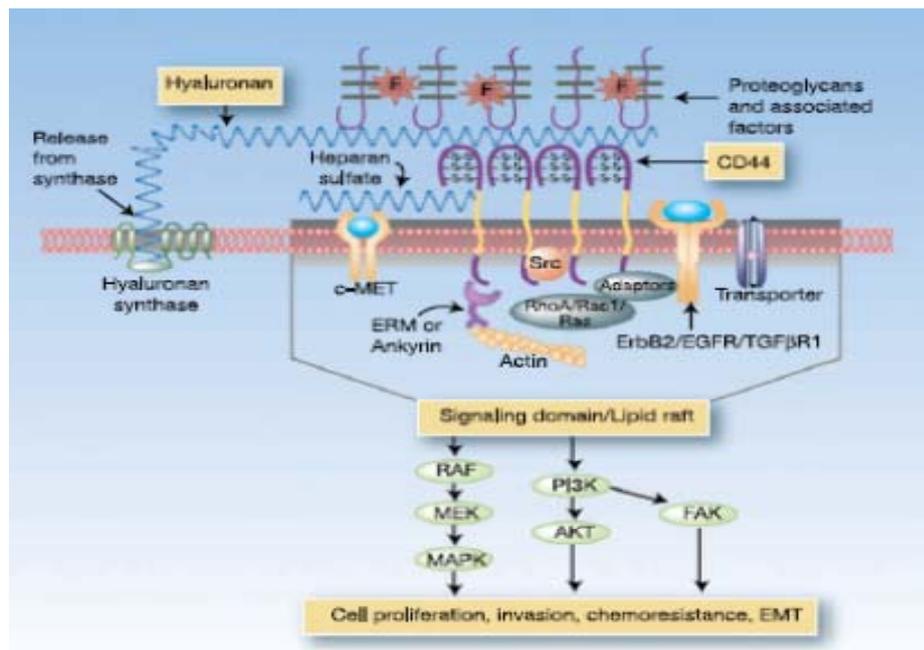


a) O gene Cd44 consiste de vários exons, alguns dos quais são regiões constantes que são usados em todos os RNA mensageiro do CD44 e proteínas (barras verdes) e outros são exons variantes (barras vermelhas) que são usadas nas proteínas CD44 variantes e são selecionadas por splicing alternativo. **b)** Exemplos de proteínas originadas pelo splicing alternativo. **c)** A proteína CD44 é composta de um domínio extracelular e uma região próxima à região transmembrana onde os produtos dos exons variantes (vermelhos) são inseridos a região transmembrana (TM) e a cauda citoplasmática (CP). Há múltiplos sítios para N-glicosilação (círculos marrons) e O-glicosilação (Círculos laranja) e 2 sítios ativos de ligação para os glicosaminoglicanos (círculos amarelos). O módulo de ligação contém sítios de ligação para o ácido hialurônico (HÁ). A cauda citoplasmática possui motivos de ligação para proteínas do citoesqueleto

Fonte: ZÖLLER (2011)

Figura 3 - O gene CD44 e estrutura proteica.

A proteína CD44 participa de muitos processos celulares incluindo a regulação da divisão celular, sobrevivência, migração e adesão através de sua interação com o ácido hialurônico e pela sua ação como uma plataforma celular para fatores de crescimento e proteoglicanos. Ela também age como co-receptor para mediar a sinalização da família HER e MET de receptores tirosina quinase, possivelmente organizando a montagem do complexo funcional destes receptores (PONTA et al. 2003; ZÖLLER 2011). Maiores detalhes da regulação das vias de sinalização pelo CD44 no câncer estão demonstrados na Figura 4.



O ácido hialurônico é sintetizado na membrana celular e liberado no espaço intercelular. Este hialuronato liberado interage com a CD44 para induzir ou estabilizar os domínios responsáveis pela sinalização dentro da membrana plasmática. Este domínio de sinalização contém receptores de tirosina quinase (ErB-2 e EGFR), outros receptores (TGFβR1) e receptores não tirosina quinase (família Src) que controlam vias oncogênicas do MAP quinase PI3 quinase/ Akt que estimulam a sobrevivência e a proliferação celular. Várias proteínas adaptadoras como Vav2, Grb2 e Gab-1 mediam a interação do CD44 com efetores *upstream* como RhoA, Rac1 e Ras. Em outros casos a região variante do CD44 apresenta sítio de ligação para o heparan sulfatado ligado a fatores regulatórios e o receptor de tirosina quinase c-MET. As interações entre CD44 e ácido hialurônico também induzem mudanças do citoesqueleto promovendo a motilidade celular e invasão. Neste caso filamentos de actina unem-se a cauda citoplasmática do CD44 via membros da família ERM do inglês ezrin-radixin-moesin ou ankyrin. Proteoglicanos e fatores associados ligados ao ácido hialurônico também podem influenciar estas atividades

Fonte: TOOLE (2009).

Figura 4 - Regulação das Vias de sinalização pela interação do ácido hialurônico com o CD44

O carcinoma de células escamosas representa o maior grupo de tumores de origem epitelial das vias aéreas, do trato digestivo e do trato genital assim como a pele. Independente da origem tecidual a esmagadora maioria dos carcinomas de células escamosas primários em amostras de mais de 1000 pacientes apresentaram expressão de CD44v6. A mais alta frequência de expressão foi encontrada nos tumores da cabeça e pescoço, esôfago, pele e pulmão onde muitos autores

relataram frequências excedendo 90%. Esta frequência e expressão homogênea do CD44v6 faz do carcinoma de células escamosas um adequado alvo para abordagens terapêuticas com anticorpos específicos contra CD44v6 (HEIDER et al. 2004).

No câncer do colo do útero a frequência de expressão do CD44v6 variou de 32-100% das amostras mostrando alta variabilidade do que nos outros tipos de tumor. A maioria dos trabalhos incluiu somente estádios iniciais tratados por cirurgia e a correlação deste marcador como fator prognóstico é controversa (KAINZ et al. 1995a ; SPEISER et al. 1997; HEIDER et al. 2004; BOUDA et al. 2005; HORN et al. 2005). Apenas um trabalho publicado em 1995 avaliou a expressão de variantes da CD44 nos carcinomas do colo do útero estágio III em 40 pacientes e a expressão da variante v6 foi encontrado em 55 % das amostras e esta expressão foi associado com pior prognóstico (KAINZ et al. 1995 b).

A proteína CD44 foi definida como marcador de CTT, mas como uma molécula abundantemente expressada pode ser um marcador confiável para as CTT que constitui a minoria das células dentro da massa tumoral? Acredita-se que as funções biológicas da CD44 devam ser de valor para as CTT e isto se deve principalmente ao fato de que esta molécula media a interação das CTT com o seu nicho. Os resultados de ensaios clínicos iniciais com o bloqueio da CD44 compelem os múltiplos benefícios que as CTT recebem da CD44 e reforçam o ponto de que a função das CTT pode ser interrompida pelo bloqueio desta única molécula (ZÖLLER 2011). Além disso, DE JONG et al. em 2010 demonstraram que em 76 pacientes com tumor de laringe inicial tratados com radioterapia, a expressão da CD44 foi o único fator biológico correlacionada com controle local

do tumor e que provavelmente CD44 seja um marcador que permitirá mensurar a presença das CTT diretamente no tumor (BAUMANN e KRAUSE 2010).

Uma questão em aberto é de que o epitopo reconhecido por anticorpos CD44, comumente usados para isolar a célula-tronco tumoral reconhece tanto o CD44s como o CD44v. Assim a expressão da CD44v nas células-tronco permanece inexplorada (ZÖLLER 2011). Devido a este fato e ao escasso número de trabalhos analisando a expressão da CD44 v6 com controle local e à distância em estádios avançados do câncer do colo do útero tratados com radioterapia, foi realizada a análise de expressão desta proteína no trabalho.

1.8 HIPÓXIA E MANUTENÇÃO DA CÉLULA-TRONCO TUMORAL

A hipóxia tumoral é o principal fator do microambiente tumoral responsável pela radiosensibilidade extrínseca, e várias linhas de evidência sugerem que a hipóxia promove a persistência das células-tronco. Nos tumores as CTT residem preferencialmente em regiões de hipóxia. Interessantemente enquanto HIF-1 α está presente tanto nas CTT como nas populações não CTT, HIF-2 α está altamente expresso somente na população CTT. Estes achados sugerem funções diferentes destas duas isoformas nas CTT. A expressão de HIF-1 α pode interagir com a sinalização do NOTCH e contribuir para a manutenção do estado indiferenciado. A ativação de HIF-2 α pode induzir a expressão do fator de transcrição OCT-4, que é um dos mais importantes componentes na manutenção de células tronco em diferentes tecidos. Além disto, HIF-2 pode regular a ativação

do EGFR e COX-2 que podem estimular a divisão simétrica das CTT expandindo o número de CTT no tumor (YOSHIMURA et al. 2004; COVELLO et al. 2006; WANG e SCHNEIDER 2010; HEDDESTON et al. 2010; KOCH et al. 2010; ZHU et al. 2011). Devido à importância da proteína HIF-2 na manutenção da célula-tronco e também a falta de estudos que analisem a expressão da HIF-2 nos carcinomas avançados do colo do útero também incluímos a sua análise nas amostras do presente estudo.

Dos dados descritos acima, realizamos a hipótese de que uma complexa rede de sinalização iniciado pelo HPV de alto risco quando somados a ativação das vias de sinalização em resposta à radiação ionizante pode ser responsável pelo mecanismo de radioresistencia intrínseca no câncer do colo do útero assim como a emergência de um microambiente propício para a expansão das CTT.

Não encontramos na literatura estudos que tenham investigado a associação da COX-2, EGFR, HIF-1 α , HIF-2 α , CD44v6, com controle local do tumor após radioterapia e nem a hipótese de que a falha local e à distância se devam a presença de CTT resistentes à radioterapia.

O objetivo principal deste estudo, portanto, é analisar o impacto da expressão destes marcadores no controle local e a distancia da doença em pacientes com diagnóstico de carcinoma de células escamosas do colo do útero localmente avançado EC II, III e IVa da FIGO.

2 OBJETIVOS

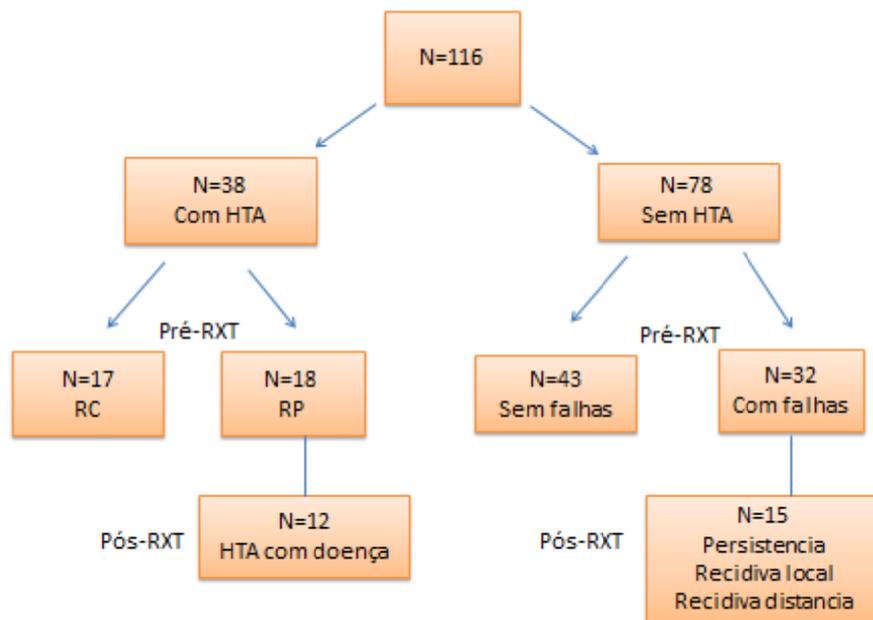
- 1- Avaliar o valor preditivo de resposta à radioterapia da expressão imunohistoquímica de EGFR, COX-2, HIF-1, HIF-2 e CD44v6 nos carcinomas epidermóides do colo do útero EC IIB, IIIa, IIIb, IVa da FIGO;
- 2- Avaliar da mesma maneira a imunexpressão diferencial nas células do tumor primário, tumor recidivado, tumor residual pós radioterapia e tumor metastático.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

Os casos incluídos no estudo foram as pacientes com diagnóstico de carcinoma invasivo do colo do útero, admitidas no Departamento de Ginecologia do Hospital do Câncer A.C. Camargo no período de 1990 a 2001, utilizando-se o banco do departamento de radioterapia e o banco de dados do departamento de anatomia patológica. A casuística do período de 1990 a 1992 foi obtida através do banco do Departamento de Anatomia Patológica, analisando-se 500 prontuários e foram avaliados 918 prontuários com base no banco da radioterapia de pacientes tratados no período de 1992 a 2001. Excluindo os casos com estádios iniciais, os casos sem prontuário adequado e aquelas que vieram ao hospital somente para realização da radioterapia (prestação de serviço para outras instituições), 205 casos foram elegíveis para o estudo. Desta casuística, 138 foram tratadas com radioterapia exclusiva e 67 pacientes foram tratadas com radioterapia pré-operatória e histerectomia radical tipo II 82 dias após o término da radioterapia. Houve perda de 22 casos no grupo tratado por radioterapia exclusiva, e 27 casos no grupo tratado com radioterapia pré-operatória, pois os respectivos blocos de biópsia tanto pré- radioterapia como pós- radioterapia não foram encontrados. Portanto a casuística consiste de 116 pacientes sendo 78 casos no braço da radioterapia exclusiva e 38 casos de radioterapia pré-operatória. Dos blocos de parafina resgatados, a grande maioria representa biópsias pré-radioterapia. Blocos de biópsias pós-radioterapia resgatados no grupo de

pacientes submetidas à radioterapia exclusiva correspondem a biópsias obtidas de persistência da doença (5 casos), recidiva em reto (1 caso), recidiva na vagina (4 casos), recidiva na bexiga (1 caso), colo (1 caso) e 4 biópsias obtidas de metástase à distância (cérebro, pele do antebraço, peritônio e linfonodo supra clavicular). As amostras pós-radioterapia no grupo que realizou radioterapia com histerectomia referem-se ao espécime de histerectomia com doença residual (resposta parcial) como representado pelo delineamento do estudo abaixo (Figura 5).



RC-resposta completa; RP- resposta parcial; RXT- radioterapia; HTA- histerectomia

Figura 5 - Delineamento do estudo

O estadiamento foi realizado de acordo com a classificação da FIGO (Anexo 1). A avaliação prévia ao tratamento consistiu de história médica, exame físico, biópsia e exame ginecológico. Exames de tomografia computadorizada e ressonância

magnética não foram realizados. Todas as pacientes foram submetidas à cistoscopia, retossigmoidoscopia, contagem sanguínea de rotina, perfil bioquímico e RX tórax.

Houve dificuldade na seleção dos casos após o período de 1996 pelo fato de não se realizar novas biópsias dos casos novos que ingressaram no departamento de ginecologia sendo solicitada somente a revisão de lâminas, portanto, não conseguimos os blocos de uma grande parte das pacientes tratadas de 1996 a 2001.

Espécimes de biópsia diagnóstica realizada antes do tratamento, blocos de parafina de histerectomia e biópsias realizadas após tratamento radioterápico foram resgatados do arquivo do Departamento de Anatomia Patológica. Os blocos separados foram submetidos a novos cortes, e o primeiro corte obtido de cada bloco foi corado pela técnica tradicional de hematoxilina-eosina (HE) e as lâminas foram revistas por um patologista do Hospital AC Camargo, confirmando o diagnóstico histopatológico da neoplasia.

As variáveis clínicas como a idade, o estágio da FIGO foram extraídos do prontuário médico, utilizando-se uma ficha de coleta de dados (Anexo 2).

3.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- 1- Pacientes com biópsia pré- tratamento confirmando carcinoma espinocelular do colo uterino e biópsia ou espécime de histerectomia após radioterapia.
- 2- Pacientes com estadiamento clínico IIB, IIIa, IIIb e IVa de acordo com os critérios da FIGO.

3.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- 1- Ausência de material suficiente para o estudo imunoistoquímico
- 2- Pacientes que receberam tratamento quimioterápico pré-operatória
- 3- Pacientes com histórico de neoplasia maligna de outros sítios submetida á radioterapia em campo pélvico
- 4- Pacientes que desenvolveram segunda neoplasia até cinco anos após o diagnóstico do câncer do colo do útero, excetuando-se as neoplasias de pele não melanoma.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa no dia 28/10/2008.

3.4 MÉTODO

Foi realizada imunoistoquímica para EGFR, COX-2, CD44v6, HIF-1 e HIF-2 e a expressão destas proteínas foi avaliada em nível de membrana, citoplasma e núcleo utilizando-se cortes convencionais.

As reações foram realizadas seguindo o protocolo aqui descrito. Desparafinização dos cortes de 3µm de espessura, do material incluído em parafina e deixado por 24 horas em estufa 60 °C: xilol a 60°C por 20 minutos, xilol à temperatura ambiente por 20 minutos, Etanol 100% 30 segundos, Etanol 85% 30 segundos, Etanol 70% 30 segundos. A seguir as lâminas foram lavadas em água corrente e água destilada. Após ferver a solução tampão citrato 10 mM pH 6.0 em

panela de pressão (Solar, Rapid Express, Tramontina) as lâminas foram mergulhadas na solução em ebulição e a panela foi lacrada com a válvula seletora de pressão no número 2. Após pressurização total por 3 minutos a válvula seletora foi girada para liberação do vapor e a panela foi mantida fechada sob água corrente até a despressurização total. Então após destampar a panela as lâminas foram lavadas em água corrente e água destilada. A seguir procedemos com o bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ 3% (água oxigenada 10 vol) com 4 trocas de 5 minutos cada. Então as lâminas foram lavadas em água corrente e água destilada e lavadas com solução salina tamponada com fosfatos (PBS- phosphate buffered saline) 10 mM pH 7,4 por 5 minutos. As lâminas foram incubadas com o anticorpo primário diluído em título pré-estabelecido conforme quadro abaixo em tampão PBS contendo albumina bovina (BSA) 1% (Sigma, A9647, EUA) e azida sódica (NaN₃) 0,1% por 30 minutos a 37°C e por 18 horas em câmara úmida.

Quadro 1 - Anticorpos utilizados.

Anticorpos	Clones	Títulos	Fabricantes
COX-2	Monoclonal 4H12	1:6000	Novocastra NCL-COX-2, Newcatle, Reino Unido.
EGFR	Monoclonal EGFR-25	1:50	Novocastra NCL-L EGFR -384
HIF-1	Monoclonal H1alpha67	1:100	Neomarkers MS1164, Fremont, CA EUA
HIF-2	Monoclonal ep190b	1:2000	AbCam ab8365, Cambridge, MA, EUA.
CD44v6	Monoclonal VFF-7	1:200	Novocastra NCL-CD44v6

Em seguida as lâminas foram lavadas em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada e incubadas por 30 minutos a 37°C com Post Block (NovoLink Max Polymer RE7260-k, Reino Unido). Lavagem com tampão PBS com 3 trocas de

3 minutos cada e incubação com o NovoLink Polymer por 30 minutos a 37°C. Após as lâminas serem lavadas em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada foram incubadas em solução substrato: 100mg de 3,3` Diaminobenzidine Tetrahydrochloride (DAB) (Sigma, D-5637, EUA); 1ml de Dimetilsulfóxido (DMSO); 1ml de H₂O₂ 6% (água oxigenada de 20 vol); 100mL de PBS por 5 minutos a 37°C ao abrigo da luz. Então foi observado ao microscópio nas lâminas controles o desenvolvimento de precipitado castanho dourado como produto final da reação. As lâminas foram lavadas em água corrente e água destilada por 3 minutos e contra coradas com Hematoxilina de Harris por 1 minuto. Novamente foram lavadas em água corrente e destilada e imersos 2 vezes em água amoniacal (solução de hidróxido de amônio 0,5%) lavando em seguida em água corrente e destilada. A seguir as lâminas foram desidratadas em: etanol 80%, 30 segundos; etanol 95%, 30 segundos; etanol 100% 2 vezes, 30 segundos cada; xilol 4 vezes, 30 segundos cada. Procedemos a seguir a montagem das lâminas em Entellan neu (Merck, 1.07961, Alemanha).

Controle negativo foi processado similarmente pela omissão do anticorpo primário e espécimes de placenta foram usadas como controle positivo para COX-2, EGFR, CD44v6, HIF-1 e 2.

3.4.1 Leitura das Lâminas

Para a análise da expressão imunistoquímica das proteínas COX-2, EGFR, HIF-1, HIF-2 e CD44v6 foi utilizado o sistema Aperio ScanScope XT (Aperio Technologies).

O *Aperio Digital Pathology Environment* é constituído por um sistema automatizado de escaneamento de slides de alta precisão, o *Aperio ScanScope XT*; um computador com janela para captura de imagens conectado à internet, um software para visualização e processamento das imagens chamado *ImageScope* e um sistema de armazenamento e gerenciamento de imagens chamado *Spectrum*.

O *Aperio ScanScope XT* permite o escaneamento de até 120 lâminas por sessão. Os níveis de iluminação de cada lâmina foram calibrados utilizando-se um procedimento chamado “prescan”. A imagem digital adquirida representando todo o tecido no corte foi avaliada para a qualidade da imagem. De cada 120 lâminas escaneadas 2 a 3 lâminas não foram capturadas devido à falha do “software” para encontrar o tecido com fraca coloração. As imagens adquiridas são automaticamente armazenadas no servidor local e revisadas pelo patologista na tela do computador, que determinou as áreas da lâmina a serem analisadas pelo programa. O sistema *Aperio* é capaz de detectar, contar e classificar células baseadas na cor, tamanho e formato. Utilizou-se o algoritmo *Positive Pixel Count v9* para avaliar COX-2, o algoritmo *ICH Membrane v1* e *Positive Pixel Count v9* para EGFR e CD44v6 e o algoritmo *ICH Nuclear v1* para a análise de imagem nuclear da HIF-1 e HIF-2.

O limite de intensidade estabelece 3 faixas para a classificação dos valores em pixel. Para o algoritmo *Positive Pixel Count v9* o limite superior para fraco positivo é 220 então qualquer pixel com um valor de intensidade maior do que 220 é considerado como negativo. Um pixel com valor de intensidade entre 175-220 é considerado fraco positivo e valor de intensidade entre 100-175 é considerado moderado positivo, sendo forte positivo valor de intensidade entre 0-100. Para o algoritmo de análise para membrana o limite superior para fraco positivo é 200 então

valores acima de 200 são considerados negativos. Valor de intensidade entre 170-200 é considerado fraco positivo, 105-170 é considerado moderado positivo e valores entre 0-105 é considerado forte positivo. Em relação ao algoritmo que analisa o núcleo o limite superior para fraco positivo (+1) é 210, portanto valores acima de 210 são considerados negativos e valores de intensidade entre 188-210 é considerado fraco positivo, valores entre 162-188 moderado positivo (+2) e entre 0-162 forte positivo (+3). Estes valores de corte são fornecidos pelo *software* do Apério. Cada resultado em pixel é codificado no tecido marcado por cores de acordo com a sua classificação. A cor azul significa negativo, a cor amarela corresponde a áreas com intensidade fraca, a cor laranja à intensidade moderada e a cor vermelha marca a áreas positivo forte como demonstrado nos Anexos 3 a 8. O Apério também descreve os resultados para membrana e núcleo através da porcentagem de células coradas com escore +3, +2 e +1 que apresenta correspondência com a média da intensidade em pixel da área avaliada. Para uniformizar a descrição dos resultados obtidos optou-se por utilizar a intensidade em pixel para todas as proteínas avaliadas.

Detalhes sobre o “*hardware*” e “*software*” do APERIO SCANSCOPE XT são avaliáveis no site (www.aperio.com).

3.4.2 Análise Estatística

Para a análise de dados as pacientes tratadas foram divididas em dois grupos: com histerectomia o grupo de pacientes tratadas com radioterapia pré-operatória utilizando radioterapia pélvica e braquiterapia com dose menor no ponto A, seguida de histerectomia radical tipo II e linfadenectomia pélvica. Nas pacientes submetidas à cirúrgica, portanto, a variável resposta foi avaliada de acordo com a presença ou

ausência de doença residual no espécime da histerectomia. O outro grupo sem histerectomia a resposta foi determinada pela avaliação clínica durante e após término da radioterapia, dividindo-se as variáveis em com falha terapêutica e sem falha. Desta forma agruparam-se na variável falha local, as pacientes com progressão da doença durante a radioterapia e persistência da doença ao término da radioterapia, com as pacientes que apresentaram recidiva local detectado durante o seguimento da paciente. A falha a distância foi considerado quando houve diagnóstico de metástase fora da pelve.

Na casuística encontrou-se somente 2 casos com estágio IVa, que por representarem os estágios mais avançados da doença e serem infrequentes (1,9% dos casos), não possuem tratamento padrão (BELATTI et al. 2011; ROSE et al. 2011). Portanto estes dois casos foram excluídos da análise para curva de sobrevida por não poderem ser agrupados com os estágios III da casuística.

A distribuição de frequências foi utilizada para descrever as variáveis categóricas, e as medidas de tendência central e de variabilidade para as numéricas ou contínuas. O teste de frequências do qui-quadrado foi utilizado para comparar as variáveis categóricas com relação à resposta e falha terapêutica, em tabelas de contingências e, em tabelas 2x2, quando pelo menos uma frequência esperada foi menor do que 5 o teste exato de Fisher foi adotado. O teste t de Student foi aplicado para comparar a resposta (completa e parcial) e falha terapêutica (sim/não) com relação às médias das variáveis numéricas, quando a distribuição normal foi identificada. O teste U de Mann-Whitney foi utilizado para comparar as medianas dos resultados numéricos dos marcadores e nas demais variáveis quando a normalidade dos dados não foi identificada, em relação à resposta (completa e

parcial) e falha terapêutica (sim/não), e o teste pareado de sinais de Wilcoxon na comparação entre os resultados dos marcadores pré e pós tratamento radioterápico. O teste de Shapiro-Wilk foi adotado para verificar a normalidades dos dados.

O tempo de seguimento foi o período entre a data da última radioterapia até a data do óbito e, para os casos censurados foi a data da última informação. Para estimar a sobrevida livre de doença de doença, considerou-se o período livre de recidivas como sendo o tempo decorrido da data final da radioterapia até o diagnóstico de recidiva (local ou a distância). A técnica de Kaplan-Meier foi adotada para estimar as probabilidades de sobrevida global e livre de doença. A diferença entre as curvas de sobrevida de uma mesma variável foi verificada através do teste de logrank.

O nível de significância de 5% foi considerado em todos os testes estatísticos. O programa estatístico de computador STATA versão 7.0 foi utilizado para a realização das análises estatísticas (TATA Corp. Stata Corporation. Intercooled Stata 7.0. College Station, Te4xas 77840 USA-STATA-P).

4 RESULTADOS

4.1 POPULAÇÃO DO ESTUDO

As características demográficas das pacientes para cada grupo (com histerectomia e sem histerectomia) estão descritos na Tabela 1. O número total da casuística foi de 116 mulheres, 78 casos tratados por radioterapia exclusiva e 38 casos com radioterapia pré-operatória e compleição cirúrgica. No grupo sem histerectomia a idade variou de 24-78 anos (média=53,1 anos; dp=12,7 anos; mediana=53 anos). Os casos com histerectomia apresentavam idade entre 22-67 anos (média=46,5; dp=10,6; mediana=46,5). A maioria das mulheres em ambos os grupos de tratamento era branca (70,7%) com número médio de gestações de 6,9 (dp=4,0; mediana=6,0) para o grupo sem histerectomia e 5,3 (dp=3,0; mediana=5,3) para o grupo com histerectomia. Uso atual ou passado de anticoncepcional oral foi relatado por 21,5% do total de pacientes analisadas e o antecedente de tabagismo por 31%.

O tempo de seguimento em meses variou de 2,2-250,9 (média=81,8; dp=66,1; mediana=73,0) para o grupo sem histerectomia e 6,2-204,2 (média= 107,5; dp=70,6; mediana=117,1) para o grupo com histerectomia. Ao tempo desta análise 32 (41,0%) paciente estavam vivas sem doença no grupo sem histerectomia e 20(52%) no grupo com histerectomia. Um total de 4 pacientes do estudo (3,5%) estavam vivas com doença sendo 3 (3,8%) no grupo sem histerectomia e 1(2,6%) no grupo com histerectomia, mortes por câncer ocorreram em 13 pacientes (16,7%) no grupo sem histerectomia e 11(29,0%) no grupo com histerectomia (Tabela 1). Houve 25(32,1%)

de perdido de vista no grupo sem histerectomia e 4 (10,5%) no grupo com histerectomia.

As 25 pacientes consideradas perdidos de vista (32,1%) no grupo sem histerectomia foram consideradas fora de possibilidades terapêuticas após persistência, progressão da doença e recidiva sendo transferidas para um hospital de retaguarda na época do tratamento. Apesar do setor de preservação realizar busca ativa dos pacientes não se conseguiu informações sobre o desfecho final destas 25 pacientes.

No grupo com histerectomia 37(97,4%) eram estágio IIB e houve 1 caso estágio IIIB (2,6%). Para o grupo sem histerectomia 21(26,9%) pacientes foram estadiadas como IIB, 4 (5,1%) como IIIA, 51(65,4%) como IIIB e 2(2,6%) como IVa. Das pacientes com estágio IIIB e IVa 23(29,5%) no grupo sem histerectomia apresentavam comprometimento parametrial até parede pélvica bilateralmente e 31(39,7%) comprometimento unilateral. A presença de anemia (taxa de hemoglobina menor que 10g%) no pré-tratamento foi identificada em 10(16,4%) dos casos no grupo sem histerectomia e 9(30,0%) no grupo com histerectomia, sendo que a dosagem de hemoglobina variou de 6,8 a 14,5g% (média=11,6 g%; dp=1,6 g%; mediana=12,0 g%)no grupo sem histerectomia e 5,7 a 13,4 (média=11,2; dp=2,0; mediana=11,9) no grupo com histerectomia (Tabela 1). Nas pacientes submetidas à compleição cirúrgica após radioterapia, o tempo médio entre o final da radioterapia e histerectomia tipo II em dias foi de 48,4(dp=26,5; mediana=43).

Tabela 1 - Distribuição da casuística de acordo com variáveis demográficas e de estilo de vida

Variável	Categoria / Medidas	Histerectomia		TOTAL
		Não	Sim	
Idade (anos)	N	78	38	116
	Variação	24 – 78	22 – 67	22 – 78
	Mediana	53,0	46,5	50,5
	Media (Desvio Padrão)	53,1 (12,7)	46,9 (10,6)	51,0 (12,4)
Raça	Branca	55 (70,5)	27 (71,0)	82 (70,7)
	Não branca	23 (29,5)	11 (29,0)	34 (29,3)
Tabagismo	Não	44 (56,4)	17 (44,7)	61 (52,6)
	Sim	22 (28,2)	14 (36,8)	36 (31,0)
	Ex-tabagista	1 (1,3)	2 (5,3)	3 (2,6)
	Ignorado	11 (14,1)	5 (13,2)	16 (13,8)
Uso de anticoncepcional	Não	31 (39,7)	12 (31,6)	43 (37,1)
	Sim	14 (18,0)	11 (28,9)	25 (21,5)
	Ignorado	33 (42,3)	15 (39,5)	48 (41,4)
Numero de gestações	N	71	37	108
	Variação	1 – 17	1 – 12	1 – 17
	Mediana	6	5	6
	Media (Desvio Padrão)	6,9 (4,0)	5,3 (3,0)	6,4 (3,8)
Follow-up	Vivo sem doença	32 (41,0)	20 (52,6)	52 (44,8)
	Vivo com doença	3 (3,8)	1 (2,6)	4 (3,5)
	Morte por outras causas	5 (6,4)	2 (5,3)	7 (6,0)
	Perdido de vista	25 (32,1)	4 (10,5)	29 (25,0)
	MOCA	13 (16,7)	11 (29,0)	24 (20,7)
Tempo de seguimento (meses)	N	78	38	116
	Variação	2,2 – 250,9	6,2 – 204,2	2,2 – 250,9
	Mediana	73,0	117,1	85,5
	Media (Desvio Padrão)	81,8 (66,1)	107,5 (70,6)	90,2 (68,4)

Tabela 2 - Distribuição da casuística de acordo com variáveis clínicas e de tratamento

Variável	Categoria / Medidas	Histerectomia		TOTAL
		Não	Sim	
		Freq (%) / Medidas		
Estadiamento FIGO	IIB	21 (26,9)	37 (97,4)	58 (50,0)
	IIIA	4 (5,1)	0 (0,0)	4 (3,5)
	IIIB	51 (65,4)	1 (2,6)	52 (44,8)
	IVA	2 (2,6)	0 (0,0)	2 (1,7)
Extensão da doença	Sem envolvimento da parede pélvica	24 (30,8)	37 (97,4)	60 (51,7)
	Paramétrio até parede pélvica unilateral	31 (39,7)	1 (2,6)	33 (28,5)
	Paramétrio até parede pélvica bilateral	23 (29,5)	0 (0,0)	23 (19,8)
Tipo de radioterapia	Radioterapia Externa	3 (3,8)	0 (0,0)	3 (2,6)
	Radioterapia Externa +LDR	40 (51,3)	0 (0,0)	40 (34,5)
	Radioterapia Externa +HDR	35 (44,9)	0 (0,0)	35 (30,2)
	Radioterapia pré-operatória + Histerectomia tipo II	0 (0,0)	38 (100,0)	38 (32,8)
Nível de Hemoglobina pré-tratamento	N	61	30	91
	Variação	6,8 – 14,5	5,7 – 13,4	5,7 – 14,5
	Mediana	12,0	11,9	12,0
	Media (Desvio Padrão)	11,6 (1,6)	11,2 (2,0)	11,4 (1,8)
Nível de Hemoglobina pré-tratamento	≤ 10	10 (16,4)	9 (30,0)	19 (20,9)
	> 10	51 (83,6)	21 (70,0)	72 (79,1)
Tempo entre final RT e histerectomia (dias)	N	-	37	37
	Variação	-	15 – 147	15 – 147
	Mediana	-	43,0	43,0
	Media (Desvio Padrão)	-	48,4 (26,5)	48,4 (26,5)

4.2 TRATAMENTO

Todas as pacientes submetidas à radioterapia exclusiva foram tratadas por radioterapia externa com acelerador linear de 4 ou 6 MV. A dose total liberada à pelve variou de 4000 a 7000 cGy com uma mediana de 4500 cGy (Tabela 2). As pacientes foram tratadas com uma dose de 45Gy em 25 frações de 1,8Gy em 5 semanas. A técnica empregada foi a padrão em quatro campos (anterior, posterior, lateral esquerdo e lateral direito) com limites clássicos, 67 pacientes receberam dose

complementar no parâmetro. A dose complementar no parâmetro variou de 640 a 4000cGy com uma mediana de 1600 cGy (Tabela 2). A técnica da braquiterapia utilizada variou conforme o período estudado. Até 1991 empregou-se a técnica de LDR (*low dose rate*) e partir de 1992, passou-se a utilizar a técnica de HDR (*high dose rate*). A dose total no ponto A variou de 1200 a 4209 cGy (mediana=3000 cGy; média=2694,4 cGy; dp=648,2 cGy) (Tabela 2). A radioterapia externa e LDR foram realizadas em 40(51,3%) das pacientes e Radioterapia externa e HDR em 35(44,9%), 3 pacientes (3,8%) receberam apenas radioterapia externa por não apresentarem geometria favorável à inserção da braquiterapia (Tabela 2).

Entre 1992 a 2001 37 (33,9%) pacientes com carcinoma epidermóide do colo do útero estágio IIB e 1 paciente estágio IIIB(2,6%) foram submetidas à histerectomia radical modificada com linfadenectomia pélvica após uma mediana de 4500cGy de radioterapia externa(média 4578,9; dp=468,7) e 1200cGy(média=1365,9; dp=649,9) no ponto A de HDR. Pacientes com doença residual no colo do útero ao exame histopatológico da peça operatória foram submetidas a mais duas inserções adicionais de HDR. Dose complementar no parâmetro de 900-4000 cGy (média 2045,0; dp=976,0; mediana 2100) foram realizadas após recidiva local (Tabela 2).

O tempo da radioterapia em dias variou de 34-128 (média=46,7; dp=16,5; mediana=43) para o grupo sem histerectomia e de 30-83 (média=41,8; dp=8,7; mediana=40) para o grupo com histerectomia. Em 5 casos não foi possível avaliar a data do início e término da radioterapia (Tabela 2).

Nas pacientes submetidas à compleição cirúrgica a variável resposta foi avaliada de acordo com a presença ou ausência de doença residual no espécime da

histerectomia. Desta forma, 17(44,7%) pacientes apresentaram resposta completa à radioterapia (sem doença residual) enquanto 21(55,3%) apresentaram resposta parcial (com doença residual). No grupo de pacientes com histerectomia o tempo para recorrência em meses foi de 4,6 a 60,3(média=19,5; dp=15,3; mediana=13,2) sendo que 5 (35,7%) pacientes apresentaram recorrência local, 3(21,4%) recorrência à distancia e 6(42,9%) recorrência tanto local como à distancia (Tabela 3).

No grupo sem histerectomia a variável resposta foi avaliada de acordo com a ocorrência ou não de falha terapêutica (Tabela 3). Portanto pacientes sem falhas ao tratamento foi verificado em 43(55,1%) das pacientes. A falha local que corresponde a pacientes com persistência da doença ao término da radioterapia ou progressão da doença durante a radioterapia e pacientes com recidiva local ocorreu em 19(24,4%) dos casos. A falha à distância foi verificada em 6 (7,7%) das pacientes e falha local e à distância em 10(12,8%) dos casos sem histerectomia. O tempo médio para recorrência variou de 2,1-180 meses (média=32,1; dp=44,2; mediana =14,9). O tempo para ocorrência da recidiva de 2,1 meses foi verificado em uma paciente em que a metástase cerebral foi diagnosticada 2 meses após o término da radioterapia.

A taxa de sobrevida global (SG) em 5 e 10 anos no grupo sem histerectomia foi de 81,0% e 72,8% respectivamente (Tabela 4) e a sobrevida livre de doença (SLD) (Tabela 5) foi de 69,5% em 5 anos e 67,7% em 10 anos. Este cálculo foi realizado com ressalvas, pois, houve perda de seguimento em 32,1% dos casos neste grupo. Quando se compara neste grupo pacientes sem falha terapêutica e com falha a taxa de SG em 5 anos diminui de 97,7%(sem falha) para 42,4%(com falha) e de 95,1% (sem falha) para 17,3% (com falha) em 10 anos($p<0,001$) (Figura 6) e a presença de falha terapêutica reduz a SLD em 5 anos de 100% para 16,3% e de

100% para 10,8% em 10 anos ($p < 0,001$) (Figura 7)

As Figuras 6 e 7 deverão ser consideradas com cautela, devido elevado % de perdidos de vista. Apenas objetiva mostrar a sobrevida dos casos que não realizaram histerectomia.

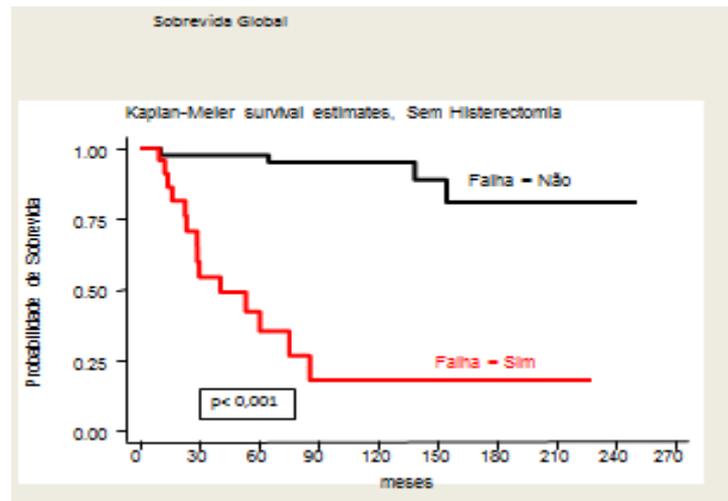


Figura 6- Curva de Sobrevida Global Falha x Sem falha

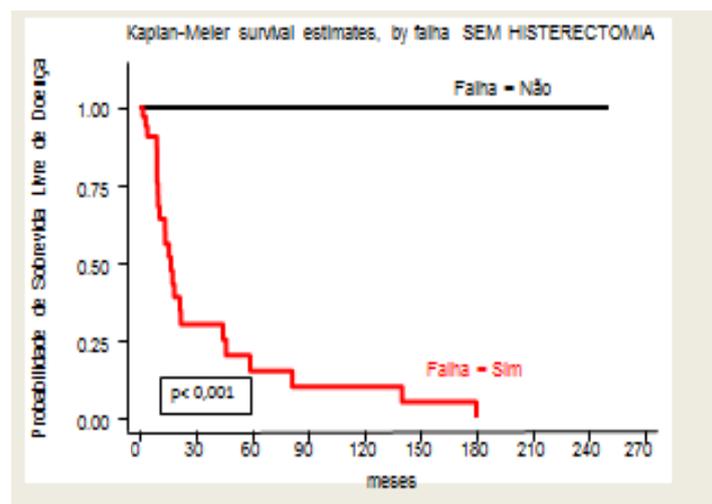


Figura 7 - Curva de Sobrevida Livre de Doença Falha x Sem falha

No grupo com histerectomia a taxa de SG em 5 e 10 anos foi de 69,7% e 66,6% respectivamente (Tabela 4) e a SLD de 65,8% e 62,9% em 5 e 10 anos (tabela 6). A taxa de SG nas pacientes com resposta completa a radioterapia neste grupo em 5 e 10 anos foi de 87,6%. Esta porcentagem diminuiu para 55,2% e 50,1% em 5 e 10 anos respectivamente quando a resposta à radioterapia foi parcial($p=0,015$) (Figura 8). No grupo de pacientes com resposta completa a SLD foi de 82,4% em 5 anos e 76,0% em 10 anos e quando a resposta foi parcial este percentual caiu para 52,4 % tanto para a SLD aos 5anos como para 10 anos ($p=0,095$) (Figura 9).

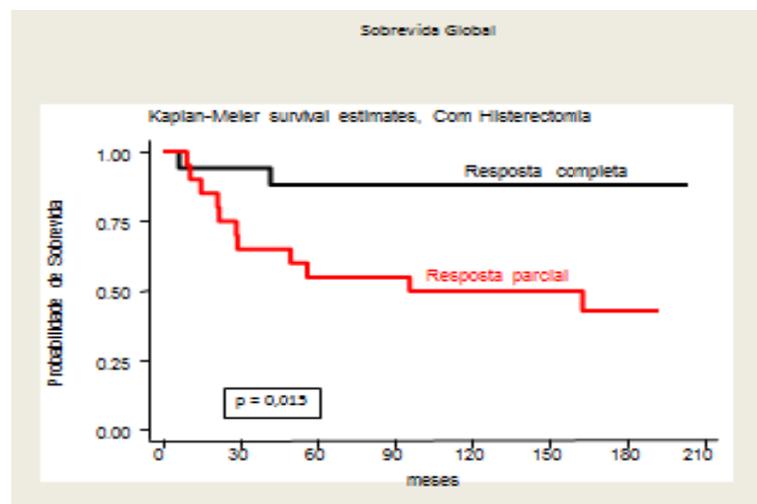


Figura 8 - Curva de Sobrevida Global Resposta Completa x Parcial

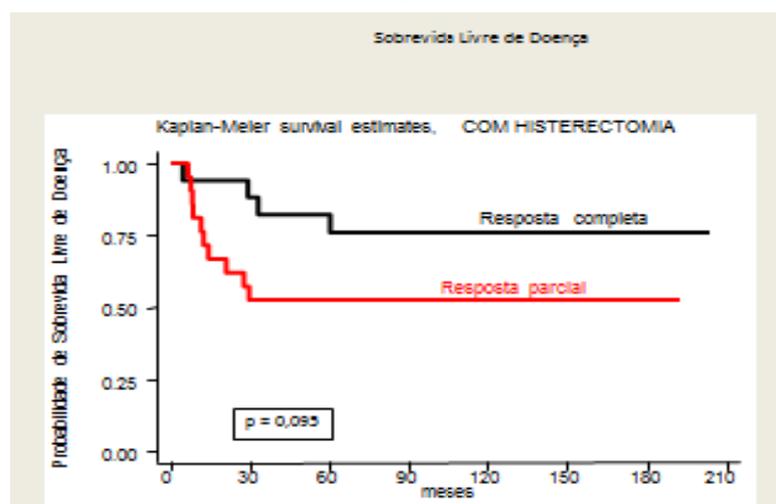


Figura 9 - Curva de Sobrevida Livre de Doença Resposta Completa x Parcial

O tempo de tratamento da radioterapia com valor de corte de 45 dias não foi significativa na SG em 5 e 10 anos quando se compara tempo < do que 45 dias e tempo de tratamento > do que 45 dias nas pacientes sem histerectomia ($p=0,259$) e nas pacientes com histerectomia ($p=0,163$) (Tabela 3). No entanto quando se analisa a SLD no grupo das pacientes com histerectomia houve uma redução significativa na SLD quando se comparou tempo < do que 45 dias e > do que 45 dias de tratamento ($p=0,008$) (Figura 10).

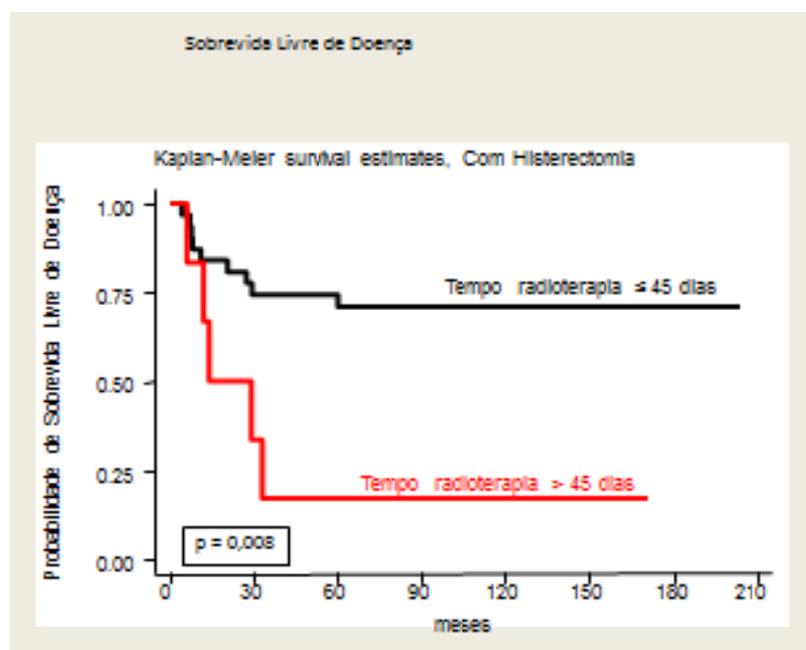


Figura 10 - Sobrevida Livre de Doença em Pacientes com Histerectomia Tempo de Radioterapia <45 dias x >45 dias

Tabela 3 - Distribuição da casuística de acordo com informações clínica e da radioterapia.

Variável	Categoria / Medidas	Histerectomia		TOTAL
		Não	Sim	
Dose total	N	78	38	116
	Varição	4000 – 7000	3600 – 7200	3600 – 7200
	Mediana	4500	4500	4500
	Media (DP)	4599,9 (386,1)	4578,9 (486,7)	4593,0 (419,7)
Dose total no ponto A	N	75	38	113
	Varição	1200 – 4209	120 – 4380	120 – 4380
	Mediana	3000	1200	2400
	Media (DP)	2694,4 (648,2)	1365,9 (649,9)	2247,7 (902,5)
Dose complementar no parâmetro	N	67	12	79
	Varição	640 – 2400	900 – 4000	640 – 4000
	Mediana	1600	2100	1600
	Media (DP)	1473,4(298,3)	2045,0 (976,0)	1560,2 (502,2)
Tempo radioterapia (dias)	N	74	37	111
	Varição	34 – 128	30 – 83	30 – 128
	Mediana	43	40	41
	Media (DP)	46,7 (16,5)	41,4 (8,7)	44,9 (14,5)
Resposta RDT	Completa	0 (0,0)	17 (44,7)	17 (14,7)
	Parcial	0 (0,0)	21 (55,3)	21 (18,1)
	N	78 (100,0)	0 (0,0)	78 (67,2)
Recorrência	Local	8 (33,3)	5 (35,7)	13 (34,2)
	A distancia	6 (25,0)	3 (21,4)	9 (23,7)
	Local e a distancia	10 (41,7)	6 (42,9)	16 (42,1)
Tempo para recorrência (meses)	N	24	14	38
	Varição	2,1 – 180,3	4,6 – 60,3	2,1 – 180,3
	Mediana	14,9	13,2	14,1
	Media (DP)	32,1 (44,2)	19,5 (15,3)	27,5 (36,5)
Falha	Sem falhas	43 (55,1)	24 (63,2)	67 (57,8)
	Falha local	19 (24,4)	5 (13,2)	24 (20,7)
	Falha distancia	6 (7,7)	3 (7,9)	9 (7,8)
	Falha local e distancia	10 (12,8)	6 (15,8)	16 (13,8)

Tabela 4 - Probabilidade de sobrevida global 5-anos e 10-anos

Variável	Categoria	Histerectomia Não		Histerectomia Sim		Total	
		5-anos	10-anos	5-anos	10-anos	5-anos	10-anos
Sobrevida	Global	81,0	72,8	69,7	66,6	76,9	70,7
Tempo de radioterapia (dias)	≤ 45	85,2	78,7	73,9	70,3	80,3	75,0
	> 45	70,1	58,0	28,6	28,6	63,3	53,2
	p-valor	0,259		0,163		0,126	
Resposta	Completa	-	-	87,6	87,6	87,6	87,6
	Parcial	-	-	55,2	50,1	55,2	50,1
	p-valor	-		0,015		0,015	
Falha	Não	97,7	95,1	-	-	97,7	95,1
	Sim	42,4	17,3	-	-	42,4	17,3
	p-valor	< 0,001		-		< 0,001	

p-valor obtido pelo teste de logrank

Tabela 5 - Probabilidade de sobrevida livre de doença 5-anos e 10-anos

Variável	Categoria	Histerectomia Não		Histerectomia Sim		Total	
		5-anos	10-anos	5-anos	10-anos	5-anos	10-anos
Sobrevida	Livre de Doença	69,5	67,7	65,8	62,9	68,2	66,0
Tempo de radioterapia (dias)	≤ 45	72,1	72,1	74,2	70,7	73,0	71,5
	> 45	63,3	57,5	16,7	16,7	52,9	48,5
	p-valor	0,552		0,008		0,070	
Resposta	Completa	-	-	82,4	76,0	82,4	76,0
	Parcial	-	-	52,4	52,4	52,4	52,4
	p-valor	-		0,095		0,095	
Falha	Não	100,0	100,0	-	-	100,0	100,0
	Sim	16,3	10,8	-	-	16,3	10,8
	p-valor	< 0,001		-		< 0,001	

p-valor obtido pelo teste de logrank

Analisando-se a distribuição das variáveis demográficas de acordo com a ocorrência de falhas dos casos sem histerectomia (Tabela 6) o único fator com significado estatístico foi a idade da paciente com uma média de idade de 56,8 anos para aquelas sem falha terapêutica e média de 48,5 anos para as pacientes com falha ($p = 0,004$). Demais variáveis como a raça, o tabagismo, o uso de anticoncepcional, a paridade, o estadiamento FIGO, a extensão da doença, o nível de hemoglobina e o tempo de radioterapia em dias não foram significativos para a ocorrência de falha terapêutica (Tabela 6).

Nas pacientes submetidas à histerectomia as variáveis demográficas como a idade, a raça, o tabagismo, o uso de anticoncepcional, a paridade, o nível de hemoglobina e o tempo de tratamento da radioterapia não tiveram significado quando se compara a resposta completa de resposta parcial (Tabela 7). O tempo de radioterapia somente mostrou tendência significativa utilizando-se o corte de < 45 dias e > do que 45 dias na SLD como já demonstrado na Figura 10.

Tabela 6 - Distribuição das variáveis demográficas e de estilo de vida de acordo com ocorrência de falhas dos casos SEM histerectomia

Variável	Categoria / Medidas	Falhas		p-valor
		Não Freq (%) / Medidas	Sim Medidas	
Idade (anos)	N	43	35	0,004 *
	Variação	32 – 78	24 – 71	
	Mediana	60	48	
	Media (Desvio Padrão)	56,8 (12,4)	48,5 (11,8)	
Raça	Branca	29 (52,7)	26 (47,3)	0,510
	Não branca	14 (60,9)	9 (39,1)	
Tabagismo	Não	24 (54,5)	20 (45,5)	0,877
	Sim ou Ex-tabagista	13 (56,5)	10 (43,5)	
Uso de anticoncepcional	Não	19 (61,3)	12 (38,7)	0,478
	Sim	7 (50,0)	7 (50,0)	
Numero de gestações	N	40	31	0,102 *
	Variação	1 – 15	1 – 17	
	Mediana	6,5	5,0	
	Media (Desvio Padrão)	7,6 (3,9)	6,0 (4,0)	
Estadiamento FIGO	Ib	13 (61,9)	8 (38,1)	0,563
	IIIa + IIIb	30 (54,6)	25 (45,4)	
Extensão da doença	Sem envolvimento da parede pélvica	14 (58,3)	10 (41,7)	0,703
	Paramétrio até parede pélvica unilateral	18 (58,1)	13 (41,9)	
	Paramétrio até parede pélvica bilateral	11 (47,8)	12 (52,2)	
Nível de Hemoglobina pré-tratamento	≤ 10	4 (40,0)	6 (60,0)	0,292 **
	> 10	32 (62,8)	19 (37,2)	
Tempo radioterapia (dias)	N	40	34	0,613 ***
	Variação	5 – 128	21 – 105	
	Mediana	42	43	
	Media (Desvio Padrão)	44,2 (17,9)	46,9 (17,3)	

p-valor obtido pelo teste de frequências do qui-quadrado

* p-valor obtido pelo teste t de Student

** p-valor obtido pelo teste exato de Fisher

*** p-valor obtido pelo teste U de Mann-Whitney

NA= não avaliável

Tabela 7 - Distribuição das variáveis demográficas e de estilo de vida de acordo com resposta dos casos com hysterectomia

Variável	Categoria / Medidas	Resposta		p-valor
		Completa Freq (%) / Medidas	Parcial Medidas	
Idade (anos)	N	17	21	0,220*
	Variação	22 - 66	30 - 67	
	Mediana	49	45	
	Media (Desvio Padrão)	49,2 (11,4)	45,0 (9,8)	
Raça	Branca	13 (48,2)	14 (51,8)	0,508
	Não branca	4 (36,4)	7 (63,6)	
Tabagismo	Não	8 (47,1)	9 (52,9)	0,866
	Sim ou Ex-tabagista	8 (50,0)	8 (50,0)	
Uso de anticoncepcional	Não	7 (58,3)	5 (41,7)	0,292
	Sim	4 (36,4)	7 (63,6)	
Numero de gestações	N	17	20	0,197 *
	Variação	1 - 11	1 - 12	
	Mediana	4,0	5,5	
	Media (Desvio Padrão)	4,6 (3,1)	5,9 (2,9)	
Estadiamento FIGO	IIB	17 (46,0)	20 (54,0)	NA
	IIIa + IIIb	0 (0,0)	1 (100,0)	
Extensão da doença	Sem envolvimento da parede pélvica	16 (44,4)	20 (55,6)	NA
	Paramétrio até parede pélvica unilateral	1 (50,0)	1 (50,0)	
	Paramétrio até parede pélvica bilateral	0 (0,0)	0 (0,0)	
Nível de Hemoglobina pré-tratamento	≤ 10	3 (33,3)	6 (66,7)	0,691**
	> 10	10 (47,6)	11 (52,4)	
Tempo radioterapia (dias)	N	16	21	0,186***
	Variação	35 - 52	30 - 83	
	Mediana	41	39	
	Media (Desvio Padrão)	41,6 (4,7)	41,3 (10,9)	

p-valor obtido pelo teste de frequências do qui-quadrado

* p-valor obtido pelo teste t de Student

** p-valor obtido pelo teste exato de Fisher

*** p-valor obtido pelo teste U de Mann-Whitney

NA= não avaliável estatisticamente

4.3 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS COX-2, EGFR, CD44V6, HIF-1 E HIF-2

A distribuição dos valores de intensidade em pixel classificados pelo Aperio para forte, moderado e fraco para expressão citoplasmática da COX-2, de membrana do EGFR e CD44v6 e nuclear da HIF-1 e HIF-2 estão descritos na Tabela 8. A expressão da COX-2 ocorreu no citoplasma assim como na interface tumor/estroma. Em relação ao EGFR a sua expressão ocorreu tanto em nível de membrana como no citoplasma para a maioria dos casos avaliados. A expressão da CD44v6 foi na membrana e a expressão da HIF-1 e HIF-2 foi nuclear com HIF-2 sendo expresso também no estroma do tumor. Todas as proteínas avaliadas estão expressas em toda área do tumor com poucas variações na imunomarcação. A proteína HIF-1 foi a que mais apresentou heterogeneidade no corte total do tumor, com algumas áreas do tumor apresentado intensidade de expressão maior do que as outras e esta expressão heterogênea pode ser explicada pela variação no fluxo sanguíneo no tecido tumoral. Exemplos dos padrões expressão para cada marcador estão demonstrados nos Anexos 3 a 7.

A análise dos marcadores foi realizada agrupando-se as amostras em pré-radioterapia (biópsias prévias ao tratamento) e pós-radioterapia (Figura 5), 3 casos no grupo sem histerectomia e 3 casos no grupo com histerectomia não apresentavam biópsias pré-radioterapia sendo resgatados somente as biópsias pós-radioterapia. Diferenças no número da casuística para cada marcador se deve a falha do processo de escaneamento de lâminas pelo Aperio Scanscope.

Todos os marcadores exceto HIF-1 apresentaram expressão forte moderado em 70-98,7% das amostras pré-radioterapia e pós-radioterapia no grupo sem histerectomia e 80-100% no grupo com histerectomia. A expressão de HIF-1 foi fraco em 100% das amostras pré e pós-radioterapia no grupo sem histerectomia e em 90-97,1% das amostras pré e pós- radioterapia no grupo com histerectomia. Expressão forte ocorreu em 18,7%, 12%, 9,5% dos casos para EGFR, CD44v6, HIF-2 respectivamente nas amostras pré-radioterapia e em 20%, 6,7%, 13,3% respectivamente nas amostras pós-radioterapia no grupo sem histerectomia (Tabela 8).

A média, a mediana e o desvio padrão da intensidade da expressão citoplasmática da COX-2, de membrana do EGFR e CD44v6, nuclear de HIF-1 e HIF-2 nas amostras pré-radioterapia e pós-radioterapia estão descritos na Tabela 9 e para melhor visualizar diferenças na expressão dos marcadores estudados entre biópsias pré-radioterapia e biópsias pós-radioterapia nos grupos sem histerectomia e com histerectomia, os valores mínimos, máximos e a mediana da intensidade de expressão em pixels foram representado no box plot para cada marcador avaliado.

Tabela 8 - Distribuição dos escores dos marcadores moleculares

Marcador Molecular	Categoria		Histerectomia		TOTAL
			Não	Sim Freq. (%)	
COX2 (pré RXT) Citoplasma	FORTE -	0 - 100	0 (0,0)	1 (2,9)	1 (0,9)
	MODERADO-	100 - 175	74 (98,7)	34 (97,1)	108 (98,2)
	FRACO-	175 - 220	1 (1,3)	0 (0,0)	1 (0,9)
COX2 (pós RXT) Citoplasma	FORTE -	0 - 100	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
	MODERADO-	100 - 175	15 (100,0)	10 (90,9)	25 (96,2)
	FRACO-	175 - 220	0 (0,0)	1 (9,1)	1 (3,8)
EGFR (pré RXT) Membrana	FORTE -	0 - 105	14 (18,7)	5 (14,7)	19 (17,4)
	MODERADO-	105 - 170	61 (81,3)	29 (85,3)	90 (82,6)
	FRACO-	170 - 200	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
EGFR (pós RXT) Membrana	FORTE -	0 - 105	3 (20,0)	0 (0,0)	3 (11,1)
	MODERADO-	105 - 170	12 (80,0)	12 (100,0)	24 (88,9)
	FRACO-	170 - 200	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
CD44v6 (pré RXT) Membrana	FORTE -	0 - 105	9 (12,0)	1 (2,9)	10 (9,2)
	MODERADO-	105 - 170	66 (88,0)	33 (97,1)	99 (90,8)
	FRACO-	170 - 200	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
CD44v6 (pós RXT) Membrana	FORTE -	0 - 105	1 (6,7)	1 (8,3)	2 (7,4)
	MODERADO-	105 - 170	14 (93,3)	10 (83,3)	24 (88,9)
	FRACO-	170 - 200	0 (0,0)	1 (8,3)	1 (3,7)
HIF 1 (pré RXT) núcleo	FORTE -	0 - 162	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
	MODERADO-	162 - 188	0 (0,0)	1 (2,9)	1 (0,9)
	FRACO-	188 - 210	75 (100,0)	34 (97,1)	109 (99,1)
HIF 1 (pós RXT) núcleo	FORTE -	0 - 162	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
	MODERADO-	162 - 188	0 (0,0)	1 (10,0)	1 (3,8)
	FRACO-	188 - 210	16 (100,0)	9 (90,0)	25 (96,2)
HIF 2 (pré RXT) núcleo	FORTE -	0 - 162	7 (9,5)	1 (2,9)	8 (7,3)
	MODERADO-	162 - 188	54 (73,0)	30 (85,7)	84 (77,1)
	FRACO-	188 - 210	13 (17,6)	4 (11,4)	17 (15,6)
HIF 2 (pós RXT) núcleo	FORTE -	0 - 162	2 (13,3)	0 (0,0)	2 (8,0)
	MODERADO-	162 - 188	11 (73,3)	8 (80,0)	19 (76,0)
	FRACO-	188 - 210	2 (13,3)	2 (20,0)	4 (16,0)

Tabela 9 - Medidas dos escores dos marcadores moleculares

Marcador Molecular	Medidas	Histerectomia		TOTAL
		Não	Sim Medidas	
COX2 (pré RXT) Citoplasma	N	75	35	110
	Variação	100,556 – 176,326	77,718 – 161,584	77,718 – 176,326
	Mediana	142,902	142,585	142,816
	Media (DP)	141,696 (14,921)	140,597 (15,594)	141,346 (15,075)
COX2 (pós RXT) Citoplasma	N	15	11	26
	Variação	118,960 – 171,198	118,960 – 183,209	118,960 – 183,209
	Mediana	146,016	158,730	150,855
	Media (DP)	145,200 (16,191)	153,558 (19,066)	148,736 (17,605)
EGFR (pré RXT) Membrana	N	75	34	109
	Variação	74,928 – 149,002	68,609 – 138,772	68,609 – 149,002
	Mediana	113,347	117,578	114,197
	Media (DP)	114,990 (13,013)	114,345 (14,155)	114,789 (13,317)
EGFR (pós RXT) Membrana	N	15	12	27
	Variação	103,784 – 144,264	105,473 – 157,667	103,784 – 157,667
	Mediana	120,378	136,840	123,199
	Media (DP)	120,218 (13,587)	133,246 (16,233)	126,008 (15,950)
CD44v6 (pré RXT) Membrana	N	75	34	109
	Variação	82,905 – 163,535	99,560 – 151,380	82,905 – 163,535
	Mediana	121,277	127,128	124,125
	Media (DP)	122,636 (15,338)	128,024 (13,272)	124,316 (14,876)
CD44v6 (pós RXT) Membrana	N	15	12	27
	Variação	104,728 – 153,184	101,652 – 170,196	101,652 – 170,196
	Mediana	129,309	148,634	137,334
	Media (DP)	129,108 (15,114)	147,295 (19,012)	137,191 (18,992)
HIF 1 (pré RXT) núcleo	N	75	35	110
	Variação	192,417 – 207,710	187,975 – 204,221	187,975 – 207,710
	Mediana	200,112	200,567	200,445
	Media (DP)	199,765 (2,608)	199,634 (3,316)	199,723 (2,837)
HIF 1 (pós RXT) núcleo	N	16	10	26
	Variação	192,545 – 203,763	183,071 – 203,264	183,071 – 203,763
	Mediana	200,314	199,667	199,957
	Media (DP)	199,673(3,459)	197,230 (6,369)	198,734 (4,822)
HIF 2 (pré RXT) núcleo	N	74	35	109
	Variação	150,645 – 200,084	157,367 – 195,757	150,645 – 200,084
	Mediana	176,293	180,772	178,063
	Media (DP)	175,891 (11,112)	178,981 (8,997)	176,883 (10,538)
HIF 2 (pós RXT) núcleo	N	15	10	25
	Variação	155,356 – 200,084	171,639 – 190,933	155,356 – 200,084
	Mediana	178,705	183,978	181,970
	Media (DP)	177,878 (11,777)	183,481 (5,275)	180,119 (9,959)

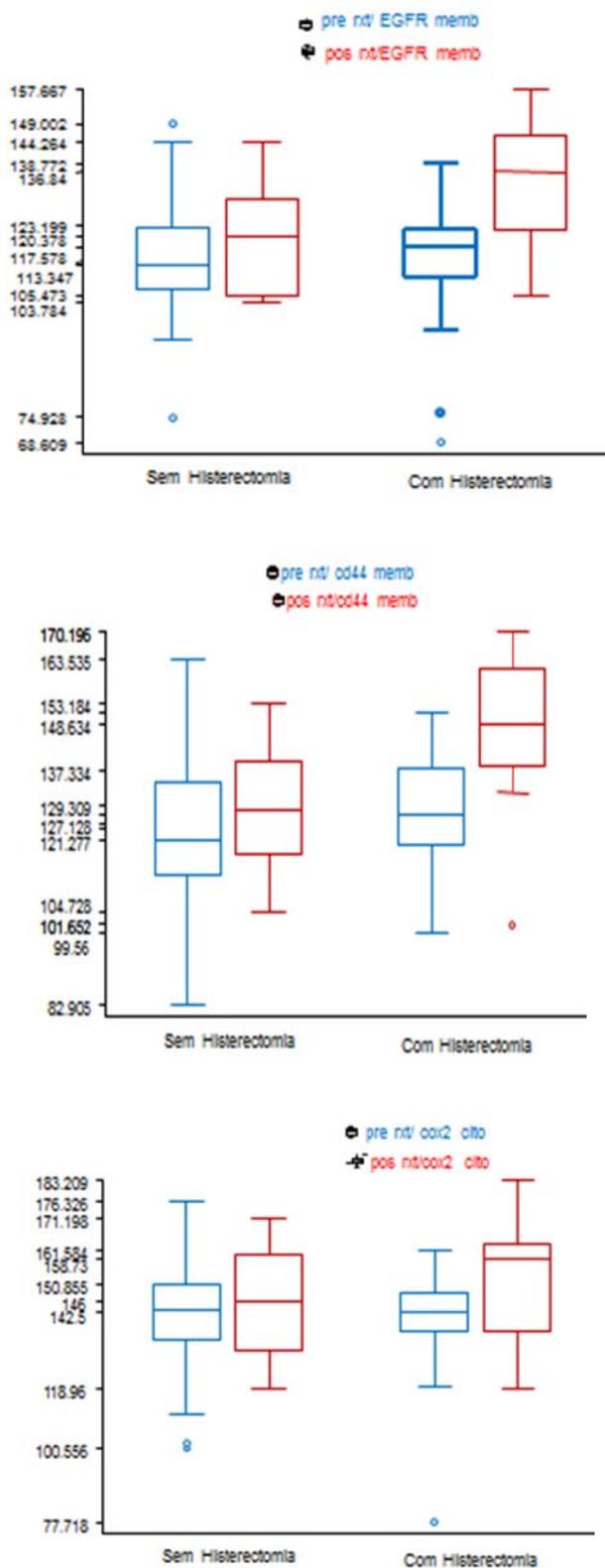


Figura 11 – Valores máximos, mínimos e mediana da intensidade de expressão em pixel EGFR, CD44v6 e COX-2 pré-radioterapia e pós-radioterapia

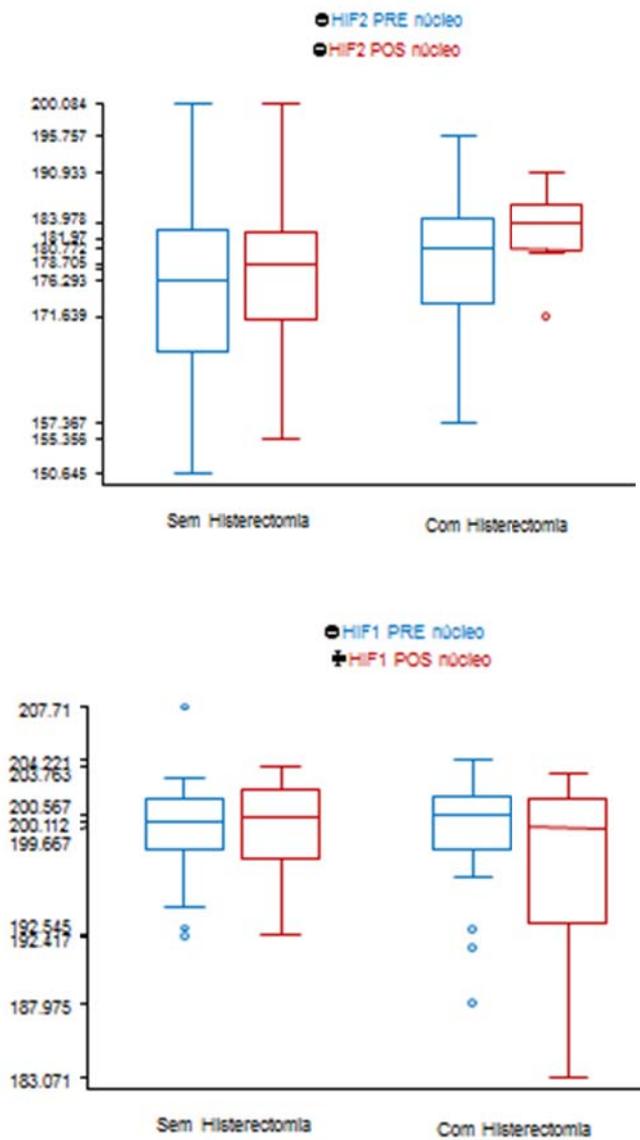


Figura 12- Valores máximos, mínimos e mediana da intensidade de expressão em pixel de HIF-2 e HIF-1 pré-radioterapia e pós-radioterapia

A média da intensidade de expressão citoplasmática da COX-2 nas amostras pré-radioterapia foi de 141,696 (dp=14,921; mediana=142,902) e nas amostras pós-radioterapia foi de 142,200 (dp= 16,191; mediana=146,016) no grupo sem histerectomia (Tabela 9). Portanto a doença persistente, a recidiva local e a distancia apresentam o mesmo padrão de expressão para COX-2 apresentado pelo tumor primário antes da radioterapia (Figura 11). No grupo que realizou histerectomia a média de intensidade de expressão da COX-2 pré-radioterapia foi de 140,597(dp=15,594; mediana= 142,585) e nas amostras pós-radioterapia foi de 153,558 (dp=19,066; mediana= 158,730) (Tabela 9). Isto demonstra que a doença residual apesar da ação da radioterapia continua a expressar a COX-2, porém de maneira menos intensa do que o tumor antes da radioterapia (Figura 11).

Em relação a expressão de membrana do EGFR a média de intensidade de expressão nas amostras pré-radioterapia foi de 114,990 (dp=13,013; mediana= 113,347) e a média de expressão nas amostras pós-radioterapia foi de 120,218(dp= 13,587; mediana= 120,378) no grupo sem histerectomia (Tabela 9). Da mesma maneira que a COX-2 o EGFR está expresso tanto no tumor primário antes da radioterapia como nas amostras com persistência da doença após radioterapia e nas recidivas local e a distância (Figura 11). No grupo tratado por compleição cirúrgica a média de intensidade do EGFR pré-radioterapia foi de 114,345(dp=14,155; mediana = 117,578) e pós-radioterapia foi de 126,008 (dp=15,950; mediana=123,199) (Tabela 9). A doença residual após radioterapia também mantém a expressão do EGFR em menor intensidade (Figura 11).

A média de intensidade de expressão de membrana do CD44v6 foi de 122,636 (dp=15,338; mediana= 121,277) nas amostras pré-radioterapia e pós-

radioterapia foi de 129,108 (dp=15,114; mediana= 129,309) no grupo sem histerectomia (Tabela 9). A intensidade de expressão do CD44v6 apesar de menos intensa é mantida nas doença persistente e na recidiva local e a distância (figura 11). Nas amostras com histerectomia a média de intensidade de expressão pré-radioterapia do CD44v6 foi de 128,024 (13,272; mediana= 127,128) e pós-radioterapia foi de 147, 295 (19,012; mediana= 148,634) (Tabela 9). A doença residual após radioterapia continua apresentando a expressão do CD44v6, porém com intensidade menor do que o tumor antes da radioterapia (Figura 11).

Assim como nos marcadores anteriores a HIF-2 também se expressa tanto nas amostras pré-radioterapia com intensidade média de 175,891(dp=11,12; mediana =176,293) como nas amostras pós-radioterapia com média de intensidade de 177,878 (dp= 11,777; mediana= 178,705) (Tabela 9). Portanto, o tumor persistente após radioterapia, a recidiva local e a distância também apresentam expressão da HIF-2 em menor intensidade quando comparado com o tumor primário antes da radioterapia (Figura 12). No grupo que realizou a histerectomia a média de intensidade de expressão da HIF-2 foi de 178,981 (dp=8,997; mediana =180,772) nas amostras pré-radioterapia e pós-radioterapia foi de 180,119(dp=9,959; mediana=181,970) (Tabela 9). Apesar do efeito do tratamento radioterápico a doença residual continua a expressar HIF-2 em menor intensidade (Figura 12).

A proteína HIF-1 teve expressão fraca em 100% dos casos em biópsia pré-radioterapia com uma média de intensidade de expressão de 199,765 (dp=2,608; mediana=200,112) assim como em amostras pós-radioterapia com média de intensidade de expressão de 199,673(dp=3,459; mediana=200,314) no grupo sem histerectomia. O tumor persistente, a recidiva local e a distância se comportam da

mesma maneira que o tumor antes da radioterapia em relação ao HIF-1(Figura 12). Em relação ao grupo com histerectomia a média de intensidade de expressão da HIF-1 foi de 199,634(dp=3,316; mediana= 200,567) em amostras pré-radioterapia e pós-radioterapia foi de 198,734 (dp=6,369; mediana=199,667). Comparando-se pré e pós-radioterapia neste grupo houve um aumento mínimo na intensidade de expressão da HIF-1 nos tumores residuais (Figura 12).

Quando se compara os grupos com falha terapêutica (N=43) e sem falha terapêutica (N=32) nas pacientes sem histerectomia, o marcador molecular que apresentou tendência significativa ($p=0,009$) foi o HIF-2 e os demais marcadores não tiveram significado estatístico. A intensidade da expressão da HIF-2 foi maior no grupo sem falha com mediana de intensidade de 172,965 (média=173,034; dp=10,255) quando comparado ao grupo com falha que apresentou mediana de 180,541 (média=179,853; dp=11,193) (Tabela 10).

No grupo de pacientes que realizaram a histerectomia a avaliação dos marcadores estudados de acordo com resposta a radioterapia demonstrou que COX-2, EGFR, CD44v6, HIF-1 e HIF-2 não apresentam significado estatístico quando se compara resposta completa de parcial netas pacientes (Tabela 11).

Quando se compara a mediana da intensidade de expressão dos marcadores em biópsias pré-radioterapia e pós-radioterapia nos casos com resposta parcial a radioterapia no grupo com histerectomia observa-se que todos os marcadores estudados continuam expressos na doença residual após radioterapia em uma intensidade menor. Analisando-se a magnitude desta associação verificamos que parece haver uma associação entre presença de doença residual e intensidade da expressão do EGFR e VD44v6, porém sem significância estatística ($p=0,018$)

(Tabela 12). O marcador molecular que teve tendência à negatização neste grupo com resposta parcial foi à expressão da COX-2 com mediana da intensidade pré-radioterapia de 144,991 e mediana pós-radioterapia de 159,934 (Tabela 11 e Figura 11).

Tabela 10 - Medidas dos escores dos marcadores moleculares pré RXT de acordo com ocorrência de falhas dos casos sem histerectomia

Marcador	Medidas	Falhas		p-valor
		Não	Sim	
COX2 (pré RXT) Citoplasma	N	43	32	0,214
	Variação	111,316 – 160,709	100,556 – 176,326	
	Mediana	142,235	146,057	
	Media (Desvio Padrão)	140,234 (13,197)	143,660 (16,986)	
EGFR (pré RXT) Membrana	N	43	32	0,086
	Variação	74,928 – 144,156	94,514 – 149,002	
	Mediana	112,422	118,750	
	Media (Desvio Padrão)	112,797 (12,953)	117,938 (12,700)	
CD44v6 (pré RXT) Membrana	N	43	32	0,118
	Variação	93,265 – 145,698	82,905 – 163,535	
	Mediana	120,622	124,247	
	Media (Desvio Padrão)	120,075 (13,600)	126,077 (17,019)	
HIF 1 (pré RXT) núcleo	N	43	32	0,289
	Variação	194,385 – 203,028	192,417 – 207,710	
	Mediana	200,703	199,720	
	Media (Desvio Padrão)	199,919 (2,393)	199,557 (2,897)	
HIF 2 (pré RXT) núcleo	N	43	31	0,009
	Variação	150,645 – 194,678	157,891 – 200,084	
	Mediana	172,965	180,541	
	Media (Desvio Padrão)	173,034 (10,255)	179,853 (11,193)	

p-valor obtido pelo teste U de Mann-Whitney

Tabela 11 - Medidas dos escores dos marcadores moleculares de acordo com resposta RXT e com histerectomia

Marcador	Medidas	Resposta		p-valor
		Completa	Parcial	
COX2 (pré RXT) Citoplasma	N	17	18	0,075
	Varição	77,718 – 158,877	123,225 – 161,584	
	Mediana	139,624	144,991	
	Media (Desvio Padrão)	135,367 (19,088)	145,537 (9,500)	
EGFR (pré RXT) Membrana	N	16	18	0,317
	Varição	68,609 – 138,772	96,703 – 130,680	
	Mediana	114,062	118,976	
	Media (Desvio Padrão)	111,471 (17,855)	116,900 (9,642)	
CD44v6 (pré RXT) Membrana	N	16	18	0,147
	Varição	99,560 – 151,380	118,244 – 147,548	
	Mediana	124,898	129,614	
	Media (Desvio Padrão)	124,079 (15,827)	131,531 (9,656)	
HIF 1 (pré RXT) núcleo	N	17	18	0,129
	Varição	192,953 – 204,221	187,975 – 202,561	
	Mediana	200,667	200,189	
	Media (Desvio Padrão)	200,451 (2,672)	198,862 (3,734)	
HIF 2 (pré RXT) núcleo	N	17	18	0,921
	Varição	157,367 – 190,902	163,309 – 195,767	
	Mediana	179,832	180,940	
	Media (Desvio Padrão)	178,120 (9,829)	179,795 (8,338)	

p-valor obtido pelo teste U de Mann-Whitney

Tabela 12 - Medidas dos escores dos marcadores moleculares de acordo com resposta RXT parcial e com histerectomia

Marcador	Medidas	Resposta Parcial		p-valor
		Medidas Pré	Medidas Pós	
COX2 Citoplasma	N	18	10	0,310
	Varição	123,225 – 161,584	118,960 – 183,209	
	Mediana	144,991	159,934	
	Media (Desvio Padrão)	145,537 (9,500)	156,321 (17,623)	
EGFR Membrana	N	18	10	0,018
	Varição	96,703 – 130,680	109,006 – 157,667	
	Mediana	118,976	140,309	
	Media (Desvio Padrão)	116,900 (9,642)	137,148 (14,332)	
CD44v6 Membrana	N	18	10	0,018
	Varição	118,244 – 147,548	101,652 – 170,196	
	Mediana	129,614	154,015	
	Media (Desvio Padrão)	131,531 (9,656)	149,778 (19,983)	
HIF 1 núcleo	N	18	10	0,612
	Varição	187,975 – 202,561	183,071 – 203,264	
	Mediana	200,189	199,666	
	Media (Desvio Padrão)	198,862 (3,734)	197,230 (6,369)	
HIF 2 núcleo	N	18	10	0,176
	Varição	163,309 – 195,767	171,639 – 190,933	
	Mediana	180,940	183,978	
	Media (Desvio Padrão)	179,795 (8,338)	183,481 (5,274)	

p-valor obtido pelo teste pareado de sinais de Wilcoxon

5 DISCUSSÃO

O estudo foi realizado com a casuística de uma única instituição reconhecida por sua excelência no tratamento oncológico e pela sua atuação na pesquisa científica através do seu curso de pós-graduação em oncologia. Apesar de não ser uma casuística muito numerosa e haver grande número de estudos realizados com EGFR, COX-2 e HIF-1 o estudo é inédito, pois não há descrição na literatura médica de trabalhos que tenham avaliado estes marcadores moleculares em material de doença residual e recidiva local após realização da radioterapia e principalmente em biópsias de metástase à distância. Além disto, não há descrição de trabalhos que tenham feito hipótese de que a presença de doença residual, falha local ou à distância nos carcinomas de colo do útero localmente avançado tratados com radioterapia possam estar relacionados com presença de células tronco-tumorais avaliados pela expressão do marcador de superfície celular CD44 variante v6 e nem a correlação de HIF-2 com resposta parcial ou falha terapêutica após radioterapia.

Os resultados da imunoistoquímica dependem de fatores pré-analíticos (fixação, processamento de tecidos), analíticos (métodos de reações) e pós-analíticos (interpretação dos resultados). Para reduzir o problema de coloração inespecífica que pode ocorrer com os sistemas de detecção de estreptavidina-biotina devido a biotina endógena e garantir sinal imunoistoquímico mais intenso foi utilizado o sistema de visualização poliméricos livres de biotina (ROCHA et al. 2009b). Na fase de interpretação dos resultados a análise automatizada através do Aperio Scanscope foi realizada para ajudar a eliminar a variabilidade inerente do escore baseado no olho

humano permitindo distinguir pequenas diferenças na intensidade de coloração (ROCHA et al. 2009a).

Das variáveis demográficas consideradas somente a mediana da idade (48 anos) teve significado na ocorrência de falha terapêutica no grupo sem histerectomia. Este mesmo resultado foi reportado por SAIBISHKUMAR et al. (2006) que avaliaram 556 pacientes com estágio IIIB da FIGO tratadas com radioterapia exclusiva. Nesta série a variável idade teve impacto no controle pélvico da doença, pacientes com idade superior a 50 anos apresentaram maior taxa de resposta quando comparados a pacientes com idade menor do que 50 anos. A variável idade também apresentou significância estatística em um trabalho que avaliou 983 pacientes estágio IIIB tratados por radioterapia exclusiva, demonstrando que a sobrevida doença específica foi pior para as pacientes que apresentavam idade menor do que 40 anos (LOGSDON e EIFEL 1999).

Nas pacientes tratadas com radioterapia e quimioterapia concomitante o fator idade permaneceu como variável prognóstica nas pacientes com câncer do colo do útero com estágio avançado, onde mulheres com 51-60 anos apresentaram melhor prognóstico quando comparado a aquelas com idade menor do que 40 anos (MONK et al. 2006).

A presença da anemia e ou hipóxia foi correlacionado com pior prognóstico, no entanto os mecanismos desta associação não são bem compreendidos (FYLES et al. 2000). Os níveis de hemoglobina antes do tratamento não influenciaram a ocorrência da falha terapêutica ou resposta parcial a radioterapia nos grupos de pacientes avaliadas por este estudo. Uma revisão retrospectiva de 494 pacientes tratadas por dois ensaios prospectivos do Gynecology Oncology Group (GOG)

demonstraram que nas pacientes com câncer do colo do útero estágio avançado tratado com radioterapia e quimioterapia concomitante o nível de hemoglobina pré-tratamento não influenciou a resposta terapêutica quando comparado com o nível de hemoglobina avaliado durante o tratamento. O nível de hemoglobina ao final do tratamento foi mais preditivo de recorrência e sobrevida (WINTER et al. 2004).

A duração mediana da radioterapia nas pacientes incluídas neste estudo foi de 43 dias para o grupo sem histerectomia e 40 para o grupo com histerectomia e desta forma o tempo de radioterapia não influenciou a ocorrência de falha terapêutica ou resposta parcial a radioterapia, porém quando esta variável foi analisada com cortes de 45 dias houve influência do tempo de tratamento >45 dias na SLD em pacientes com histerectomia. PEREZ et al. (1995) demonstraram que em pacientes com estádios IB e IIB, o risco de recidivas pélvicas foi de 5% e 20%, respectivamente, quando a duração da radioterapia foi de até 49 dias, e de 36% a 34% respectivamente, quando a duração foi superior a 63 dias. Da mesma maneira estes achados foram notados em um ensaio clínico prospectivo do GOG avaliando-se dois esquemas de quimioterapia (Hidroxiuréia x Cisplatina e 5 Fluoracil) adicionados a radioterapia. Neste estudo a duração média da radioterapia nos estádio II foi de 51 dias para 16 % das pacientes e 53 dias para 45% das pacientes com estádio III/IV. O tempo prolongado da radioterapia foi associado com pior prognóstico (SLD, hazard ratio: 1,98 p=0,012 e SG, hazard ratio: 1,88 p=0,024) (MONK et al. 2006). Este fato também foi demonstrado por instituições brasileiras demonstrando que o tempo de tratamento superior a 50 dias foi a única variável estatisticamente significativa para a sobrevida global e controle local do tumor (FERRIGNO et al. 2001). Portanto preconiza-se limitar a duração total da radioterapia em menos de 56 dias (NOVAES

et al. 2008).

As taxas de sobrevida para pacientes com doença localmente avançada variam de 50- 70% para os estadios IIB, 30-50% para os estadios III e 5-15% para os estadios IV (DATTA e AGRAWAL 2006; NAKANO et al. 2010). Uma das maiores causas de morte para doença localmente avançada é a persistência ou doença recorrente na pelve. As análises dos padrões de falha seguida de radioterapia mostrou taxas de recorrência local de 50-70% das pacientes tratadas e esta proporção aumenta com aumento do volume tumoral (NAKANO et al. 2010).

No presente estudo pacientes tratadas no grupo sem histerectomia a ocorrência de falha terapêutica foi fator prognóstico importante com redução significativa da taxa de sobrevida livre de doença em 5 e 10 anos (Figuras 8 e 9). E no grupo tratado com histerectomia a presença de doença residual impactou tanto na sobrevida global como na sobrevida livre de doença (Figuras 10 e 11). No estudo de SAIBISHKUMAR et al. (2006) de 556 pacientes com estadio IIIB tratadas com radioterapia exclusiva, 393 (70,7%) não apresentavam doença grosseira ao exame clínico e este grupo de pacientes apresentou melhor controle local da doença pélvica em 5 anos (76,5%) do que aquelas que apresentavam doença grosseira ao término da radioterapia (54,6%). Em termos de sobrevida global e livre de doença o grupo sem doença grosseira apresentou taxas de 60,5 e 62,6% respectivamente contra 31,9% de sobrevida global e 33,7% de sobrevida livre de doença no grupo com doença grosseira.

Com intuito de identificar marcadores moleculares que pudessem identificar grupos de pacientes com falha e sem falha terapêutica previamente ao tratamento, analisou-se por imunohistoquímica a expressão da COX-2, EGFR, CD44v6, HIF-1 e

HIF-2 nas amostras obtidas de biópsias antes do início da radioterapia. Os resultados deste trabalho demonstram que a expressão destas proteínas não está correlacionada com a ocorrência de falha terapêutica.

A expressão da COX-2 nos estádios avançados do câncer do colo do útero varia de 18 a 51% e em todos os trabalhos publicados houve correlação positiva entre expressão da COX-2 e pior resposta a radioterapia (KIM et al. 2002; FERRANDINA et al. 2002, 2003; ISHIKAWA et al. 2007; ADIMI et al. 2011). O número de pacientes incluídas nestes estudos variou de 33 a 91 pacientes. Um destes estudos demonstrou que em pacientes submetidas à quimioterapia neoadjuvante as pacientes não responsivas apresentavam forte positividade da COX-2 em comparação com pacientes que obtiveram resposta completa (FERRANDINA et al. 2002).

O presente estudo demonstrou resultados que contrariam os resultados da literatura com alta porcentagem de expressão da COX-2 de forma homogênea em todos os cortes histológicos avaliados e sem relação com resposta terapêutica. Portanto a possível importância clínica da COX-2 no câncer do colo do útero precisa ser mais bem avaliada.

No câncer do colo do útero a expressão do EGFR varia de 6% a 90% e sua expressão como biomarcador de comportamento clínico e resposta a terapia é controversa. Metade dos estudos demonstra correlação com progressão da doença, pior prognóstico e pior resposta terapêutica. Contudo a outra metade dos estudos não encontrou nenhuma das correlações (SOONTHORRMTHUM et al. 2011). Este estudo demonstra altas taxas de expressão do EGFR nos estádios II e III do câncer tratados pela radioterapia, porém sem correlação com falha terapêutica.

A análise da expressão de variantes da CD44 em câncer do colo do útero

avanzado foi realizada por KAINZ et al. (1995b) e este trabalho avaliando 40 biópsias pré-radioterapia demonstrou que as variantes v5, v6, v7-8 foram detectados em 90%, 55%, e 15 % respectivamente. A expressão da variante v6 ocorreu na membrana das células de forma homogênea nos tumores que foram considerados positivos para a expressão. A sobrevivência global em 5 anos nas pacientes negativas para a variante v6 foi de 71 % e nas pacientes com expressão positiva foi de 20%. A variante v5 não apresentou significado prognóstico. As pacientes com e sem expressão de CD44v7-8 apresentaram taxas de sobrevivência em 5 anos de 30% e 48% respectivamente. Nas pacientes com estádios iniciais tratados por cirurgia analisando-se as variantes v5, v6, v7-8, somente a expressão da variante v6 foi considerada fator prognóstico sendo correlacionada com metástase linfonodal e pior sobrevivência livre de doença e global em 5 anos (KAINZ et al. 1995a; SPEISER et al. 1997).

Trabalhos mais recentes com expressão da variante v6 nos estádios iniciais do câncer cervical não encontraram significado prognóstico (BOUDA et al. 2005; HORN et al. 2005). A porcentagem de positividade encontrada foi de 51% em 178 pacientes (BOUDA et al. 2005) e HORN et al. (2005) quantificaram a presença da variante v6 pela técnica de ELISA. No presente estudo a expressão da variante v6 ocorreu em 90,8% das amostras pré-radioterapia e a positividade para esta variante não foi correlacionado com falha terapêutica.

Nenhum trabalho da literatura correlacionou a positividade para a variante CD44v6 com presença de células-tronco tumorais no câncer do colo do útero. Devido aos resultados obtidos neste trabalho não se pode inferir que as células CD44v6 positivas representem células tronco-tumorais como demonstrado por JONG

et al. (2010) em pacientes com tumor de laringe inicial tratados com radioterapia onde a positividade para CD44 foi o único fator biológico correlacionado com controle local do tumor.

A expressão nuclear da HIF-1 foi encontrada em 45 a 94 % das amostras avaliadas em outros estudos (BURRI et al. 2003; BACHTIARY et al. 2003; ISHIKAWA et al. 2004; DELLAS et al. 2008). O número de pacientes incluídas em cada estudo variou de 38 a 73 pacientes. Em dois estudos houve a inclusão de estádios iniciais e tipo histológicos diferentes, com inclusão de adenocarcinomas e a genotipagem do HPV também foi avaliada nestes estudos. BACHTIARY et al. (2003) demonstraram que dos casos considerados positivos para expressão de HIF-1 23,9 % apresentavam fraca expressão, 37,3% expressão moderada e 10,4% forte expressão. A expressão forte / moderada da HIF-1 foi associada com resposta parcial a radioterapia e menor sobrevida livre de doença e global. A presença do HPV não foi correlacionada com a expressão de HIF-1 em nenhum dos estudos. Todos os demais trabalhos citados também relataram correlação da expressão forte/moderada da HIF-1 com menor sobrevida nas pacientes com doença localmente avançada.

O presente estudo apresentou resultados contrários aos da literatura descrita, demonstrando fraca expressão em todas as amostras avaliadas e esta expressão não teve correlação com falha terapêutica. Apesar de todos os trabalhos avaliarem uma pequena fração do tumor obtido por biópsias, pode ser que neste trabalho em questão a área de hipóxia não tenha sido representada na biópsia obtida.

Em toda a literatura pesquisada foi encontrado somente dois trabalhos que analisaram a expressão da HIF-2 nos carcinomas de colo do útero estágio avançado (KAWANAKA et al. 2008; KIM et al. 2011). No trabalho de KAWANAKA et al.

(2008) foram avaliados 73 pacientes tratadas por radioterapia e incluiu todos os estádios da doença (I a IVB). Apenas 5 pacientes apresentaram expressão fraca nuclear da HIF-2 e analisando a expressão da HIF-2 em macrófagos que infiltram o tumor identificado pela expressão de CD68, encontrou expressão citoplasmática da HIF-2 com intensidade maior nestas células do que nas células tumorais. Este trabalho concluiu que a porcentagem de positividade da HIF-2 nos macrófagos foi correlacionada com a sobrevida livre de doença.

KIM et al. (2011) avaliaram a expressão da HIF-2 em 36 casos de câncer do colo do útero avançado estágio IIB e IVa separando-se em grupos com recidiva (N=12) e sem recidiva (N= 24). O padrão de expressão da proteína HIF-2 foi citoplasmática e a intensidade de expressão foi levemente maior no grupo com recidiva, porém sem significado prognóstico. No entanto estes autores encontraram que quanto maior é o número de áreas com positividade da HIF-2 menor é a sobrevida livre de doença nas pacientes com recidiva da doença, concluindo que provavelmente áreas com positividade da HIF-2 correspondam a áreas de hipóxia menos sensíveis a radioterapia.

Este trabalho demonstrou que a HIF-2 está expressa na maioria dos casos avaliados com intensidade forte moderada no núcleo das células. Os casos sem falha terapêutica apresentaram mediana da intensidade de expressão menor do que os casos com falha e este resultado teve uma tendência estatística significativa ($p=0,0009$). Portanto HIF-2 parece ser marcador de resposta completa a radioterapia por este resultado.

Complexos mecanismos de regulação da expressão de HIF-1 e HIF-2 demonstram atividades diferenciais das duas proteínas e dependendo do contexto do

microambiente tumoral estudado pode haver predomínio de um sobre o outro (KEITH et al. 2011). Verificou-se também que o acúmulo das proteínas HIF-1 e HIF-2 ocorrem em diferentes concentrações do oxigênio. A proteína HIF-2 é estabilizada a moderada concentração do oxigênio (2-5%) enquanto que o acúmulo de HIF-1 ocorre somente a baixas concentrações do oxigênio (0-2%) nas células do neuroblastoma (KEITH et al. 2011).

O predomínio da expressão da HIF-2 sobre a HIF-1 demonstrada por este trabalho pode ter ocorrido pelo fato de células tumorais mais superficiais e melhor oxigenada do que as regiões centrais do tumor apresentem maior expressão da HIF-2 do que a HIF-1 . O fator de transcrição HIF-2 continua como um enigma para os pesquisadores, pois existem diferentes papéis da HIF-2 no desenvolvimento do tumor, indicando que terapeuticamente esta proteína alvo pode não ser simples e efeitos contexto dependente devem ser levados em conta (SWAMI 2010).

Macrófagos associados ao tumor migram através da região de hipóxia e parecem estar associados com a progressão do tumor. A expressão aumentada da HIF-2 nos macrófagos foi correlacionada com tumores de alto grau e pior prognóstico. A deleção do HIF-2 em ratos nos modelos de inflamação associado ao carcinoma hepatocelular ou colite associada ao câncer a deleção do HIF-2 nos macrófagos levou a uma diminuição da infiltração destas células no tumor e retardou o crescimento tumoral, sugerindo que HIF-2 é necessária para eficiente recrutamento de macrófagos para o tumor e de que estas células inflamatórias possuem função na progressão do tumor (IMTIYAZ et al. 2010).

MAZUMDAR et al. (2010) relataram que HIF-2 também pode ter função supressora de tumor. Estes autores deletaram HIF-2 em ratos nos modelos de câncer

de pulmão com mutação do KRAS e encontrou que a perda do HIF-2 promoveu a progressão tumoral. HIF-2 pode regular genes supressores de tumor e há relatos de que a expressão destes genes inibe a sinalização do AKT e observou-se que após deleção do HIF-2 ocorre aumento dos níveis de AKT ativado, sugerido que esta via é importante para a proliferação de células com deleção do HIF-2.

A análise das pacientes com falha terapêutica demonstra que a recidiva local e metástase à distância apresentam as mesmas características do tumor primário, expressando de forma semelhante os marcadores moleculares avaliados (Anexos 8 a 11). Portanto apesar da expressão destas proteínas não terem significado prognóstico elas podem ter um significado biológico para células tumorais no processo de metástase à distância e na recorrência do tumor. Talvez o microambiente tumoral contendo EGFR, COX-2, CD44v6 e HIF-2 no carcinoma do colo do útero sejam propícios à expansão das células tronco-tumorais e a persistência destas células após irradiação possam causar a recidiva e a metástase a distância.

Outra constatação deste trabalho é a de que no grupo de pacientes submetidas à histerectomia e com doença residual na peça cirúrgica, a expressão das proteínas avaliadas persistiu após o tratamento radioterápico e esta ocorrência foi mais significativa quando se tratou da expressão do EGFR e CD44v6. A via de sinalização do EGFR está relacionada com os mecanismos de radioresistência das células tumorais como descrito previamente e existem evidências de que EGFR e CD44 estão agrupados formando uma unidade funcional na membrana celular para potencializar o processo de sinalização do EGFR e que a atividade do EGFR depende da ativação do receptor CD44 (PÁLYI-KREKK et al. 2008). Este estudo demonstra que estas duas proteínas apresentam o mesmo padrão de expressão nas amostras

avaliadas (Box plot 2 e 3). Este achado confirmam os resultados de WOBUS et al. (2001) que demonstraram que EGFR e CD44 estão co-localizados nas células do câncer do colo do útero. Portanto esta associação pode contribuir para o mecanismo de resistência à radioterapia embora não se tenha demonstrado significância estatística entre a expressão destas proteínas e resposta terapêutica.

As limitações deste estudo residem no fato de ter sido retrospectivo e pelo fato de o material obtido de biópsias pré-radioterapia e pós-radioterapia corresponderem somente a uma pequena parte do tumor. Portanto, o tumor não foi avaliado na sua totalidade e provavelmente áreas com hipóxia tecidual situados em região central do tumor podem não ter sido representadas nas amostras do estudo. Como os espécimes de biópsia apresentam tamanhos que vão de 2 a 4 mm optou-se por analisar as amostras por corte totais e não pelo TMA (tissue microarray) para não correr o risco de perder mais amostras durante a feitura do TMA. Da mesma maneira a genotipagem do HPV não foi realizado dando prioridade ao estudo das proteínas avaliadas, com risco de não ter material suficiente para análise.

Como as paciente incluídas na casuística ingressaram no período de 1990 a 2001 a adição da quimioterapia não foi realizada na maioria das pacientes, pois esta modalidade terapêutica foi instituída após o ano de 1999, quando foram publicados os ensaios demonstrando melhores resultados com a combinação da quimioterapia e radioterapia quando comparadas com radioterapia exclusiva.

6 CONCLUSÃO

- 1 Nossos resultados indicam valor preditivo de resposta à radioterapia apenas do HIF-2, que foi mais expresso em casos sem falha terapêutica, nas pacientes tratadas por radioterapia exclusiva.
- 2 Houve aumento significativo de expressão imunohistoquímica apenas de EGFR e CD44v6 das amostras pós- radioterapia na doença residual, quando comparadas às amostras iniciais; este achado pode indicar que nesses casos, esses dois marcadores estejam relacionados de alguma forma à resistência do tumor à radioterapia.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdulkarin B, Sabri S, Deutsch E, et al. Antiviral agent Cidofovir restores p53 function and enhances radiosensitivity in HPV-associated cancers. **Oncogene** 2002; 21:2334-46.

Adimi P, Steffensen KD, Schledermann D, Rasmussem ER, Jakobsen A. The prognostic importance of EGFR and COX-2 expression in cervix cancer stages IIB-IVA. **J Cancer Ther** 2011; 2:9-15.

Akerman GS, Tolleson WH, Brown KL, et al. Human Papillomavirus type 16 E6 and E7 cooperate to increase epidermal growth factor receptor (EGFR) mRNA levels, overcoming mechanisms by which excessive EGFR signaling shortens the life span of normal human keratinocytes. **Cancer Res** 2001; 61:3837-43.

Bachtiary B, Schindl M, Potter R, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α indicates diminished response to radiotherapy and unfavorable prognosis in patients receiving radiotherapy for cervical cancer. **Clin Cancer Res** 2003; 9:2234-40.

Badaracco G, Savarese A, Micheli A, et al. Persistent of HPV after radio-chemotherapy in locally cervical cancer. **Oncol Rep** 2010; 23:1093-9.

Barcellos-Hoff MH, Park C, Wright EG. Radiation and microenvironment-tumorigenesis and therapy. **Nat Rev Cancer** 2005; 5:867-75.

Baumann M, Krause M, Hill R. Exploring the role of cancer stem cells in radioresistance. **Nat Rev Cancer** 2008; 8:545-54.

Baumann M, Krause M. CD44: a cancer stem cell- related biomarker with predictive potential for radiotherapy. **Clin Cancer Res** 2010; 16:5091-3.

Belatti F, Gasparri ML, Beneditti-Panici P. Is there a real standard for stage IVa cervical cancer? **Gynecol Oncol** 2011; 123:174-5.

Boccardo E, Villa LL. Viral origins of human cancer. **Curr Med Chem** 2007; 14:2526-39.

Bomken S, Fiser K, Heidenreich O, Vormoor J. Understanding the cancer stem cell. **Br J Cancer** 2010; 103:439-45.

Bouda J, Boudova L, Hes O, et al. CD44v6 as a prognostic factor in cervical carcinoma FIGO Stage IB. **Anticancer Res** 2005; 25:617-22.

Bristow RG, Hill RP. Molecular and cellular basis of radiotherapy. In Tannock IF, Hill RP, Bristow RG, Harrington L, editors. 4th ed. **The basic science of oncology**. Canada: McGraw-Hill Companies; 2005. p.261-84.

Bristow RG, Hill R. Hypoxia and metabolism. Hypoxia, DNA repair and genetic instability. **Nat Rev Cancer** 2008; 8:180-92.

Chemoradiotherapy for Cervical Cancer Meta-Analysis Collaboration, Vale C, Tierney JF, et al. Reducing uncertainties about the effects of chemoradiotherapy for cervical cancer: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 18 randomized trials. **J Clin Oncol** 2008; 26:5802-12.

Choy H, Milas L. Enhancing radiotherapy with cyclooxygenase-2 enzyme inhibitors: a rational advance? **J Natl Cancer Inst** 2003; 95:1440-52.

Coleman CN. Clinical application of molecular biology in radiation oncology. **Semin Radiat Oncol** 1996; 6:245-9.

Covello KL, Kehler J, Yu H, et al. HIF-2 α regulates OCT-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth. **Genes Dev** 2006; 20:557-68.

Datta NR, Agrawal S. Does the evidence support the use of concurrent chemoradiotherapy as a standard in management of locally advanced cancer of the cervix, especially in developing countries? **Clin Oncol (R Coll Radiol)** 2006; 18:306-12.

Datta NR, Kumar P, Singh S, Gupta D, Srivastava A, Dhole T. Does pretreatment human papillomavirus (HPV) titer predict radiation response and survival outcomes in cancer cervix? A pilot study. **Gynecol Oncol** 2006; 103:100-5.

De Jong MC, Pramana J, van der Wal JE, et al. CD44 expression predicts local recurrence after radiotherapy in larynx cancer. **Clin Cancer Res** 2010; 16:5329-38.

Debucquoy A, Machiels J, McBride WH, Haisternans K. Integration of epidermal growth factor receptor inhibitors with preoperative chemoradiation. **Clin Cancer Res** 2010; 16:2709-14.

Dellas K, Bacher M, Pigorsch SU, et al. Prognostic impact of HIF-1 α expression in patients with definitive radiotherapy for cervical cancer. **Strahlenther Onkol** 2008; 184:169-74.

Doobar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. **Clin Sci (Lond)** 2006; 110:525-41.

Eifel P. Radiation therapy. In: Berek JS, Hacker NF, editors. **Gynaecologic oncology**. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2010. p.83-119.

Farley J, Sill MW, Birrer M, et al. Phase II study of cisplatin plus cetuximab in advanced, recurrent, and previously treated cancer of the cervix and evaluation of epidermal growth factor receptor immunohistochemical expression: A Gynaecologic Oncology Group study. **Gynecol Oncol** 2011; 121:303-8.

Feng D, Peng C, Li C, et al. Identification and characterization of cancer stem-like cells from primary carcinoma of the cervix uteri. **Oncol Rep** 2009; 22:1129-34.

Ferrandina G, Lauriola L, Distefano MG, et al. Increased cyclooxygenase-2 expression is associated with chemotherapy resistance and poor survival in cervical cancer patients. **J Clin Oncol** 2002; 20:973-81.

Ferrandina G, Ranelletti FO, Legge F, et al. Cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in locally advanced cervical cancer patients undergoing chemoradiation plus surgery. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2003; 55:21-7.

Ferrigno R, dos Santos Novaes PE, Pellizzon AC, et al. High-dose-rate brachytherapy in the treatment of uterine cervix cancer. Analysis of dose effectiveness and late complications. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2001; 50:1123-35.

Fyles AW, Milosevic M, Pintilie M, Syed A, Hill RP. Anaemia, hypoxia and transfusion in patients with cervix cancer a review. **Radiother Oncol** 2000; 57:13-9.

Gaffney DK, Winter K, Dicker AP, et al. Efficacy and patterns of failure for locally advanced cancer of the cervix treated with celebrex (celecoxib) and chemoradiotherapy in RTOG 0128. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2007; 69:111-7.

Goldthwaite CA. **Are stem cells involved in cancer?** 2011. Available at <URL:http://stemcells.nih.gov/info/regenerative_medicine/2006chapter9> [2012 maio 12]

Hacker NF, Friedlander M. Cervical cancer. In: Berek JS, Hacker NF, editors. **Gynaecologic oncology**. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2010. p.341-95.

Harrington K, Jankowska P, Hingorani M. Molecular biology for the radiation oncologist: the 5 Rs of radiobiology meet the hallmarks of cancer. **Clin Oncol (R Coll Radiol)** 2007; 19:561-71.

Heddeston JM, Li Z, Latia JD, Bao S, Hjelmeland AB, Rich JN. Hypoxia inducible factors in cancer stem cells. **Br J Cancer** 2010; 102:789-95.

Heider K, Kuthan H, Stehle G, Munzert G. CD44v6: a target for antibody-based cancer therapy. **Cancer Immunol Immunother** 2004; 53:567-79.

Hellner K, Münger K. Human papillomaviruses as therapeutic targets in human cancer. **J Clin Oncol** 2011; 29:1785-94.

Hill RP, Marie-Egyptienne DT, Hedley D. Cancer stem cells, hypoxia and metastasis. **Semin Radiat Oncol** 2009; 19:106-11.

Hittelman WN, Liao Y, Wang L, Milas L. Are cancer stem cell radioresistant? **Future Oncol** 2010; 6:1563-76.

Horn LC, Raptis G, Fischer U, et al. CD44-v6 concentrations in carcinoma of the uterine cervix: lack of prognostic significance. **Arch Gynecol Obstet** 2005; 273:104-6.

Imtiyaz HZ; Willians EP, Hickey MM, et al. Hypoxia inducible factor 2 α regulates macrophage function in mouse models of acute end tumor inflammation. **J Clin Invest** 2010; 120:2699-714.

Ishikawa H, Sakurai H, Hasegawa M, et al. Expression of hypoxic-inducible factor 1 α predicts metastasis-free survival after radiation therapy alone in stage IIIB cervical squamous cell carcinoma. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2004; 60:513-21.

Ishikawa H, Ohno T, Kato S, et al. Cox-2 expression inhibits radiation-induced apoptosis. **Nat Rev Clin Oncol** 2007; 4:143-4.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. **CA Cancer J Clin** 2011; 61:69-90.

Jordan CT, Guzman ML, Noble M. Cancer stem cells. **N Engl J Med** 2006; 355:1253-61.

Kainz CH, Kohlberger P, Sliutz G, et al. Splice variants of CD44 in human cervical cancer stage IB to IIB. **Ginecol Oncol** 1995a; 57:383-7.

Kainz CH, Kohlberger P, Tempfer C, et al. Prognostic value of CD44 splice variants in human stage III cervical cancer. **Eur J Cancer** 1995b; 31A:1706-9.

Kawanaka T, Kubo A, Ikushima H, Sano T, Takegawa Y, Nishitam H. Prognostic significance of HIF-2 alpha expression on tumor infiltrating macrophages in patients with uterine cervical cancer undergoing radiotherapy. **J Med Invest** 2008; 55:78-86.

Keith B, Simon MC. Hypoxia-inducible factors, stem cells, and cancer. **Cell** 2007; 129:465-72.

Keith B, Jonson RS, Simon MC. HIF-1 α and HIF-2 α : sibling rivalry in hypoxia tumor growth and progression. **Nat Rev Cancer** 2011; 12:9-22.

Kim JJ, Tannock IF. Repopulation of cancer cells during therapy: an important cause of treatment failure. **Nat Rev Cancer** 2005; 5:516-25.

Kim MK, Kim HS, Kim SH, et al. Human papillomavirus type 16 E5 oncoprotein as a new target for cervical cancer treatment. **Biochem Pharmacol** 2010; 80:1930-5.

Kim MK, Kim TJ, Sung CO, et al. Clinical significance of HIF-2 α immunostaining area in radioresistant cervical cancer. **J Gynecol Oncol** 2011; 22:44-8.

Kim YB, Kim GE, Cho NH, et al. Overexpression of cyclooxygenase -2 is associated with a poor prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the uterine cervix treated with radiation and concurrent chemotherapy. **Cancer** 2002; 95:531-9.

Kim YB, Lee IJ, Kim SY, et al. Tumor heterogeneity of FIGO stage III carcinoma of the uterine cervix. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2009; 75:1323-8.

Koch U, Krause M, Baumann M. Cancer Stem Cell at the crossroads of current cancer therapy failures- Radiation oncology perspective. **Semin Cancer Biol** 2010; 20:116-24.

Koukouraks MI, Bentzen SM, Giatromanolaki A, et al. Endogenous markers of two separate hypoxia response pathways (hypoxia inducible factor 2 and carbonic anhydrase 9) are associated with radiotherapy failure in head and neck cancer patients recruited in the CHART randomized trial. **J Clin Oncol** 2006; 24:727-5.

Kunos C, Ali S, Abdul-Karim FW, Stehman FB, Waggoner S. Posttherapy residual disease associates with long-term survival after chemoradiation for bulk stage 1b cervical carcinoma: a Gynecologic Oncology Group study. **Am J Obstet Gynecol** 2010; 203:351.e1-8.

Logsdon MD, Eifel PJ. Figo IIIB squamous cell carcinoma of the cervix: analysis prognostic factors emphasizing the balance between external beam and intracavitary radiation therapy. **Int J Radiat Biol Phys** 1999; 43:763-75.

Maluf FC, Leiser AL, Aghajanian C, et al. Phase II study of tirapazamine plus cisplatin in patients with advanced or recurrent cervical cancer. **Int J Gynecol Cancer** 2006; 16:1165-71.

Marotta LL, Polyak K. Cancer stem cells: a model in the making. **Curr Opin Genet Dev** 2009; 19:44-50.

Mazumdar J, Hickey MM, Pant DK, et al. HIF-2 α delectation promotes Kras-driven lung tumor development. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2010; 107:14182-7.

Milas L. Cyclooxygenase-2(COX-2) enzyme inhibitors as potential enhancers of tumor radioresponse. **Semin Radiat Oncol** 2001; 4:290-9.

Milas L, Hittelman W. Cancer stem cell and tumor response to therapy: current problems and future prospects. **Semin Radiat Oncol** 2009; 19:96-105.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Câncer de colo do útero**. Disponível em: <URL://http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colo_uterio > [2011 nov 25].

Monk BJ, Tian C, Rose PG, Lanciano R. Which clinical/pathologic factors matter in the era of chemoradiation as treatment for locally advanced cervical carcinoma? Analysis of two Gynecologic Oncology Group (GOG) trials. **Gynecol Oncol** 2006; 105:427-33.

Monk BJ, Tewari KS, Koh WJ. Multimodality therapy for locally advanced cervical carcinomas: state of art and future direction. **J Clin Oncol** 2007; 25:2952-65.

Munagala R, Dona MG, Rai S, et al. Significance of multiple HVP infection in cervical cancer patients and its impact on treatment response. **Int J Oncol** 2009; 34:263-71.

Nagay Y, Toma T, Moromizato H, et al. Persistence of human papillomavirus infection as a predictor for recurrence in carcinoma of the cervix after radiotherapy. **Am J Obstet Gynecol** 2004; 191:1907-13.

Nakamura M, Bodily JM, Beglin M, Kyo S, Inoue M, Laimins LA. Hypoxia-specific stabilization of HIF-1 α by human papillomaviruses. **Virology** 2009; 387:442-8.

Nakano T, Ohno T, Ishikawa H, Suzuki Y, Takahashi T. Current advancement in radiation therapy for uterine cervical cancer. **J Radiat Res** 2010; 51:1-8.

Noordhuis MG, Eusink JJ, Roossink F, et al. Prognostic cell biological markers in cervical cancer patients primarily treated with (chemo) radiation: a systematic review. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2011; 79:325-34.

Novaes PERS, Ferrigno R, Ferreira PRF, Rosa DD. Radioterapia. In: Coelho FRG, Soares FA, Focchi J, et al. editores. **Câncer do colo do útero**. São Paulo: Tecmed; 2008. p.496-541.

Pályi-Krekk Z, Barok M, Kovács T, et al. EGFR and ERbB2 are functionally coupled to CD44 and regulate shedding, internalization and mitogenic effect of CD44. **Cancer Lett** 2008; 263:231-41.

Perez CA, Grigsby PW, Castro-Vita H, Lockett MA. Carcinoma of the uterine cervix. Impact of prolongation of overall treatment time and timing of brachytherapy on outcome of radiation therapy. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 1995; 32:1275-88.

Ponta H, Sherman L, Herrlich PA. CD44: from adhesion molecules to signaling regulators. **Nat Rev Cancer** 2003; 4:33-45.

Prise KM, O'Sullivan JM. Radiation-induced bystander signaling in cancer therapy. **Nat Rev Cancer** 2009; 9:351-9.

Raimondi C, Gianni W, Cortesi E, Gazzaniga P. Cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition: revising minimal residual disease. **Curr Cancer Drug Targets** 2010; 10:496-508.

Randall LM, Monk BJ, Moon J, et al. Prospective evaluation of an in vitro radiation resistance assay in locally advanced cancer of the uterine cervix: A Southwest Oncology Study. **Gynecol Oncol** 2010; 119:417-21.

Rischin D, Narayan K, Oza AM, et al. Phase 1 study of tirapazamine in combination with radiation and weekly cisplatin in patients with locally advanced cervical cancer. **Int J Gynecol Cancer** 2010; 20:827-33.

Rocha RM, Vassallo J, Soares FA, Miller K, Gobbi H. Digital slides: present of a tool for consultation, teaching, and quality control in pathology. **Pathol Res Pract** 2009a; 205:735-41.

Rocha RM, Miller K, Soares FA, Schenka N, Vassallo J, Gobbi H. Biotin-free systems provide stronger immunohistochemical signal in estrogen receptor evaluation of breast cancer. **J Clin Pathol** 2009b; 62:699-704.

Rose PG, Ali S, Whitney CW, Lanciano R, Stehman FB. Outcome of stage IVa cervical cancer patients with disease limited to the pelvis in the era of chemoradiation: a gynecology oncology group study. **Gynecol Oncol** 2011; 121:542-5.

Saibishkumar SC, Petel FD, Sharma SC, et al. Prognostic value of response to external radiation in stage IIIB cancer cervix in predicting clinical outcomes: A retrospective analysis of 556 patients from India. **Radiother Oncol** 2006; 79:142-6.

Sell S. On the stem cell origin of cancer. **Am J Pathol** 2010; 176:2584-94.

Schatton T, Frank NY, Frank MH. Identification and targeting of cancer stem cells. **Bioassays** 2009; 31:1038-49.

Song YJ; Kim J, Lee S, et al. Persistent human papillomavirus DNA is associated with local recurrence after radiotherapy of uterine cervical cancer. **Int J Cancer** 2011; 129:896-902.

Soonthormthum T, Arias-Pulido H, Joste N, et al. Epidermal growth factor receptor as a biomarker for cervical cancer. **Ann Oncol** 2011; 22:2166-78.

Speiser P, Wanner C, Tempfer C, et al. CD44 is an independent prognostic factor in early-stage cervical cancer. **Int J Cancer** 1997; 74:185-8.

Subbaramaiah K, Dannenberg AJ. Cyclooxygenase-2 transcription is regulated by human papillomavirus 16E6 and E7 oncoproteins: evidence of a co repressor/coactivator exchange. **Cancer Res** 2007; 67:3976-85.

Swami M. Hypoxia: the HIF-2 α puzzle. **Nat Rev Cancer** 2010; 10:603.

Szumiel I. Intrinsic radiation sensitivity: cellular signaling is the key. **Radiat Res** 2008; 169:249-58.

Tan LT, Zahra M. Long-term survival and late toxicity after chemoradiotherapy for cervical cancer - the Addenbrooke's experience. **Clin Oncol (R Coll Radiol)** 2008; 20:358-64.

Tang X, Zhang Q, Nishitani J, Brown J, Shi S, Le AD. Overexpression of human papillomavirus type 16 oncoprotein enhances hypoxia-inducible factor 1 α protein accumulation and vascular endothelial growth factor expression in human cervical carcinoma cells. **Clin Cancer Res** 2007; 13:2568-76.

Takabe N, Harris PJ, Warren Q, Ivy P. Targeting cancer stem cells by inhibiting Wnt, Notch, and Hedgehog pathways. **Nat Rev Clin Oncol** 2011; 8:97-106.

Toole BP. Hyaluronan-Cd44 interactions in cancer: paradoxes and possibilities. **Clin Cancer Res** 2009; 15:7462-8.

Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer stem cells in solid tumors: accumulating evidence and unresolved questions. **Nat Rev Cancer** 2008; 8:755-68.

Wang C, Lai C, Huang H, et al. Clinical effect of human papillomavirus genotypes in patients with cervical cancer undergoing primary radiotherapy. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2010; 7:1111-20.

Wang X, Schneider A. HIF-2 α mediated activation of the epidermal growth factor receptor potentiates head and neck cancer cell migration in response to hypoxia. **Carcinogenesis** 2010; 31:1202-10.

Winter WE 3rd, Maxwell GL, Tian C, et al. Association of hemoglobin level with survival in cervical carcinoma patients treated with concurrent cisplatin and radiotherapy: a Gynecology Oncology Group study. **Gynecol Oncol** 2004; 94:495-501.

Wobus M, Kuns R, Wolf C, et al. CD44 mediates constitutive type i receptors signaling in cervical cancer cells. **Gynecol Oncol** 2001; 83:227-34.

Yeung AR, Amdur RJ, Morris CG, Morgan LS, Mendenhall WM. Long term outcome after radiotherapy for FIGO stage IIIB and IVA carcinoma of the cervix. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2007; 67:1445-50.

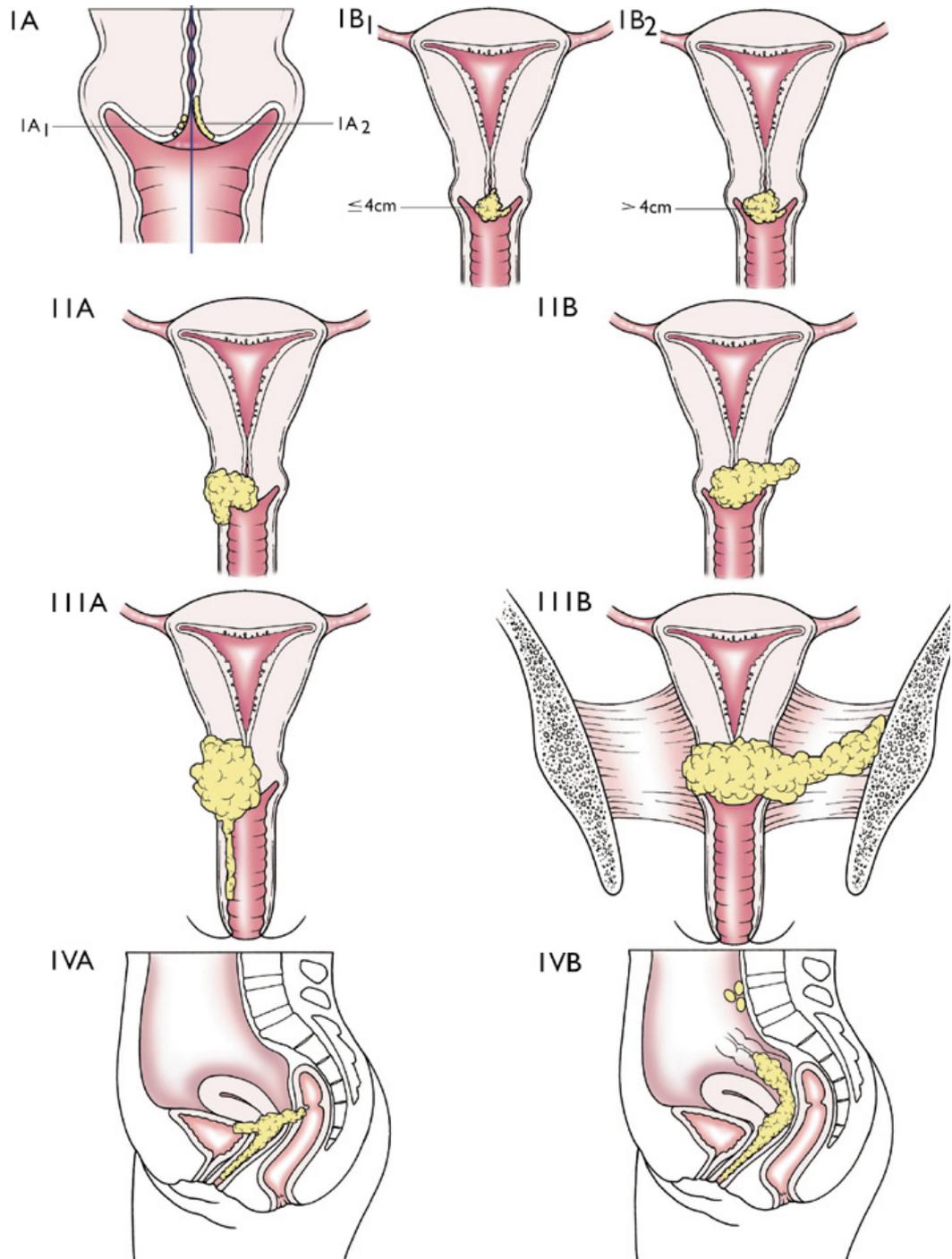
Young JL, Jazaeri AA, Darus CJ, Modesitt SC. Cyclooxygenase-2 in cervical neoplasia: a review. **Gynecol Oncol** 2008; 109:140-5.

Yoshimura H, Dhar DK, Khno H, et al. Prognostic impact of hypoxia –inducible factors 1 α and 2 α in colorectal cancer patients: correlation with tumor angiogenesis and cyclooxygenase-2 expression. **Clin Cancer Res** 2004; 10:8554-60.

Zöller M. CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule? **Nat Rev Cancer** 2011; 11:254-67.

Zhu X, Zhou X, Lewis MT, Xia L, Wong S. Cancer stem cell, niche and EGFR decide tumor development and treatment response: a bio-computational simulation study. **J Theor Biol** 2011; 269:138-49.

Anexo 1 - Estadiamento do Câncer do Colo do Útero



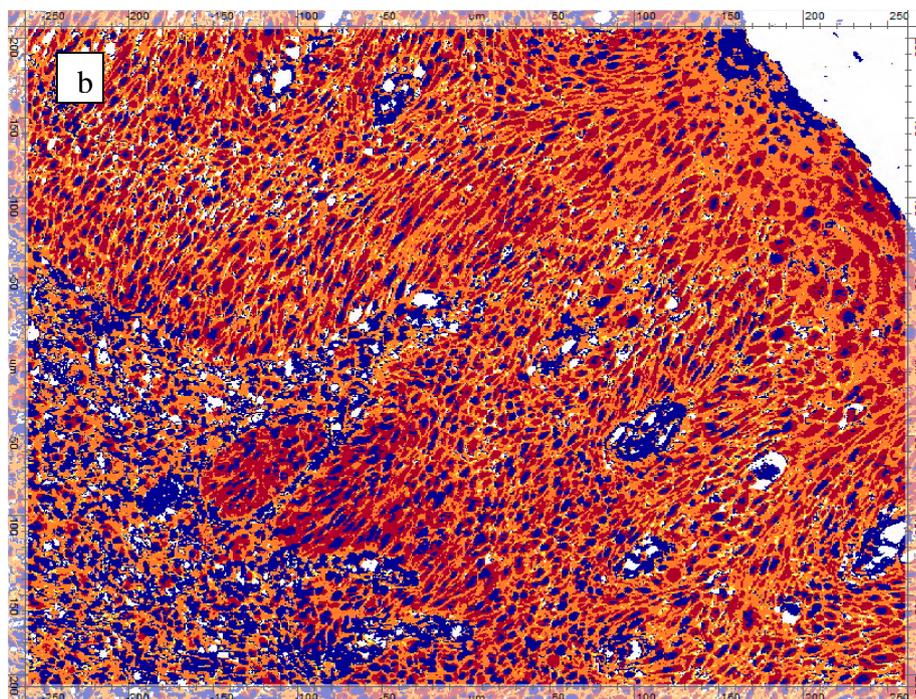
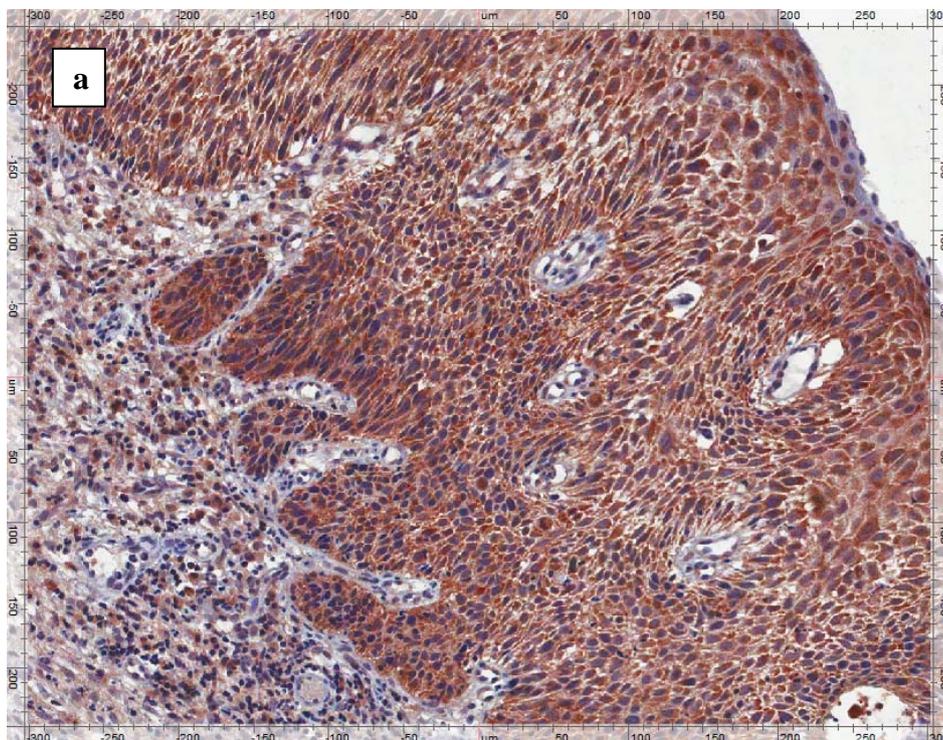
Fonte: *International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO)*

Anexo 2 - Ficha de Coleta de Dados

1. Caso ID. |_|_|_|_|
2. Registro Hospitalar RGH. |_|_|_|_|_|_|_|_|-|_|
3. Idade (anos). |_|_|
4. Raça: (1) Branca (2) Negra (3) Outras. |_|
5. Tabaco: (0) Não (1) Sim (2) Ex-Tabagista (3) Ignorado. |_|
6. Anticoncepcional: (0) Não (1) Sim. |_|
7. Estadiamento FIGO. |_|
(1) IIb (2) IIIa (3) IIIb (4) IVa
8. Extensão da doença. |_|
(0) Sem envolvimento da parede pélvica (1) Paramétrio até parede pélvica unilateral (2) Paramétrio até parede pélvica bilateral
(3) 1/3 Superior da vagina (4) 1/3 inferior da vagina
(5) Presença de linfonodos na Tomografia () Pélvico/ () Para-aórtico
9. Tipo de Radioterapia. |_|
(1) Radioterapia Externa (2) Radioterapia Externa +LDR
(3) Radioterapia Externa +HDR (4) Radio quimioterapia (6) Radioterapia pré-operatória +Histerectomia tipo II
10. Nível de Hemoglobina pré-tratamento. |_|||_|
11. Dose total da RXT _____
12. Número de frações da RXT externa _____
13. Dose total no ponto A _____
14. Número de frações da braquiterapia. |_|

15. Duração total de RXT. |_|_|_|_|
16. Dose complementar no parâmetro _____
17. Tipo de Quimioterapia _____
18. Resposta à radioterapia completa doença residual progressão
19. Data da recorrência. |_|_|_|-|_|_|_|-|_|_|_|_|
20. Tipo de Recorrência local à distância local e à distância
21. Situação do último Follow-up: vivo sem doença viva com doença
morte por outras causas perdido de vista MOCA
22. Data da última informação |_|_|_|_|-|_|_|_|_|-|_|_|_|_|_|
23. N° AP Biópsia pré-tratamento _____
24. N° AP biópsia após tratamento _____

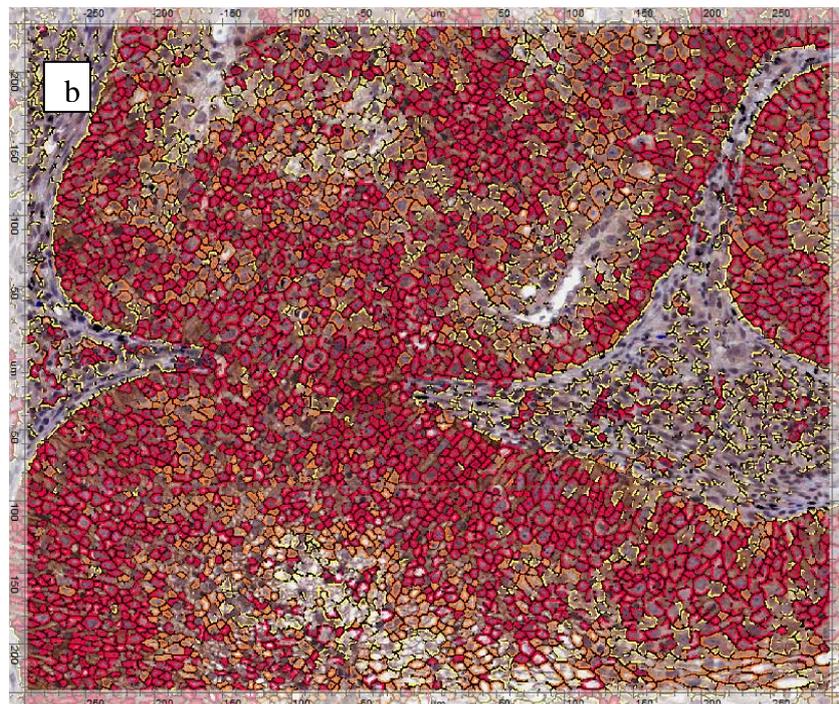
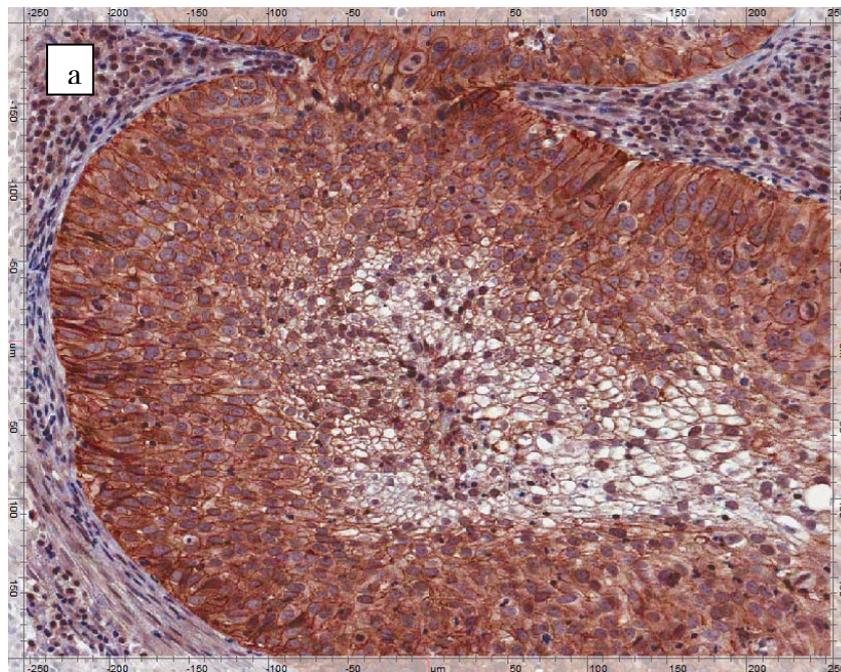
Anexo 3- Expressão citoplasmática da COX-2 (aumento 10x)



a- sem marcação

b- com marcação: azul= negativo, amarelo= fraco, laranja= moderado, vermelho= forte

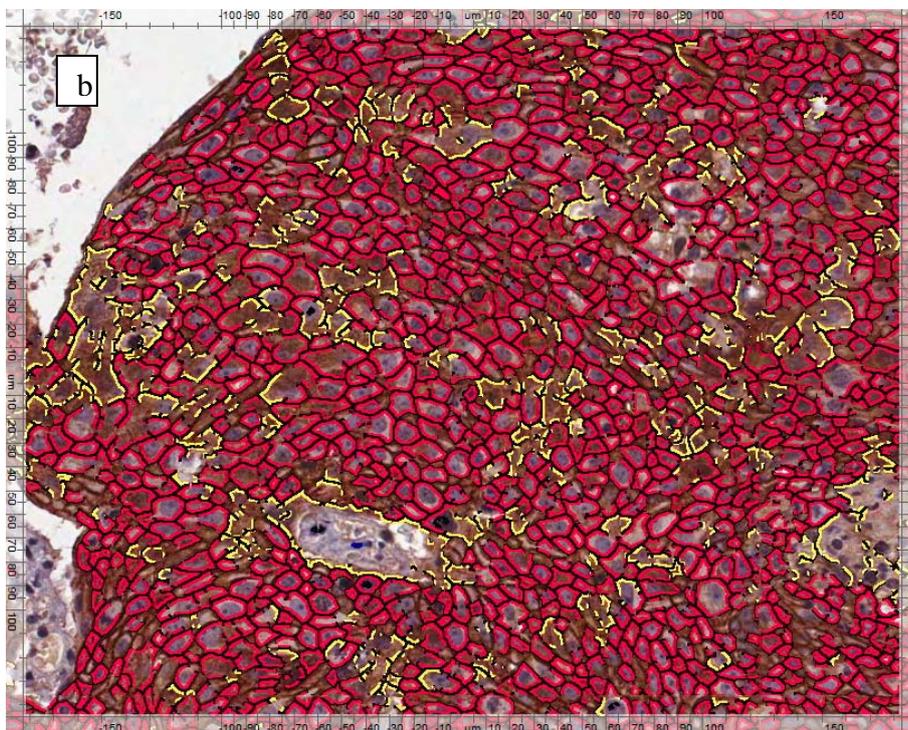
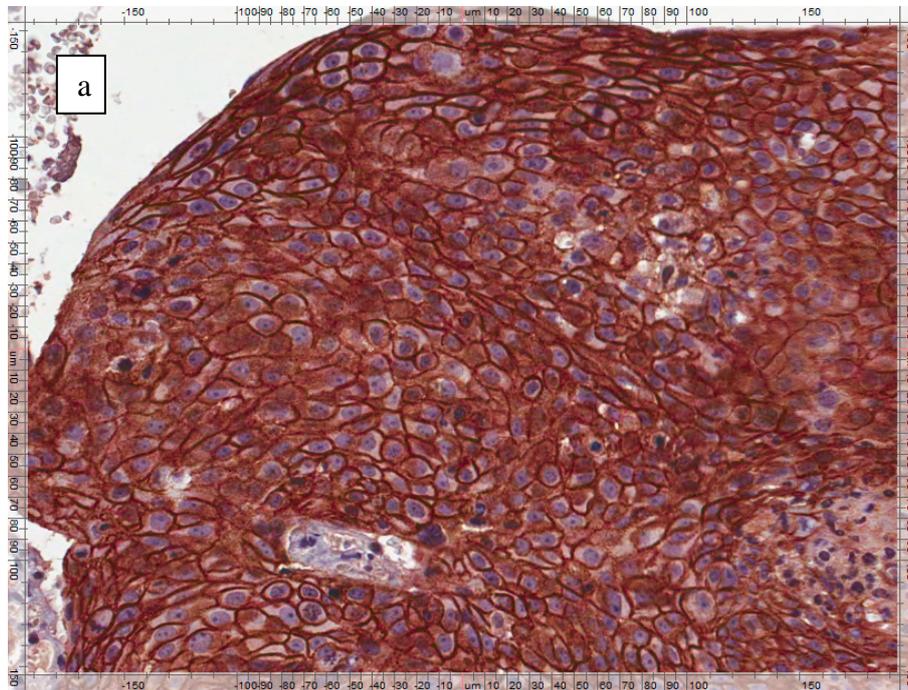
Anexo 4- Expressão do EGFR na membrana (aumento 10x)



a- sem marcação

b- com marcação: amarelo= fraco, laranja= moderado, vermelho= forte

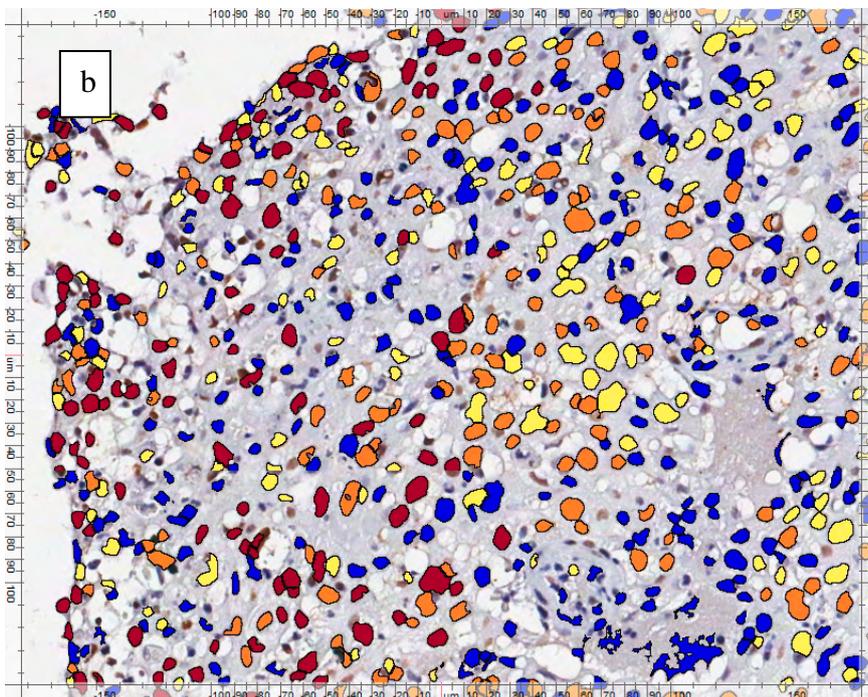
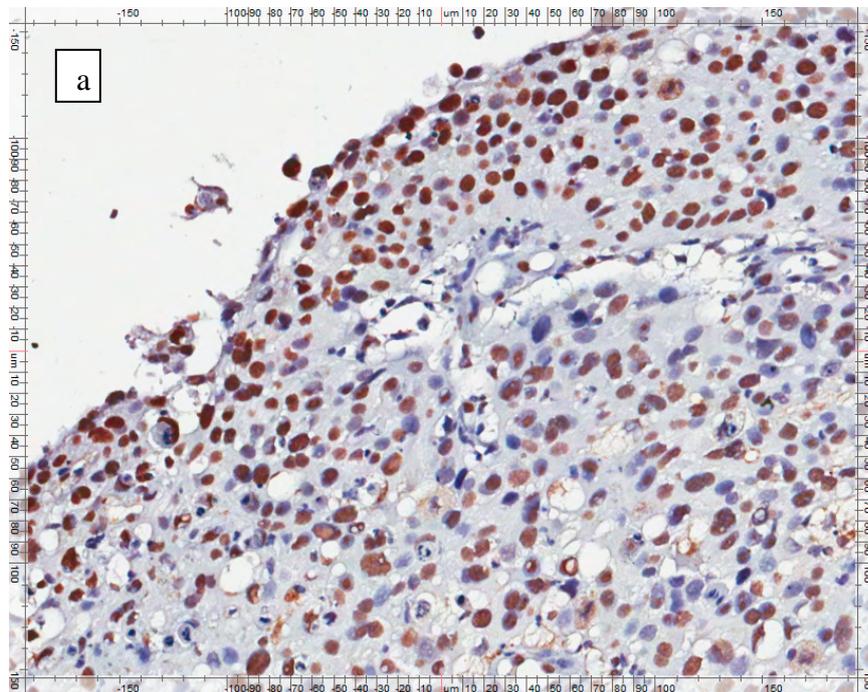
Anexo 5- Expressão da CD44v6 na membrana (aumento 20x)



a- sem marcação

b- com marcação: amarelo= fraco, vermelho= forte

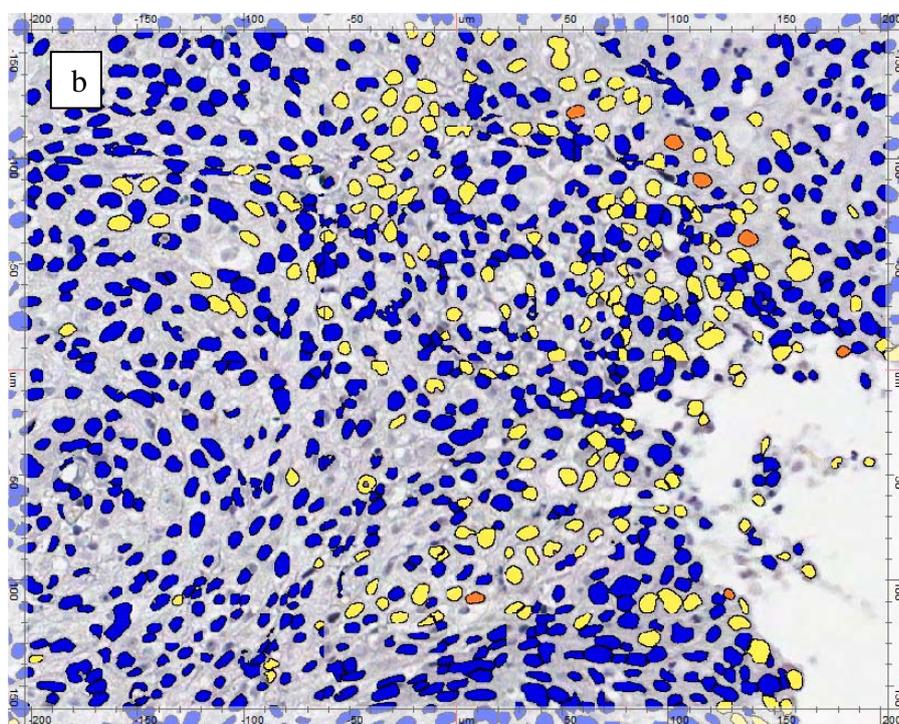
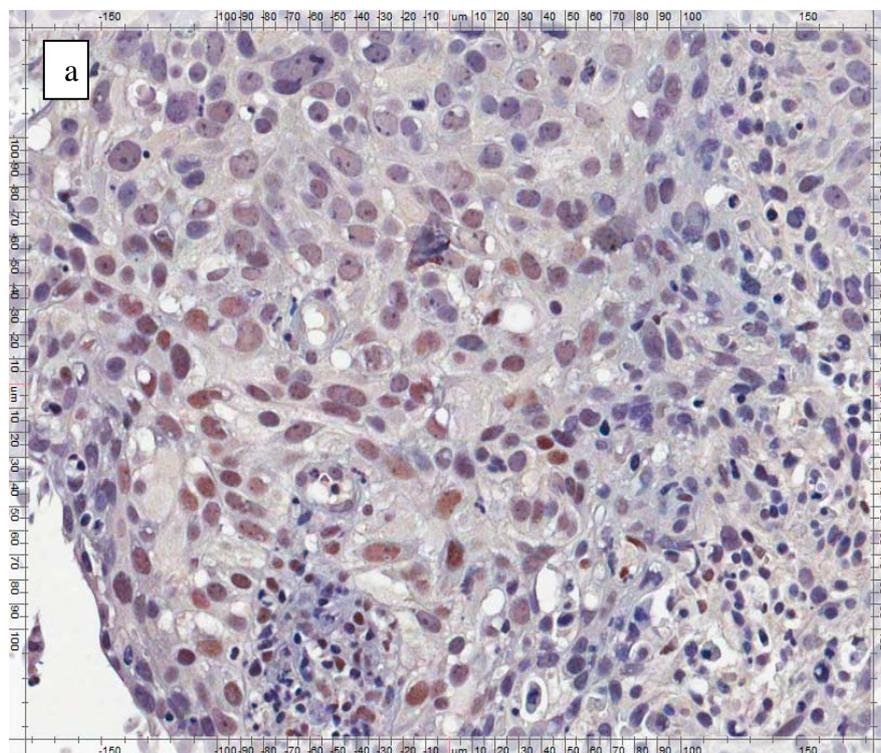
Anexo 6- Expressão da HIF-2 no núcleo (aumento 20x)



a- sem marcação

b- com marcação: azul= negativo, amarelo= fraco, laranja= moderado, vermelho= forte

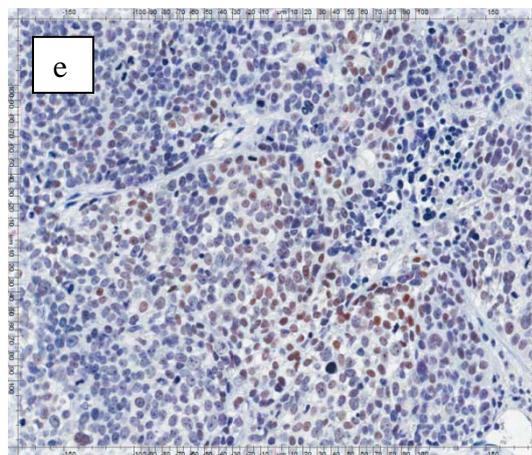
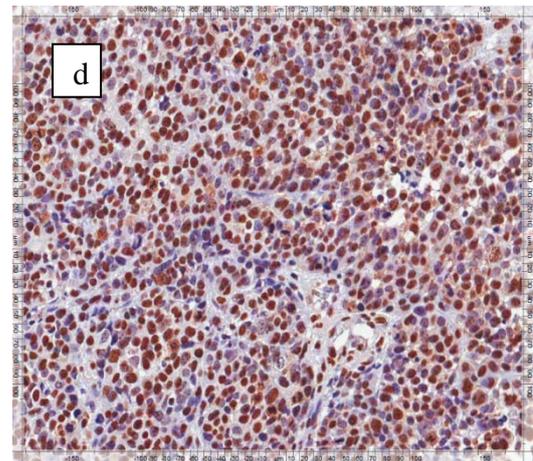
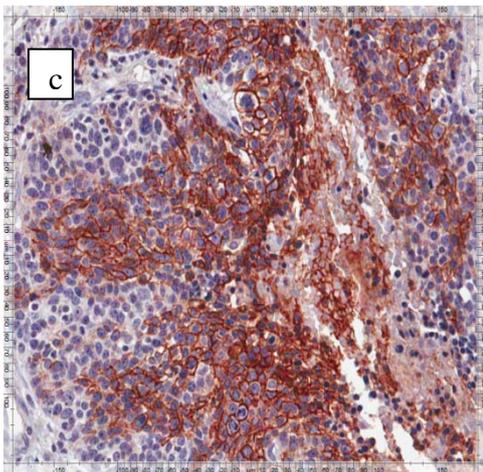
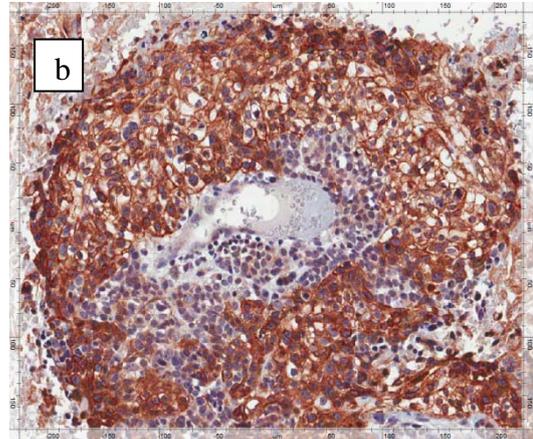
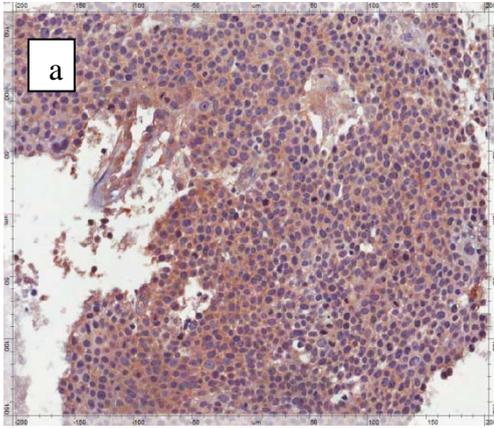
Anexo 7- Expressão da HIF-1 no núcleo (aumento 20x)



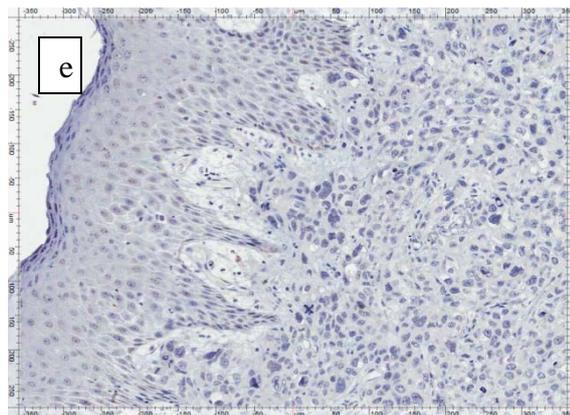
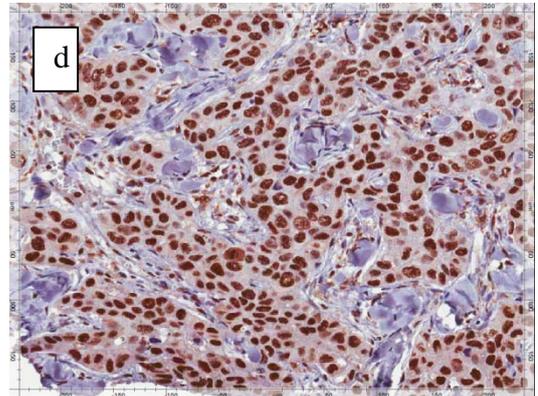
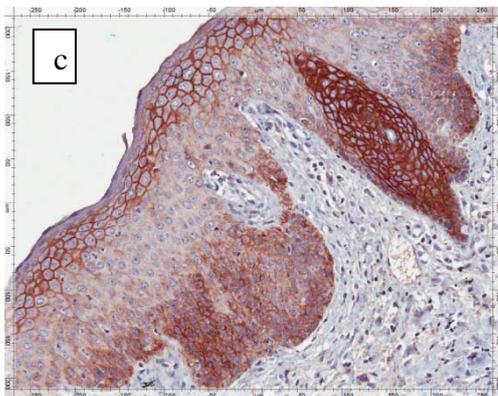
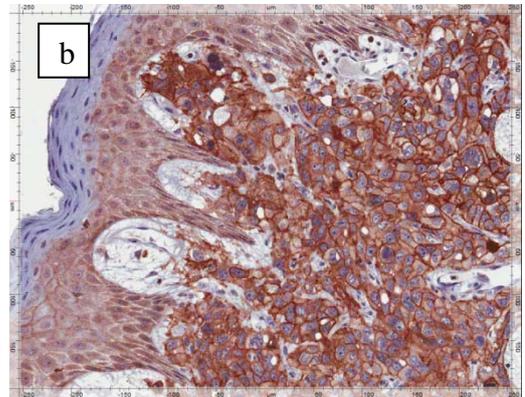
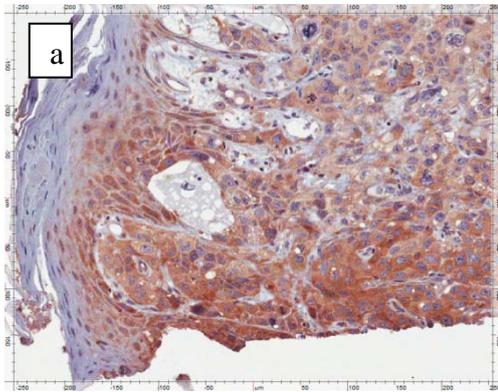
a- sem marcação

b- com marcação: azul= negativo, amarelo= fraco, laranja= moderado

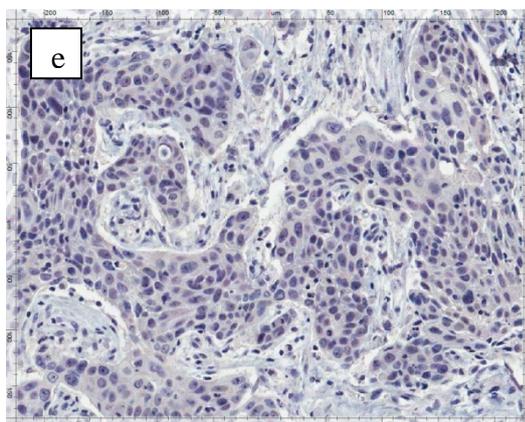
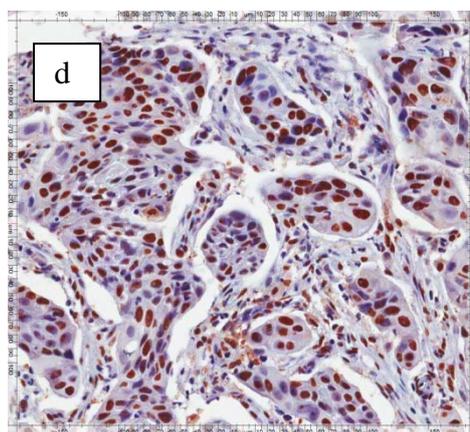
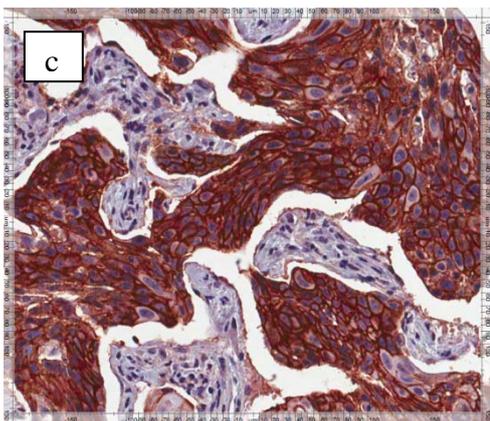
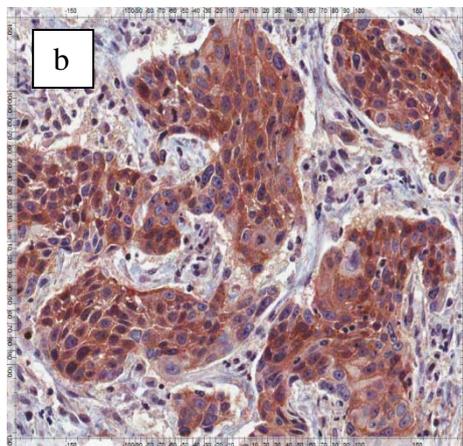
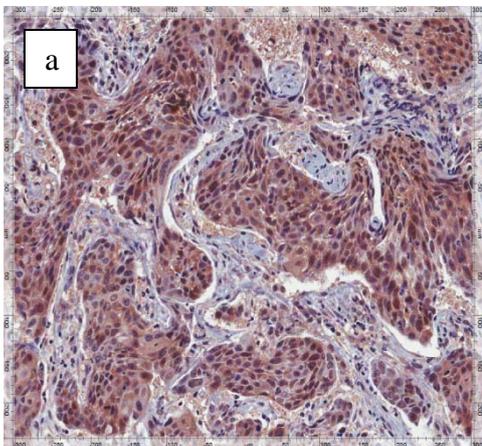
Anexo 8- Expressão da COX-2 (a), EGFR (b), CD44 (c), HIF-2 (d) e HIF-1 (1) na metástase cerebral (aumento 20x)



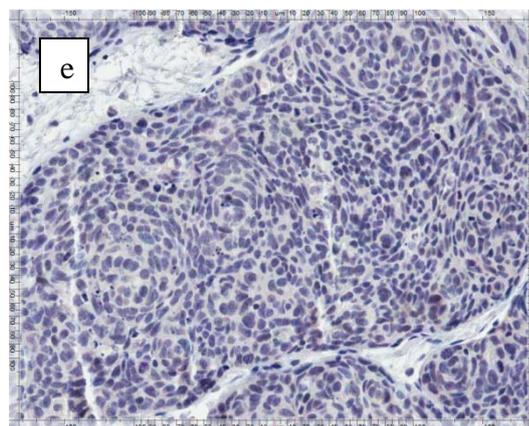
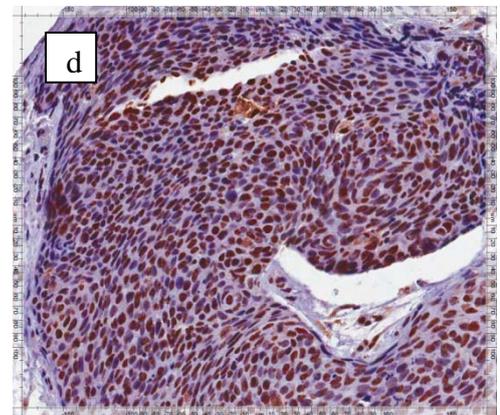
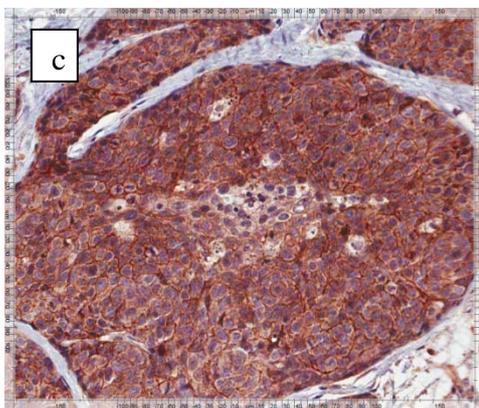
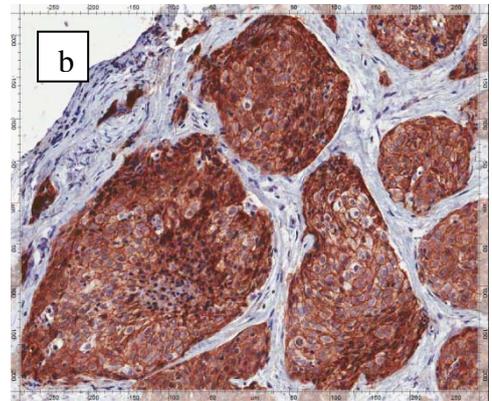
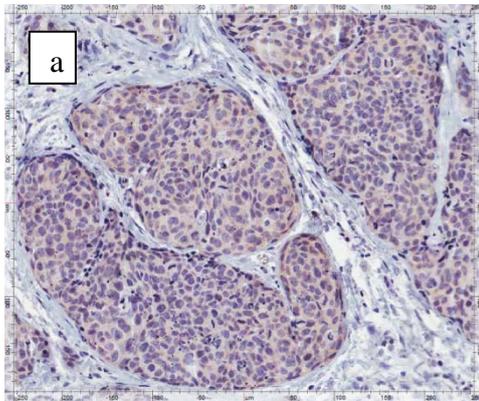
Anexo 9 - Expressão da COX-2 (a), EGFR (b), CD44 (c), HIF-2 (d) e HIF-1 (1) na metástase em pele de antebraço (aumento 20x)



Anexo 10 - Expressão da COX-2 (a), EGFR (b), CD44 (c), HIF-2 (d) e HIF-1 (1) na metástase em linfonodo supraclavicular (aumento 20x)



Anexo 11- Expressão da COX-2 (a), EGFR (b), CD44 (c), HIF-2 (d) e HIF-1 (1) na metástase em peritônio (aumento 20x)



Anexo 12- Expressão negativa-fracca COX-2 (a), CD44v6 (b), HIF-1 (c), HIF-2 (d) e controle negativo do EGFR (e)

