

**AVALIAÇÃO DAS EXPRESSÕES IMUNOISTOQUÍMICAS
DE Akt, mTOR, PTEN E PI3K EM LEIOMIOMAS,
LEIOMIOMAS ATÍPICOS E LEIOMIOSSARCOMAS
UTERINOS**

CARLOS CHAVES FALOPPA

**Tese apresentada à Fundação Antônio Prudente
para obtenção do título de Doutor em Ciências
Área de contratação: Oncologia**

Orientador: Dr. Glauco Baiocchi Neto

Co-Orientadora: Dra Isabela Werneck da Cunha

São Paulo

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Faloppa, Carlos Chaves

Avaliação das expressões imunoistoquímicas de AkT, mTOR, PTEN E PI3K em leiomiomas, leiomiomas atípicos e leiomiossarcomas uterinos / Carlos Chaves
Faloppa - São Paulo 2017.

81p.

Tese (doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Glauco Baiocchi Neto

Descritores: 1. Imuno-Histoquímica/Immunohistochemistry. 2. Leiomioma/Leiomyoma. 3. Leiomiossarcoma/ Leiomyosarcoma. 4. Neoplasias Uterinas/Uterine Neoplasms. 5. Expressão Gênica/ Gene Expression.

DEDICATÓRIA

A minha esposa **Mariana** e meus filhos **Leonardo** e **Manuela** pelo amor, carinho e incentivo.

Aos meus pais **Clementino Faloppa e Maria Cecília Faloppa**, pelos exemplos de vida, sempre me estimulando a buscar o melhor, de maneira correta e honesta.

Ao meu irmão **Arthur Chaves Faloppa** pela amizade e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Ao **Dr Glauco Baiocchi Neto**, pelo incentivo, amizade de longa data e agradecimentos por sua orientação cuidadosa em todas as etapas desse trabalho.

Ao **Prof. Dr Fernando Augusto Soares, Dra Isabela Werneck da Cunha, Dra Louise de Brot**, pela eficiência, dedicação e disponibilidade, indispensáveis para elaboração desse trabalho.

Aos meus amigos do **Departamento de Ginecologia do A.C.Camargo Cancer Center**.

A **Sra. Hirde Contesini**, pela ajuda no levantamento dos prontuários.

A biblioteca do A.C.Camargo Cancer Center, em especial a **Suely**, por sua atenção ao corrigir e formatar este trabalho.

RESUMO

Faloppa CC. **Avaliação das expressões imunoistoquímicas de Akt, mTOR, PTEN E PI3K em leiomiomas, leiomiomas atípicos e leiomiossarcomas uterinos.** São Paulo; 2017. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente]

Introdução: Estudos epidemiológicos demonstraram que o câncer de corpo de útero é o sexto câncer mais comum em mulheres brasileiras, com estimativa de 6.950 casos novos em 2016. O leiomiossarcoma uterino é o subtipo histológico de sarcoma uterino mais comum. As vias de progressão da gênese do leiomiossarcoma uterino são pouco compreendidas, e estudos revelaram a participação das vias do PTEN, PI3K, Akt e mTOR. **Objetivos:** 1. Avaliar as expressões imunoistoquímica do PTEN, PI3K, Akt e mTOR em leiomiomas, variantes não usuais dos leiomiomas e nos leiomiossarcomas uterinos; 2. Correlacionar as expressões imunoistoquímica do PTEN, PI3K, Akt e mTOR com as variáveis clínico-patológicas nos leiomiossarcomas uterinos; 3. Avaliar as expressões imunoistoquímica do PTEN, PI3K Akt e mTOR como possíveis fatores prognósticos nos leiomiossarcomas uterinos. **Casuística e métodos:** Foram selecionados 23 pacientes com leiomiomas 16 leiomiomas não usuais, 44 leiomiossarcomas uterinos durante o período de 1982 à 2013 no A.C. Camargo Cancer Center, a partir da análise retrospectiva dos prontuários médicos. Foram realizados estudos imunoistoquímicos dos seguintes marcadores: PTEN, Akt, PI3K e mTOR. **Resultados:** Em relação a expressão imunoistoquímica do PTEN e do Akt, obtivemos expressão imunoistoquímica positiva do PTEN e negativa do Akt em todos os tipos histológicos (leiomiomas, leiomiomas não usuais e leiomiossarcomas). No caso do PI3K, não houve diferença na expressão imunoistoquímica nos leiomiossarcomas uterinos quando comparado aos leiomiomas típicos e leiomiomas não usuais; nos leiomiomas houve expressão positiva em 13 casos (65%), nos leiomiomas não usuais houve expressão positiva em 5 casos (62,5%), nos leiomiossarcomas houve expressão positiva em 15 casos (62,5%). Não houve correlação entre as variáveis clínicas e patológicas com a expressão do PI3K nos leiomiossarcomas. A expressão imunoistoquímica do mTor

nos leiomiomas foi forte em 4 casos (17,4%), nos leiomiomas não usuais foi forte em 7 casos (46,7%), nos leiomiossarcomas foi forte em 12 casos (41,4%). Quando agrupados os casos de leiomiomas não usuais com os leiomiossarcomas, houve expressão aumentada do mTor em relação aos leiomiomas (17,4% vs. 43,2%; $p=0.035$). Não houve correlação da expressão imunoistoquímica do mTor nos leiomiossarcomas uterinos em relação aos dados clínicos e anatomopatológicos. Em relação à sobrevida global, obtivemos uma sobrevida global mediana de 24 meses nas pacientes com leiomiossarcomas uterinos e somente o estágio teve impacto em sobrevida. No estágio I, a expressão imunoistoquímica negativa do PI3K teve impacto negativo em sobrevida global ($p=0,025$). No caso da sobrevida livre de doença, encontramos uma sobrevida livre de doença mediana de 16,9 meses. Paciente com doença extra-uterina e índice mitótico $>20/CGA$ apresentaram uma pior sobrevida livre de doença. **Conclusões:** 1. A expressão imunoistoquímica do PTEN estava presente em todos os tipos histológicos estudados (leiomiomas, leiomiomas não usuais e leiomiossarcomas). A expressão imunoistoquímica do AKT estava ausente em todos os tipos histológicos estudados (leiomiomas, leiomiomas não usuais e leiomiossarcomas). A expressão imunoistoquímica do PI3K nos leiomiomas, variantes do leiomioma e leiomiossarcoma estava presente em 65%, 62,5% e 62,5% dos casos, respectivamente. A expressão imunoistoquímica do mTor nos leiomiomas, leiomiomas não usuais e leiomiossarcoma foi forte em 17,4%, 46,7% e 41,4% dos casos, respectivamente. Agrupando-se os leiomiomas não usuais com os leiomiossarcomas e comparando com os leiomiomas observou-se expressões fortes em 43,2% e 17,4% respectivamente ($p=0,035$). 2. As expressões imunoistoquímica do PTEN, Akt, PI3K e mTOR não se correlacionaram com as variáveis clínico-patológicas nos leiomiossarcomas uterinos. 3. As expressões imunoistoquímica do PTEN, Akt e mTOR não tiveram impacto prognóstico nos leiomiossarcomas uterinos. A expressão imunoistoquímica fraca do PI3K teve impacto negativo em sobrevida global nas pacientes estágio I.

SUMMARY

Faloppa CC. [Immunohistochemical expressions of Akt, mTOR, PTEN and PI3K in leiomyomas, atypical leiomyomas and uterine leiomyosarcomas]. São Paulo; 2017. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente]

Introduction: Epidemiological studies have demonstrated that uterine body cancer is the sixth most common cancer in Brazilian women, with an estimated 6,950 new cases in 2016. Uterine leiomyosarcoma is the most common histological subtype of uterine sarcoma. The pathways of progression of the genesis of uterine leiomyosarcoma are poorly understood, and studies have revealed the involvement of PTEN, PI3K, Akt and mTOR pathways. **Objectives:** 1. Evaluation of the immunohistochemical expressions of PTEN, PI3K, Akt and mTOR in leiomyomas, unusual leiomyoma variants and uterine leiomyosarcomas; 2. Correlation of the immunohistochemical expressions of PTEN, PI3K, Akt and mTOR, with clinical-pathological variables in uterine leiomyosarcomas; 3. Evaluation of the immunohistochemical expression of PTEN, Akt, PI3K and mTOR as possible prognostic factors in uterine leiomyosarcomas. **Patients and methods:** Twenty-three patients with leiomyomas 16 unusual leiomyoma variants, 44 uterine leiomyosarcomas were selected from 1982 to 2013 at the A.C. Camargo Cancer Center, based on a retrospective analysis of medical records. Immunohistochemical studies of the following markers were performed: PTEN, Akt, PI3K and mTOR. **Results:** We obtained positive PTEN immunohistochemical expression and negative Akt expression in all histological types (leiomyomas, unusual leiomyoma variants and leiomyosarcomas). In relation of PI3K, there was no difference in immunohistochemical expression in uterine leiomyosarcomas when compared to typical and unusual leiomyoma variants; in leiomyomas there was a positive expression in 13 cases (65.0%); unusual leiomyoma variants there was a positive expression in 5 cases (62.5%); in leiomyosarcomas there was a positive expression in 15 cases (62.5%). There was no correlation between clinical and pathological variables with PI3K expression in leiomyosarcomas. Immunohistochemical

expression of mTor in leiomyomas was strong in 4 cases (17.4%), in unusual leiomyoma variants was strong in 7 cases (46.7%), in leiomyosarcomas was strong in 12 cases (41.4%). When the cases of unusual leiomyoma variants were grouped with leiomyosarcomas, there was an increased expression of mTor in relation to leiomyomas (17.4% vs. 43.2%, $p = 0.035$). There was no correlation of mTor immunohistochemical expression in uterine leiomyosarcomas in relation to clinical and pathological variables. Regarding overall survival, we obtained a median overall survival of 24 months in patients with uterine leiomyosarcomas and only the stage had an impact on survival. However, at stage I, the negative immunohistochemical expression of PI3K had a negative impact on overall survival ($p = 0.025$). In the case of disease-free survival, we found a median disease-free survival of 16.9 months. Patients with extra-uterine disease and mitotic index > 20 / CGA had worse disease-free survival. **Conclusions: 1).** Immunohistochemical expression of PTEN was present in all histological types studied (leiomyomas, unusual leiomyomas and leiomyosarcomas). Immunohistochemical expressions of Akt were absent in all histological types studied (leiomyomas, unusual leiomyomas and leiomyosarcomas). Immunohistochemical expression of PI3K in leiomyomas, variants of leiomyoma and leiomyosarcoma were present in 65%, 62.5% and 62.5% of cases, respectively. Immunohistochemical expression of mTor in leiomyomas, unusual leiomyomas and leiomyosarcoma was strong in 17.4%, 46.7% and 41.4% of the cases. Unusual leiomyomas and leiomyosarcomas were compared with leiomyomas and strong expression was observed in 43.2% and 17.4% respectively ($p = 0.035$). **2).** Immunohistochemical expression of Akt, mTOR, PTEN and PI3K did not correlate with clinical-pathological variables in uterine leiomyosarcomas; **3).** Immunohistochemical expressions of PTEN, Akt, and mTOR did not have a prognostic impact on uterine leiomyosarcomas. Negative immunohistochemical expression of PI3K had a negative impact on overall survival in stage I patients.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Via sinalizadora do PI3K-Akt-mTOR.....	12
Figura 2	Via sinalizadora do mTor (Cell Signaling Technology, September 2008).....	14
Figura 3	Modelo proposto da gênese e progressão dos leiomiiossarcomas pela ação da rapamicina.....	14
Figura 4	Fluxograma demonstrando a descrição da casuística (anatomopatológico A.C.Camargo Cancer Center).....	18
Figura 5	Fotomicrografia exemplificando.....	23
Figura 6	Fotomicrografia exemplificando.....	24
Figura 7	Fotomicrografia exemplificando.....	25
Figura 8	Fotomicrografia exemplificando.....	26
Figura 9	Fotomicrografia exemplificando.....	27
Figura 10	Curva de sobrevida global dos leiomiiossarcomas uterinos. (A.C.Camargo Cancer Center 1982 - 2013).....	43
Figura 11	Curvas de sobrevida global dos leiomiiossarcomas uterinos por estadiamento (A.C.Camargo Cancer Center 1982 - 2013).....	44
Figura 12	Curvas de sobrevida global dos leiomiiossarcomas uterinos considerando doença restrita ao útero (estádio I) e doença extra-uterina (estádios II, III, IV) (A.C.Camargo Cancer Center 1982 - 2013).....	45
Figura 13	Curvas de sobrevida global dos casos de leiomiiossarcomas uterinos segundo expressão imunoistoquímica nuclear do PI3K (A.C.Camargo Cancer Center 1982 - 2013).....	47
Figura 14	Curvas de sobrevida global dos casos de leiomiiossarcomas uterinos segundo expressão imunoistoquímica citoplasmática do mTOR (A.C.Camargo Cancer Center 1982 - 2013).....	48
Figura 15	Curvas de sobrevida global dos casos de leiomiiossarcomas uterinos segundo expressão imunoistoquímica nuclear do mTOR. (A.C.Camargo Cancer Center 1982 - 2013).....	49

Figura 16	Curvas de sobrevida global dos casos de leiomiiossarcomas uterinos estágio I conforme expressão imunoistoquímica do PI3K (A.C.Camargo Cancer Center 1982 - 2013).....	51
Figura 17	Curva de sobrevida livre de doença dos leiomiiossarcomas uterinos. (A.C.Camargo Cancer Center 1982 - 2013).....	52
Figura 18	Curvas de sobrevida livre de doença dos leiomiiossarcomas uterinos por estadiamento (p=0,02) (A.C.Camargo Cancer Center 1982 - 2013).....	53
Figura 19	Curvas de sobrevida livre de doença dos leiomiiossarcomas uterinos em relação ao índice mitótico (p=0,041) (A.C.Camargo Cancer Center 1982 - 2013).....	54
Figura 20	Curvas de sobrevida livre de doença dos leiomiiossarcomas uterinos em relação ao tamanho dos tumores (p=0,998) (A.C. Camargo Cancer Center 1982 - 2013).....	55
Figura 21	Curvas de sobrevida livre de doença conforme realização de quimioterapia adjuvante nos leiomiiossarcomas uterinos estádios I, II e III (p=0,56) (A.C.Camargo Cancer Center 1982 - 2013).....	56
Figura 22	Curvas de sobrevida livre de doença conforme realização da radioterapia adjuvante nos leiomiiossarcomas uterinos estádios I, II e III (p=0,81) (A.C.Camargo Cancer Center 1982 - 2013).....	57
Figura 23	Curvas de sobrevida livre de doença correlacionado a expressão imunoistoquímica citoplasmática de PI3K nos leiomiiossarcomas uterinos (p=0,170) (A.C.Camargo Cancer Center 1982 - 2013).....	58
Figura 24	Curvas de sobrevida livre de doença correlacionado a expressão imunoistoquímica citoplasmática de mTOR nos leiomiiossarcomas uterinos (p=0.91) (A.C.Camargo Cancer Center 1982 - 2013).....	59
Figura 25	Curvas de sobrevida livre de doença correlacionado a expressão imunoistoquímica nuclear do mTOR nos leiomiiossarcomas uterinos (p=0,096) (A.C.Camargo Cancer Center 1982 - 2013).....	60

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Estadiamento do leiomiossarcoma uterino.....	4
Quadro 2	Variantes morfológicas das lesões uterinas benignas.....	6
Tabela 1	Idade das pacientes de acordo com os tipos histológicos. (A.C.Camargo Cancer Center 1982 - 2013).....	32
Tabela 2	Tamanho das lesões de acordo com os tipos histológicos. (A.C.Camargo Cancer Center 1982 - 2013).....	32
Tabela 3	Cirurgias realizadas nos paciente com leiomiossarcomas uterinos (A.C.Camargo Cancer Center 1982 - 2013).....	33
Tabela 4	Características clínicas das pacientes com leiomiossarcomas uterinos (A.C.Camargo Cancer Center 1982 - 2013).....	34
Tabela 5	Características anatomopatológicas das pacientes com leiomiomas não usuais (A.C.Camargo Cancer Center 1982 - 2013).....	35
Tabela 6	Características anatomopatológicas das pacientes com leiomiossarcomas uterinos (A.C.Camargo Cancer Center 1982 - 2013).....	36
Tabela 7	Relação entre estadiamento e radioterapia das pacientes com leiomiossarcomas uterinos (A.C.Camargo Cancer Center 1982 - 2013).....	37
Tabela 8	Relação entre estadiamento e quimioterapia das pacientes com leiomiossarcomas uterinos (A.C.Camargo Cancer Center 1982 – 2013).....	37
Tabela 9	Correlação das expressões imunoistoquímicas citoplasmática do mTOR com as variáveis clínico patológicas nos leiomiossarcomas uterinos. (A.C.Camargo Cancer Center 1982 - 2013).....	39
Tabela 10	Correlação das expressões imunoistoquímicas citoplasmática do PI3K com as variáveis clínico patológicas nos leiomiossarcomas uterinos. (A.C.Camargo Cancer Center 1982 - 2013).....	40
Tabela 11	Correlação das expressões imunoistoquímicas citoplasmática do mTor comparando os tipos histológicos leiomiomas com os leiomiomas não usuais (p=0,073) (A.C.Camargo Cancer Center 1982 - 2013).....	41

Tabela 12	Correlação das expressões imunoistoquímica citoplasmática do mTor comparando os tipos histológicos leiomiomas não usuais com os leiomiossarcomas ($p=0,73$) (A.C.Camargo Cancer Center 1982 - 2013).....	41
Tabela 13	Correlação das expressões imunoistoquímica citoplasmático do mTor comparando os tipos histológicos leiomiomas com os leiomiomas não usuais /leiomiossarcomas ($p=0,035$) (A.C.Camargo Cancer Center 1982 - 2013).....	41
Tabela 14	Correlação das expressões imunoistoquímica citoplasmática do PI3K comparando os tipos tipos histológicos leiomiomas com leiomiomas não usuais ($p= 1,0$) (A.C.Camargo Cancer Center 1982 - 2013).....	42
Tabela 15	Correlação das expressões imunoistoquímica citoplasmática do PI3K comparando os tipos tipos histológicos leiomiomas não usuais com os leiomiossarcomas ($p= 1,0$) (A.C.Camargo Cancer Center 1982 - 2013).....	42
Tabela 16	Situação final das pacientes com leiomiossarcomas uterinos (A.C.Camargo Cancer Center 1982 - 2013).....	43
Tabela 17	Correlação dos dados clínicos, tratamentos e anatomopatológico com a sobrevida global mediana nos leiomiossarcomas uterinos. (A.C.Camargo Cancer Center 1982 - 2013).....	46
Tabela 18	Correlação da expressão imunoistoquímica citoplasmática do mTor por estadiamento com a sobrevida global mediana nos leiomiossarcomas uterinos. (A.C.Camargo Cancer Center 1982 - 2013).....	50
Tabela 19	Correlação da expressão imunoistoquímica citoplasmática do PI3K por estadiamento com a sobrevida global mediana nos leiomiossarcomas uterinos (A.C.Camargo Cancer Center 1982 - 2013).....	50
Tabela 20	Taxas de sobrevida mediana livre de doença em relação as variáveis clínicas e anatomopatológicas nos leiomiossarcomas uterinos. (A.C.Camargo Cancer Center 1982 - 2013).....	61

LISTA DE ABREVIACES

Akt	família de proteínas quinases são quinases serina/treonina
CGA	campos de grande aumento
HTA	histerectomia total abdominal
IHQ	imunoistoquímica
LM	leiomioma uterino
LMS	leiomiossarcoma uterino
LNP	linfadenectomia pélvica
LNRP	linfadenectomia retroperitoneal
LNU	leiomiomas no usuais
mTOR	mammalian target of rapamycin
mTORC1	mammalian target of rapamycin complex 1 or mechanistic target of rapamycin complex 1
mTORC2	mammalian target of rapamycin complex 2
PARP	Poli Adenosina difosfato Ribose Polimerase
pI3K	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase
PIP2	fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato
PIP3	fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato
PTEN	phosphatase and tensin homolog
S6K1	proteína ribossômica S6 quinase 1
SG	sobrevida global
SLD	sobrevida livre de doença
SOB	salpingooforectomia bilateral
STUMP	smooth uterine muscle of uncertain malignant potential
TMA	tissue microarray

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	OBJETIVOS.....	15
3	CASUÍSTICA E MÉTODO	16
3.1	Desenho do Estudo	16
3.2	CrITÉrios de Inclusão	16
3.3	CrITÉrios de Exclusão	16
3.4	Descrição da Casuística	17
3.5	Ficha de Registro de Dados	18
3.6	Método	19
3.6.1	Construção do Tissue Microarray - TMA.....	19
3.6.2	Imunoistoquímica.....	20
4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	28
5	RESULTADOS	30
5.1	Dados Demográficos, Clínicos e Cirúrgicos eos Leiomiomas, Leiomiomas não usuais e Leiomiossarcomas	30
5.2	Variáveis Anatomopatológicas dos Leiomiomas não usuais e dos Leiomiossarcomas Uterinos.....	34
5.3	Tratamento Adjuvante.....	35
5.4	Avaliação da Expressão Imunoistoquímica do MTOR.....	36
5.5	Avaliação da Expressão Imunoistoquímica do PTEN	38
5.6	Avaliação da Expressão Imunoistoquímica do AKT	38
5.7	Avaliação da Expressão Imunoistoquímica do PI3K.....	38
5.8	Dados do Seguimento	41
5.9	Análise da Sobrevida Global.....	42

5.10	Análise da Sobrevida Livre de Doença.....	51
6	DISCUSSÃO.....	62
7	CONCLUSÕES	71
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72

ANEXOS

Anexo 1 Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP

Anexo 2 Construção do Tissue Microarray

APÊNDICE

Apêndice 1 Protocolo Sarcoma Uterino

1 INTRODUÇÃO

Os sarcomas são grupos de tumores originários de células mesenquimais, representam cerca de 1% das neoplasias malignas. A maioria dos sarcomas apresentam crescimento localmente agressivo e propagação hematogênea à distância (BECK et al. 2009). O leiomiossarcoma (LMS) é o sarcoma de partes moles mais comum, correspondendo a 24% dos sarcomas de partes moles (TORO et al. 2006), é um tumor maligno do músculo liso que apresenta um alto grau de heterogeneidade molecular e caracterizado sua agressividade por altas taxas de recorrência local e metástases; podendo ocorrer em várias localidades como trato ginecológico, vísceras e partes moles (LEE et al. 2009).

Estudos epidemiológicos demonstram que câncer de corpo de útero é o sexto câncer mais comum em mulheres brasileiras, com estimativa de 6.950 casos novos em 2016, o que representa 3,4% de todas as neoplasias malignas feminina (Ministério da Saúde 2016). Os sarcomas uterinos são raros, representando somente 3 a 8% dos tumores malignos do útero (MAJOR e BLESSING 1993; UEDA et al. 2008; TROPÉ et al. 2012), podendo apresentar diferenciação homóloga ou heteróloga. A maioria dos sarcomas uterinos são homólogos, ocorrendo diferenciação a partir de tecido uterino, incluindo endométrio (sarcoma do estroma endometrial), músculo (leiomiossarcoma) e outros (tecido conectivo, vasos sanguíneos ou linfáticos). Em contraste, os sarcomas uterinos heterólogos contém diferenciação de tecidos não presentes originalmente no útero (músculo esquelético, cartilagem, osso).

Em relação aos sarcomas uterinos, o leiomiossarcoma é o subtipo histológico mais comum, seguido dos sarcomas do estroma endometrial de baixo grau, sarcomas do estroma endometrial de alto grau e dos adenossarcomas (BENSON e MIAH 2017). Os leiomiossarcomas uterinos são neoplasias malignas muito agressivas e com alta taxa de recorrência variando de 53% a 71% para os tumores confinados no útero, tendo mau prognóstico e sobrevida global em 5 anos variando de 10-50% (D'ANGELO e PRAT 2010).

As pacientes apresentam como sintoma principal o sangramento uterino, geralmente durante a perimenopausa ou na pós-menopausa e com uma média de idade ao diagnóstico de 50,9 anos (BROOKS et al. 2004; ABELER et al. 2009; DAFOPOULOS et al. 2010). GIUNTOLI (2003), reportou a experiência da Clínica Mayo com 208 pacientes com leiomiossarcomas uterinos, dados colhidos ao longo de um período de 23 anos, sendo o sangramento vaginal o sintoma mais comum (56%), seguido por massa pélvica palpável (54%) e dor pélvica (22%). Foram descritos como fatores de risco: sobreviventes a longo prazo do retinoblastoma hereditário ou radioterapia pélvica prévia. Condições hormonais, assim como o uso de contraceptivos orais não têm sido associados com o desenvolvimento de leiomiossarcoma (KOBAYASHI et al. 2013).

Os leiomiossarcomas podem ainda apresentar-se como hemoperitôneo, extensão extra-uterina ou por metástases à distância. Sintomas e sinais são muito semelhantes ao dos leiomiomas e a distinção pré-operatória pode ser difícil. Suspeita-se de malignidade quando há comportamentos clínicos específicos como crescimento tumoral em mulheres na menopausa e sem reposição hormonal (REED et al. 2003; PERRI et al. 2009).

Estes tumores geralmente surgem como nódulos solitários, volumosos (>10cm) e que invadem a parede uterina, menos frequentemente apresentam lesões nodulares salientes na cavidade endometrial. A maioria dos leiomiossarcomas tem componente intramiometrial e submucoso. Em 5% podem surgir no colo do útero. Eles são muitas vezes mal circunscritos e não podem ser separados do miométrio adjacente, em contraste ao leiomioma. Ao corte, a superfície é macia e freqüentemente associada a áreas de necrose e hemorragia. O diagnóstico freqüentemente é feito pelo patologista após histerectomia primária realizada como sendo um presumível leiomioma, a menos que a doença metastática seja diagnosticada no início. Apesar de diversos relatos em que os leiomiossarcomas podem estar presentes na submucosa do útero em 30-50% dos pacientes, o diagnóstico por biópsia não é facilmente realizado (LEIBSON et al. 1990; MOINFAR et al 2007).

Em relação aos leiomiossarcomas uterinos, o fator prognóstico mais importante é o estágio da doença (Quadro 1). O estadiamento patológico, tamanho do tumor e índice mitótico estão relacionados à sobrevida (D'ANGELO e PRAT 2010; TROPÉ et al. 2012).

Quadro 1 - Estadiamento do leiomiossarcoma uterino

I	Tumor limitado ao útero
Ia	Diâmetro de até 5 cm
Ib	Diâmetro superior a 5 cm
II	Tumor com extensão à pelve
IIa	Acometimento dos anexos
IIb	Acometimento dos tecidos pélvicos extra-uterinos
III	Tumor invade tecidos abdominais
IIIa	Um sítio de acometimento
IIIb	Mais de dois sítios de acometimento
IIIc	Metástase aos linfonodos pélvicos e/ou retroperitoneais
IV	
IVa	Invasão da bexiga e/ou reto
IVb	Metástase à distância

Fonte: D'ANGELO e PRAT (2010).

O tratamento inclui uma combinação de cirurgia e quimioterapia adjuvante com ou sem radioterapia. A cirurgia consta de histerectomia abdominal total, cuidadosa avaliação para disseminação peritoneal e *debulking* tumoral se houver disseminação peritoneal extra-uterina. Ooforectomia e linfadenectomia permanecem controversas, já que metástases para estes órgãos são eventos raros e a ressecção destas estruturas parece não mudar o prognóstico da paciente (LEITÃO et al. 2003; REED et al. 2003; KAPP et al. 2008; TROPÉ et al. 2012). A influência da terapia adjuvante na sobrevida é incerto e a radioterapia parece ser útil no controle local de recorrência. Esquemas de quimioterapia com doxorrubicina ou docetaxel/gemcitabina são utilizados para doença avançada ou recorrente mas com baixas taxas de resposta (27-36%) (DHINGRA et al. 2011). Importante notar que a eficácia do tratamento sistêmico permanece limitada e não existem ainda alvos terapêuticos específicos (GADDUCCI et al. 2008).

Os patologistas podem apresentar dificuldades ao diagnosticar um leiomiossarcoma uterino em relação aos critérios anatomopatológico que definem o diagnóstico de leiomiossarcoma. Os leiomiossarcomas devem ser distinguidos de uma grande variedade de tumores benignos do músculo liso (tabela 2). Os leiomiossarcomas apresentam: atividade mitótica (mais de 10 mitoses por 10 campos de grande aumento), moderada a acentuada atipia celular e necrose coagulativa. O pleomorfismo nuclear, nucleomegalia, irregularidade na membrana nuclear, hipercromatismo e proeminência nuclear observada em pequeno aumento são indicadores de atipia citológica (SILVERBERG e KURMAN 1992, KARPATHIU et al. 2010). A necrose tumoral deve ser diferenciada da necrose tipo infarto, sendo definida como uma transição abrupta entre o tumor viável e a necrose, sem a interposição de uma zona de tecido de granulação ou de colágeno hialinizado. A distribuição perivascular do tumor viável também é uma característica da necrose das células tumorais. No entanto, apesar de critérios bem definidos morfológicos, a distinção entre necrose tumoral e necrose tipo infarto continua sujeita à variabilidade interobservador (CHIANG e OLIVA 2013).

Há algumas entidades clínicas que podem causar dúvidas quanto ao comportamento maligno ou benigno de certas lesões. As variantes das lesões da musculatura uterina são descritas no Quadro 2.

Quadro 2- Variantes morfológicas das lesões uterinas benignas

Leiomioma celular
Leiomioma com nucleo bizarro
Leiomioma mitoticamente ativo
Leiomioma apoplético
Leiomioma lipomatoso (lipoleiomioma)
Leiomioma epitelióide
Leiomioma mixóide
Leiomioma dissecante
Leiomiomatose difusa
Leiomiomatose venosa
Leiomiomatose metastatizante

Fonte: KURMAN et al. (2014).

Os leiomiomas, incluindo suas variantes, são os tumores uterinos mais comuns e usualmente acometem mulheres na quarta e quinta década de vida. A classificação dos leiomiomas apresentou mudanças na última classificação da OMS em 2014, dessa forma, passaram a ser classificados como: leiomiomas, as variantes dos leiomiomas (Quadro 2) e os STUMPs (tumor de musculo liso de potencial maligno incerto). Na nova classificação da OMS de 2014, os leiomiomas atípicos apresentaram-se como sinónimo dos STUMPs. No trabalho realizado, os leiomiomas atípicos foram renomeados como variantes dos leiomiomas (VL) em decorrência na nova classificação proposta pela OMS (KURMAN et al. 2014).

As variantes dos leiomiomas (VL) correspondem a 10% dos casos. Macroscopicamente são múltiplas lesões (> 75% dos casos) podendo ser intramural, submucoso e subseroso. São lesões bem circunscritas, mas não encapsuladas. Variam amplamente em tamanho e caracteristicamente tem uma superfície arredondada, endurecida e esbranquiçada. Áreas de infarto hemorrágico são comuns

particularmente em lesões grandes e podem ser císticas, especialmente nas lesões mixóides (KURMAN et al. 2014).

A categoria intermediária engloba o *Smooth Muscle Tumor of Uncertain Malignant Potential*-STUMP. A categoria STUMP ou leiomioma atípico exclui o diagnóstico benigno do leiomioma, enquanto que os critérios atuais para leiomiossarcoma não são cumpridas. Dada a natureza limítrofe desse diagnóstico histopatológico, a categoria STUMP é um grupo heterogêneo. Estes tumores não podem ser classificados como definitivamente benigno ou maligno. Assim, um pequeno número desses tumores constitui um dilema diagnóstico. A média de idade ao diagnóstico do STUMP é de 45 anos e 80% dos pacientes encontram-se na pré-menopausa. A taxa de recorrência em pacientes com STUMP é de 7%. (KOBAYASHI et al. 2013; KURMAN et al. 2014).

Como exemplo de outras entidades raras de comportamento incerto temos a leiomiomatose intravenosa, a qual é caracterizada por nódulos de células musculares lisas histologicamente benignas e que crescem no interior dos vasos. O tratamento envolve a remoção cirúrgica e o prognóstico é bom já que as recorrências são incomuns. Outra entidade rara da musculatura lisa é o leiomioma metastático benigno, na qual depósitos de tumor de músculo liso são encontrados no pulmão, linfonodos e no peritônio, tendo um aspecto histológico semelhante a um leiomioma benigno. A maioria das mulheres tem uma história de cirurgia pélvica para leiomiomas benignos anos antes destes sítios metastáticos serem reconhecidos. A excisão cirúrgica é o tratamento primário (CLEMENT 1988; KURMAN et al. 2014).

Com base na citogenética, os sarcomas em geral foram divididos em duas classes principais. A primeira classe inclui sarcomas de cariótipos simples,

translocações cromossômicas específicas e perfis bem definidos de expressão. A segunda é caracterizada por histologia pleomórfica, cariótipo complexo e aneuploidia. Este último grupo inclui os dois dos mais comuns subtipos de sarcoma de partes moles: leiomiossarcoma e histiocitoma fibroso maligno, também denominado de sarcoma de alto grau pleomórfico indiferenciado, cuja etiologia molecular ainda é pouco compreendida (GIBAULT et al. 2012; MURRAY et al. 2010). Os leiomiossarcomas uterinos mostram aberrações genéticas múltiplas, variadas e cariótipos muito complexos, muitas vezes aneuploides ou poliplóides (KILDAL et al. 2009; RAISH et al. 2012). Essa heterogeneidade dificulta a identificação de mutações e identificação de possíveis alvos terapêuticos. Embora as mutações pontuais sejam bastante escassas no LMS, seu genoma é caracterizado por grandes amplificações e deleções dispersas, com ganhos de até 15% e perdas de até 45% do genoma (KILDAL et al. 2009; MURRAY et al. 2010). Acredita-se que a diferenciação de células de músculo liso possa ser o alvo para a transformação em leiomiossarcoma, enquanto que a célula de origem para sarcoma de alto grau pleomórfico indiferenciado é desconhecida (GIBAULT et al. 2012).

Mais freqüentemente, os leiomiossarcomas aparecem no útero, retroperitônio ou extremidades, e embora histologicamente indistinguíveis, eles têm diferentes cursos clínicos e resposta aos quimioterápicos. Porém, a base molecular para estas diferenças ainda não está claro.

As vias de progressão do leiomiossarcoma uterino são pouco compreendidas e estudos sugerem a participação das vias do PTEN, Akt e mTOR (GIBAULT et al. 2012). Evidências sugerem ainda o potencial envolvimento da via PI3K-Akt no

desenvolvimento dos sarcomas (XIAO et al. 2001; SUN et al. 2006) e esta via é negativamente regulada pelo PTEN (Figura 1).

A fosfatase e tensina homólogo (PTEN) é uma proteína que, em seres humanos, é codificada pelo gene *PTEN*. O substrato principal do PTEN é o fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3), uma molécula de segundo-mensageiro gerado pela ação de PI3Ks. O PTEN regula negativamente os níveis intracelulares de fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato nas células e funciona como um supressor de tumor ao regular negativamente a via de sinalização Akt / PKB. A deleção da região do cromossomo 10q (contendo o locus *PTEN*) ocasionando inativação desse gene supressor tumoral e, portanto, ativação da via PI3K-Akt foi detectada em leiomiossarcomas humanos podendo estar associada a um comportamento clínico agressivo (HU et al. 2005). HU et al. (2005) relataram que cerca de 59% dos leiomiossarcomas uterinos e extra uterinos apresentam deleção da região cromossômica 10q que contém o gene *PTEN*. Nos pacientes com leiomiossarcoma uterinos, a perda de inibição do PTEN correlacionou-se com uma pior sobrevida livre de doença (CUPPENS et al. 2017). A perda de inibição do PTEN foi ainda sugerida como tendo valor prognóstico em outros tipos de câncer ginecológico (TERAKAWA et al. 2003; MARTINS et al. 2014). Ao lado de seu papel prognóstico, a perda de inibição do PTEN também pode orientar as decisões terapêuticas (CUPPENS et al. 2017).

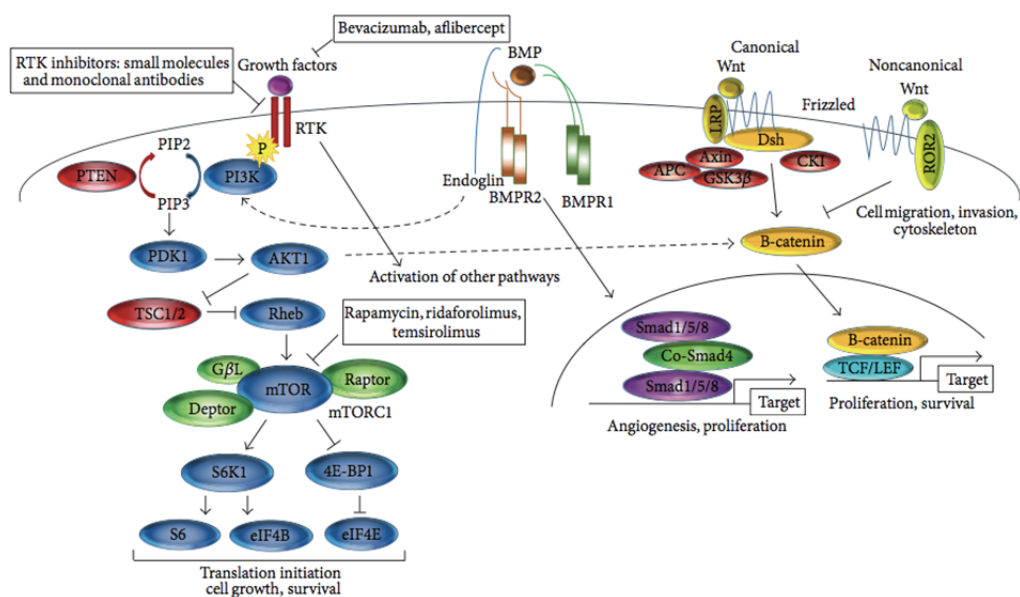
A via PI3K-Akt é uma das principais vias ativadas no câncer estando relacionada a sobrevivência, progressão e inibição da apoptose. A perda de inibição do *PTEN* pode ocorrer devido mutações em um dos alelos, erros transcripcionais, mecanismos epigenéticos ou pós translacionais. Além da perda de inibição pelo

PTEN, a via PI3K-Akt-mTOR também pode ser ativada por outros mecanismos relacionados a fatores de crescimento ligando-se a receptores de tirosina quinases e ativadores do PI3K (Figura 1). O PTEN proporciona desfosforilação de PIP3 para PIP2, o que limita a habilidade de Akt para se ligar à membrana, diminuindo sua atividade (CUPPENS et al. 2015).

O Akt é uma proteína quinase serina/treonina composta de três domínios: (1) o domínio de PH na região N-terminal, (2) o um domínio central catalítico e (3) o domínio regulatório localizado na região C-terminal (VADLAKONDA et al. 2013; PORTA et al. 2014). Os mamíferos contêm três conhecidas como Akt1, Akt2 e Akt3, as quais são expressas ubiquamente, mas com níveis variados entre os diferentes tecidos (OSAKI et al. 2004). O Akt1 está expresso neoplasias gástricas, o Akt2 em neoplasia de ovário, pâncreas e mama. O papel de Akt3 é menos claro, embora pareça estar predominantemente expresso no cérebro. Todas as três isoformas podem ser recrutadas para a membrana por meio do domínio N-terminal PH e, dessa forma, serem capazes de interagir com PIP3 e assim dar continuidade a via PI3K-Akt (MARTELLI et al. 2012).

O PI3K consiste em família de quinases lipídicas distribuídas em quatro classes denominadas de I, II, III e IV as quais são classificadas de acordo com estrutura, função e especificidade ao substrato (VANHAESEBROECK et al. 2012). A PI3K de classe I consiste em dois subgrupos, IA e IB, os quais são heterodímeros constituídos de uma subunidade catalítica e outra regulatória, ativam a via canônica PI3K-Akt e estão relacionada com alterações genéticas, mutações, amplificação gênica e câncer (SAJI et al. 2010). As fosfatidilinositol-3 quinases, PI3Ks, tem a capacidade de fosforilar o grupo 3'-OH do anel de inositol em fosfolípidos de inositol

para gerar o fosfordilinositol-3,4,5-trisfosfato do segundo mensageiro (PI-3,4,5 -P3) no folheto interno da membrana plasmática (OSAKI et al. 2004; PORTA et al. 2014), essencial para a translocação de Akt para a membrana plasmática. Recrutado na membrana plasmática o Akt interage com PIP3 ocorrendo uma alteração conformacional, exposição dos resíduos de treonina 308 (Thr308) e serina 473 (Ser473) sendo fosforilado e ativado por quinase dependente de fosfoinosítide PDK1 e PDK2. A fosforilação simultânea de Thr308 e Ser473 é necessária para a ativação de Akt. A proteína Akt (p-Akt) fosforilada ativada é translocada para o citoplasma ou núcleo, onde irá ainda fosforilar uma série de substratos que podem regular mecanismos, incluindo síntese protéica, transcrição de genes e dessa forma interferindo na sobrevivência, proliferação, crescimento celular, na angiogênese e na apoptose; inativando proteínas pró-apoptóticas, tais como BAD da família Bcl-2 (VIVANCO e SAWYERS 2002). O Akt ativado pode ativar direta e indiretamente o mTOR. O Akt ativa o mTOR através da fosforilação da ser2448 do mTOR e também ao inibir o complexo de esclerose tuberosa complexo 2 (TSC2) e TSC1 (OSAKI et al. 2004). Além disso, a ativação do Akt1 ativa outras importantes vias relacionadas ao câncer, dentre elas a via da β - catetina (CUPPENS et al. 2015).



Fonte: CUPPENS et al. (2015).

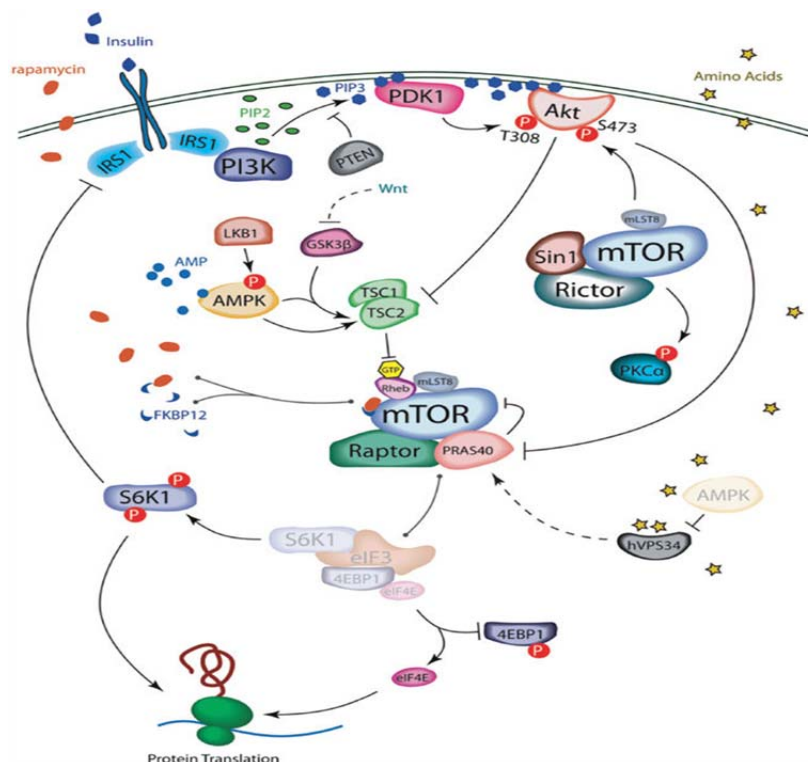
Figura 1 - Via sinalizadora do PI3K-Akt-mTOR

A via de mTOR tem um papel importante nas vias de sinalização celular promovendo a tumorigênese através da fosforilação de proteínas que regulam diretamente a síntese de proteínas, progressão do ciclo celular, o crescimento e a proliferação celular. Estudos têm demonstrado que mTOR ativada leva à fosforilação de p70S6kinase (p70S6K) a treonina 389, a qual contribui para a progressão do ciclo celular de G1 e proliferação de células tumorais (Figura 2) (DHINGRA et al. 2011).

Na célula, o mTOR é encontrado como dois distintos complexos multiproteicos: o mTOR complexo 1 (mTORC1) e mTOR complexo 2 (mTORC2) (Figura 2). O mTORC1 apresenta o componente raptor, enquanto o mTORC2 apresenta o componente rictor. A rapamicina é um inibidor de mTOR, impedindo a tradução do sinal dependente de mTOR. O mTORC1 é rapamicina sensível enquanto mTORC2 é relativamente rapamicina insensível (Figura 3). Além disso, CHEN et al. (2010) demonstraram que mTORC2 é necessário para a progressão do ciclo celular,

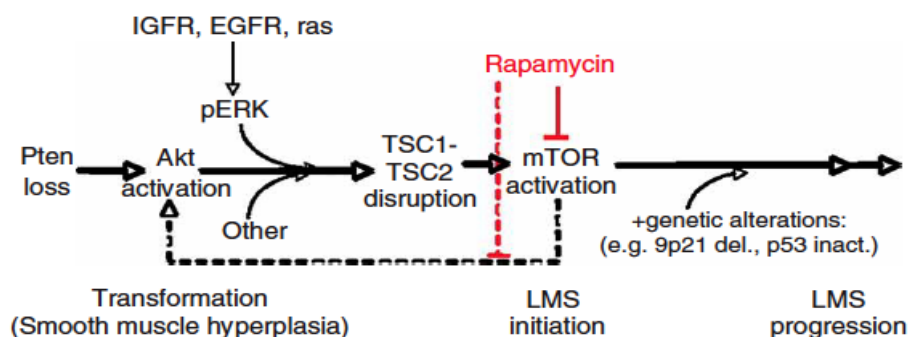
através de mecanismos Akt dependentes. É importante notar que a Akt fosforilada em serina 473 é considerada como efetora de sinalização mTORC2 sendo implicada na tumorigênese. Dessa forma, a identificação da ativação das via tumorigênicas pelo mTORC2 poderia ser um alvo para terapias moleculares de tradução de sinal (DHINGRA et al. 2011).

A desregulação da sinalização do PI3K-Akt-mTOR também tem sido implicada na patogênese e progressão de muitos outros tipos de câncer, tais como as neoplasias de cabeça e pescoço, colo de útero, próstata, fígado, estômago, rim, cérebro, bexiga e mama. A literatura também relata evidências de ativação da via do mTOR em outros tipos de câncer ginecológico como o adenocarcinoma do endométrio. A inativação gênica do *PTEN* em linhagem de músculo liso de rato predispõem as células musculares lisas à transformação, ocasionando ativação constitutiva do mTOR, que foi fortemente associado a gênese do sarcoma proposto no modelo de HERNANDO et al. (2007). A justificativa da sinalização do mTOR como fator necessário para sarcogênese foi sugerida, pela susceptibilidade dos tumores a inibição de mTOR (BJORNSTI e HOUGHTON 2004; MAJUMDER et al. 2004; HERNANDO et al. 2007). No entanto, na literatura há poucos trabalhos sobre a ativação da via mTOR no sarcoma em geral e em leiomiossarcomas uterinos (DHINGRA et al. 2011).



Fonte: YANG e GUAN (2007)

Figura 2 - Via sinalizadora do mTor



Fonte: HERNANDO et al. (2007)

Figura 3 - Modelo proposto da gênese e progressão dos leiomiossarcoma pela ação da rapamicina.

Dessa forma, apesar da sarcogênese dos leiomiossarcomas uterinos ser pouco compreendida alguns estudos experimentais demonstram a possibilidade da participação da via PTEN, PI3K, Akt, e mTOR na gênese dos sarcomas, em geral, motivando a realização desse estudo.

2 OBJETIVOS

- 1 Avaliar as expressões imunoistoquímicas do PTEN, PI3K, Akt e mTOR em leiomiomas, leiomiomas não usuais e em leiomiossarcomas uterinos;
- 2 Correlacionar as expressões imunoistoquímicas do PTEN, PI3K, Akt e mTOR com as variáveis clinico-patológicas nos leiomiossarcomas uterinos;
- 3 Avaliar as expressões imunoistoquímicas do PTEN, PI3K, Akt e mTOR como possíveis fatores prognósticos nos leiomiossarcomas uterinos.

3 CASUÍSTICA E MÉTODO

3.1 DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo de coorte retrospectivo.

3.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Pacientes com leiomiossarcoma uterino e leiomiomas não usuais que foram acompanhadas no Departamento de Ginecologia Oncológica do A.C.Camargo Cancer Center no período de 1982 à 2013. Foram ainda selecionados aleatoriamente uma amostra de casos de leiomiomas uterinos.

3.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- a. Pacientes que já tenham recebido qualquer tratamento neoadjuvante para a neoplasia uterina;
- b. Paciente cujo material anatomopatológico não possibilite a análise imunoistoquímica;
- c. Paciente com diagnóstico de um segundo tumor primário no período de 5 anos após o do diagnóstico de leiomiossarcoma, excluindo câncer de pele não melanoma.

3.4 DESCRIÇÃO DA CASUÍSTICA

Foram identificados 188 casos de pacientes com diagnóstico de sarcomas uterinos tratadas no A.C.Camargo Cancer Center no período de 1982 à 2013. Destes 104 casos eram leiomiossarcomas uterinos. Apenas 76 pacientes com diagnóstico de leiomiossarcomas uterinos foram inicialmente tratadas ou tiveram diagnóstico confirmado por revisão de lâminas na instituição. Dentre as 76 pacientes selecionadas para o estudo, foram excluídas inicialmente 32 pacientes devido a não localização do material e a reclassificação pelo patologista. Dessa forma, a amostra foi constituída por 23 pacientes com leiomiomas 12 pacientes com variantes dos leiomiomas (4 com leiomiomas mitoticamente ativos, 2 com núcleos bizarros e 6 com leiomiomas celular), 4 pacientes com leiomiomas atípicos (STUMP) e 44 pacientes com leiomiossarcomas uterinos (Figura 4). No trabalho realizado, as paciente com diagnóstico de variantes dos leiomiomas e as com diagnóstico de STUMPs foram agrupados para análise estatística, sendo denominados de leiomiomas não usuais (LNU).

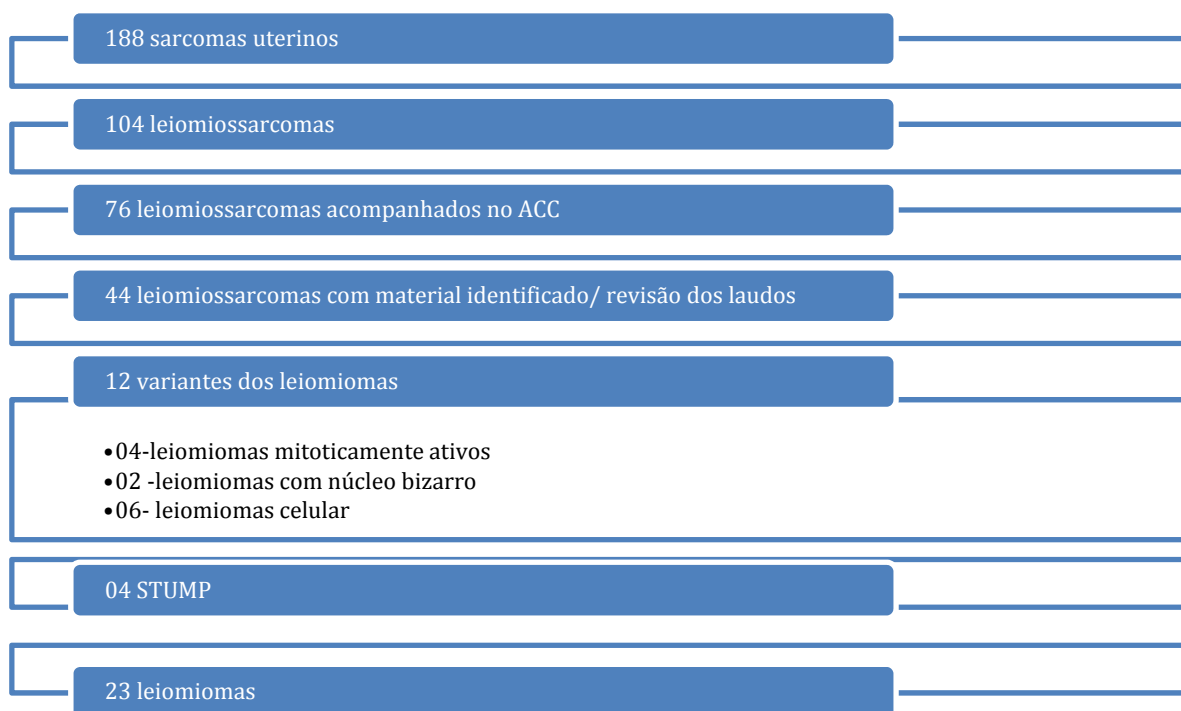


Figura 4 - Fluxograma demonstrando a descrição da casuística (anatomopatológico, A.C.Camargo Cancer Center)

As informações demográficas, do quadro clínico inicial, do tratamento e do seguimento de todas as pacientes diagnosticadas com leiomiossarcomas de útero entre 1982 e 2013 foram a partir da análise retrospectiva dos prontuários médicos.

3.5 FICHA DE REGISTRO DE DADOS

Foi utilizado uma ficha de registro de dados para levantamento dos casos de sarcomas uterinos do Departamento de Ginecologia Oncológica do A.C.Camargo Cancer Center com itens para coleta de informações diversas sobre o paciente, quadro clínico inicial, tratamento, seguimento e resultados da avaliação anatomopatológica (Apêndice 1).

3.6 MÉTODO

Os blocos de parafina contendo os espécimes histopatológicos foram separados e novos cortes realizados. O primeiro corte obtido de cada bloco foi corado pela técnica tradicional de hematoxilina-eosina (HE) e as lâminas foram revisadas por um patologista especializado em ginecologia oncológica e sarcomas (Dra Louise de Brot e Dra Isabela Werneck da Cunha), confirmando o diagnóstico da neoplasia. Os casos foram reclassificados, quando necessário. Para cada caso foi avaliado a presença de necrose (presente ou ausente), celularidade (baixa, moderada, alta), atipia nuclear (leve, moderada, intensa) e índice mitótico (em 10 campos de grande aumento). Os casos de sarcomas de útero indiferenciados ou que geraram dúvidas, foram submetidos a estudo imunoistoquímico para esclarecimento do subtipo histológico e confirmação de leiomiossarcoma. Foi selecionado uma área representativa do tumor para a montagem do TMA.

3.6.1 Construção do *TISSUE MICROARRAY* - TMA

O TMA é um bloco de parafina composto de múltiplos espécimes que podem ser simultaneamente investigados com diferentes técnicas *in situ*, resultando em uma significativa redução de tempo e custo, comparado com estudos histopatológicos convencionais.

A construção do TMA iniciou-se com a seleção dos blocos doadores. Confeccionou-se uma nova lâmina de hematoxilina-eosina (HE) onde se realizou a marcação circular da região de interesse do estudo. A partir desta área pré-definida, o *Tissue Microarrayer* (Beecher Instruments, Silver Spring, MD) foi removido o

cilindro de tecido tumoral do bloco doador, o qual foi inserido em um bloco de parafina receptor. O cilindro de tecido com uma dimensão de 1,0 mm de cada espécie foi puncionado e disposto no bloco de parafina receptor de acordo com as coordenadas cartesianas, separados por espaço de 0,2 mm. Na secção do bloco de TMA resultante foi utilizado um micrótomo manual, com posterior transferência em fita adesiva para lâminas especiais (Instrumedics Inc, Hackensack, NJ). A retirada da fita para exposição à luz ultravioleta e o armazenamento das lâminas cobertas por parafina e embaladas a vácuo em freezer a -20°C concluíram o processo de construção do TMA (Anexo 2). Detalhes do método podem ser vistos na revisão realizada por ANDRADE et al. (2007).

3.6.2 Imunoistoquímica

As lâminas de TMA foram desparafinadas em xilol (2 trocas de 10 minutos cada); depois, passadas em álcool etílico em concentração decrescente (100%, 85% e 75%) e depois lavadas em água corrente por 5 minutos.

A recuperação antigênica por calor foi realizada utilizando panela de pressão em tampão citrato, pH=6,0. Após a recuperação antigênica, as lâminas foram resfriadas e lavadas em 2 banhos de PBS de 5 minutos cada.

A peroxidase endógena foi bloqueada em solução de peróxido de hidrogênio a 3%, com a duração de 20 minutos, sendo 4 trocas de 5 minutos cada. As lâminas, a seguir, foram lavadas em água corrente e um banho de PBS de 5 min. Em seguida os cortes foram incubados com bloqueador de proteínas (DAKO) por 5 minutos, à temperatura ambiente e em câmara úmida. O excesso do bloqueador foi retirado com

lavagem em PBS e os cortes incubados com anticorpo primário, por 60 minutos à temperatura ambiente.

As lâminas foram lavadas em tampão PBS (3 trocas de 5 minutos cada) e, em seguida, incubadas com o anticorpo secundário e com o polímero HRP (Kit Advance-DAKO), durante 30 minutos cada reagente, em câmara úmida, à temperatura ambiente. Após lavagem em PBS, os cortes foram incubados com o cromógeno Diaminobenzidina (DAB - DAKO), por 5 minutos, sendo as lâminas lavadas em água corrente e contracoradas com hematoxilina de Harris, por 2 segundos; lavadas em água corrente, desidratadas em álcool, xilol, e montadas em equipamento automatizado (Tissue-Tek film) (ALVES et al. 1999).

A expressão imunoistoquímica do PTEN foi avaliada no núcleo, sendo categorizada como presente ou ausente. A expressão imunoistoquímica do Akt foi avaliada no núcleo, sendo categorizada como presente ou ausente.

A expressão imunoistoquímica do PI3K foi avaliada segundo a intensidade citoplasmática, sendo considerada: 0 quando não houve expressão; 1+ quando houve expressão de fraca intensidade; 2+ quando houve expressão de moderada intensidade; 3+ quando houve expressão de forte intensidade. Posteriormente a intensidade 0 foi categorizada como expressão negativa e as intensidades 1+ 2+ e 3+ foram agrupadas e categorizadas como expressão positiva.

A expressão imunoistoquímica mTOR foi avaliada segundo a intensidade citoplasmática, sendo considerada: 0 quando não houve expressão; 1+ quando houve expressão de fraca intensidade; 2+ quando houve expressão de moderada intensidade; 3+ quando houve expressão de forte intensidade. Posteriormente as intensidades 0 e 1+ foram agrupadas e consideradas como expressão fraca e as

intensidades 2+ e 3+ consideradas como expressão forte.

A expressão imunoistoquímica do mTOR também foi avaliada no núcleo, sendo considerada negativa quando não houve expressão do mTOR e positiva quando houve qualquer expressão do mTOR.

Os anticorpos primários utilizados tiveram as seguintes especificações:

- **PI3K p85** - Abcam (phospho Y607), polyclonal antibody (ab182651), immunoprecipitation 1/500 - 1/1000.
- **PTEN** - Thermo Scientific - clone 17A, monoclonal antibody, concentration 1:50-1:200.
- **AKT1** - Cell Signaling - clone 2H10, mAb #2967, monoclonal antibody, immunoprecipitation 1: 100.
- **mTor** - Abcam, clone y391 ref ab32028, isotype IgG, monoclonal antibody, immunoprecipitation 1: 400.

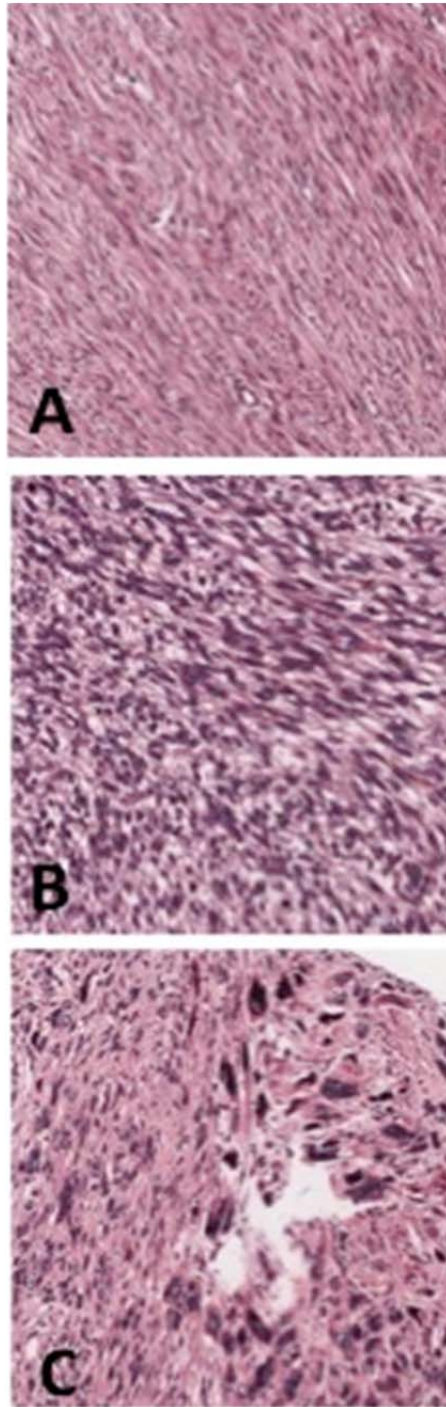


Figura 5 - Fotomicrografia exemplificando a) leiomioma (20x), b) leiomioma celular (40x), c) leiomiossarcoma (20x); hematoxilina e eosina.

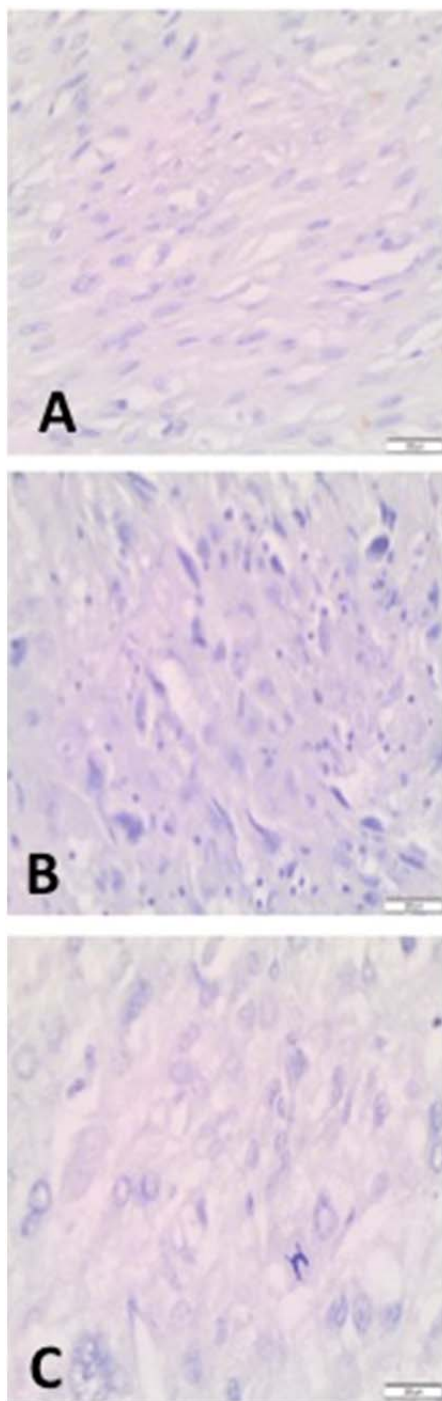


Figura 6 - Fotomicrografia exemplificando a) ausência de expressão imunoistoquímica do Akt1 no núcleo do leiomioma (40x), b) ausência de expressão imunoistoquímica do Akt1 no núcleo do leiomioma não usual (40x), c) ausência de expressão imunoistoquímica do Akt1 no núcleo do leiomiossarcoma (40x).

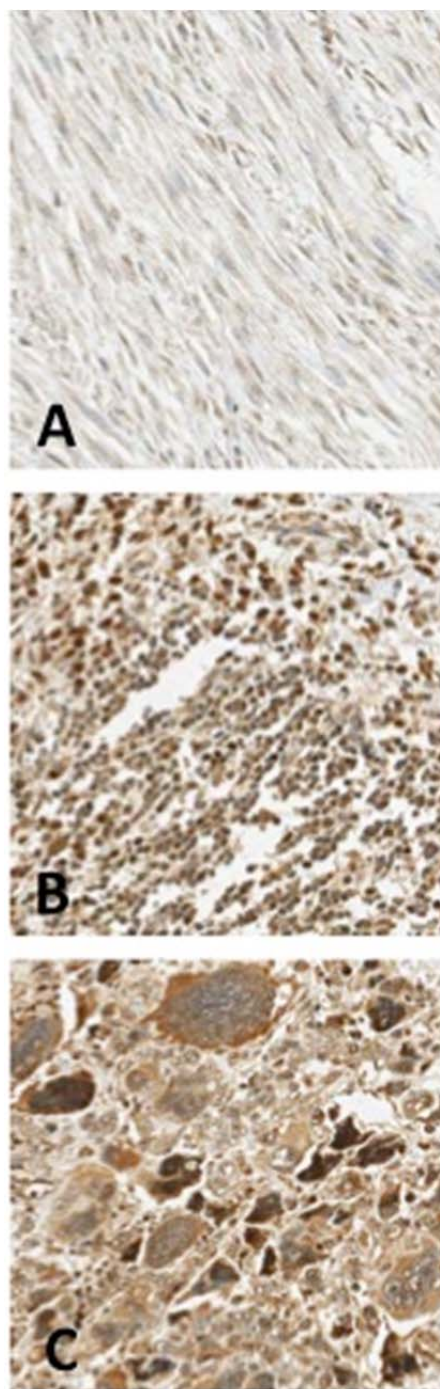


Figura 7 - Fotomicrografia exemplificando a) expressão imunoistoquímica de intensidade fraca (1+) do m-Tor no leiomioma (40x), b) expressão imunoistoquímica de intensidade forte citoplasmática (3+) e nuclear do m-Tor no leiomioma não usual (40x), c) expressão imunoistoquímica intensidade forte citoplasmática (3+) e nuclear do m-Tor no leiomiossarcoma (40x).

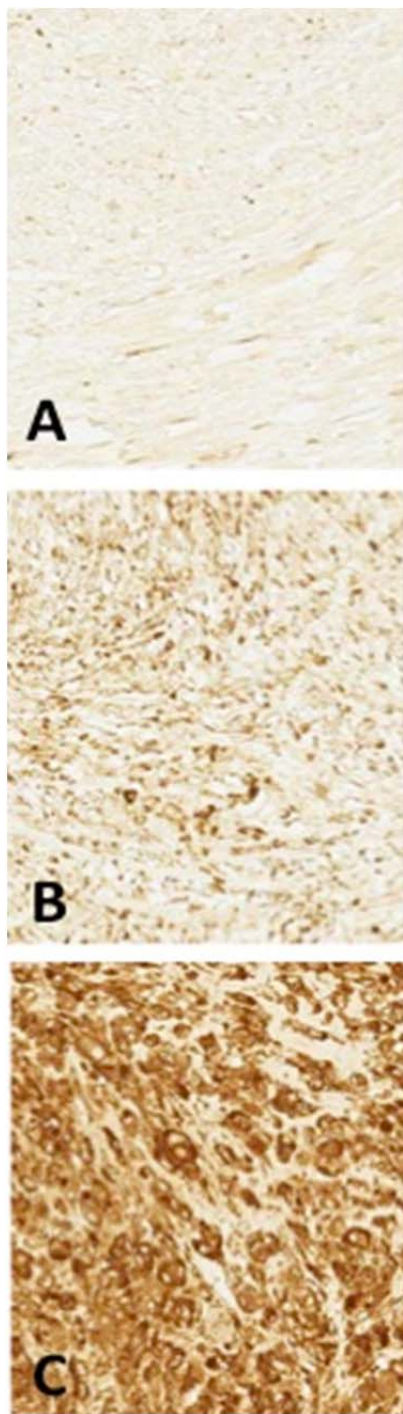


Figura 8 - Fotomicrografia exemplificando a) expressão imunoistoquímica citoplasmática de intensidade fraca (1+) do PI3K no leiomioma (40x), b) expressão imunoistoquímica citoplasmática de intensidade moderada (2+) do PI3K no leiomioma não usual (40x), c) expressão imunoistoquímica citoplasmática de intensidade forte (3+) do PI3K no leiomiossarcoma (40x).

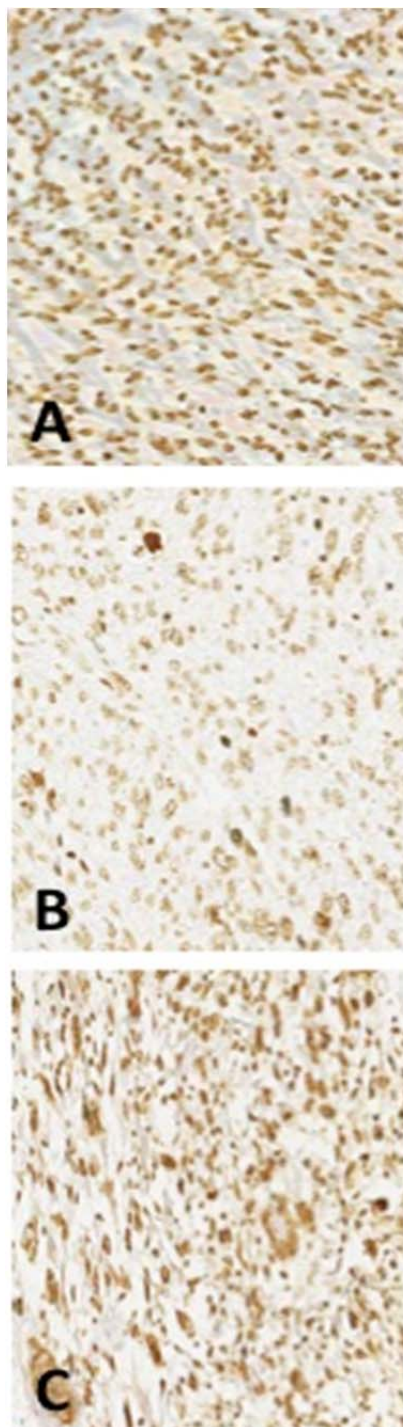


Figura 9 - Fotomicrografia exemplificando a) expressão imunoistoquímica nuclear positiva do PTEN no leiomioma (40x); b) expressão imunoistoquímica nuclear positiva do PTEN no leiomioma não usual (40x); c) expressão imunoistoquímica nuclear positiva do PTEN no leiomiossarcoma (40x).

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados coletados dos prontuários foram transcritos para ficha padronizada e digitados em computador para gerenciamento do banco de dados e análise estatística. A confecção do banco de dados e as análises foram feitas no programa estatístico “*Statistical Package for Social Sciences*” versão 20.0 for Mac (SPSS, Inc., Chicago, IL).

Inicialmente foram calculadas frequências simples de todas as variáveis. As associações entre as variáveis categóricas foram analisadas pelo teste qui-quadrado bi-caudal ou pelo teste exato de Fisher quando pelo menos uma frequência esperada foi menor do que 5. As variáveis não paramétricas foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis.

Definimos como doença restrita ao útero os tumores com estadiamento I e como doença extra-uterina os tumores com estadiamento II, III e IV. Foi utilizado o método de Kaplan-Meier para os cálculos de probabilidade de sobrevida global e livre de doença. A data da cirurgia foi considerada como o momento inicial do seguimento. Para o cálculo do intervalo livre de doença foi considerado como momento final a data da recorrência. Foram excluídas desta análise as mulheres com intervalo livre de doença menor do que 4 meses, por considerar que esta situação corresponde, na maioria das vezes, à persistência de doença e não à recorrência. Também foram excluídas aquelas nos estádios IV para análise de sobrevida livre de doença. Para o cálculo da sobrevida global foi considerado como momento final a data do óbito ou último seguimento. Foi classificado como censura o caso em que

não se registrou óbito ou recorrência e, nesta situação, o momento final da análise correspondeu a data da última informação clínica (KAPLAN e MEIER 1958). Foi utilizado o teste de log-rank para se comparar as curvas de sobrevida entre os grupos.

5 RESULTADOS

5.1 DADOS DEMOGRÁFICOS, CLÍNICOS E CIRÚRGICOS DOS LEIOMIOMAS, LEIOMIOMAS NÃO USUAIS E LEIOMIOSSARCOMAS

A mediana da idade (Tabela 1) das pacientes com leiomioma na amostra estudada foi de 46,9 anos e a mediana do diâmetro das lesões foi de 5,3cm. No caso dos leiomiomas não usuais, a mediana da idade foi de 44,6 anos e a mediana do diâmetro das lesões foi de 9,4cm. Entre os leiomiossarcomas uterinos a mediana de idade foi de 50,2 anos e a mediana do diâmetro das lesões foi de 12,4cm (Tabela 2). Em relação à idade, não houve diferença estatisticamente significativa entre as pacientes com leiomioma, leiomioma não usual e LMS ($p=0,056$). Houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,002$) ao se comparar o tamanho das lesões nas pacientes com leiomioma, leiomioma não usual e LMS; sendo maiores nos leiomiossarcomas.

Tabela 1 - Idade das pacientes de acordo com os tipos histológicos (A.C.Camargo Cancer Center 1982 - 2013).

Tipos Histológicos	Média (anos)	Mediana (anos)	Mínimo (anos)	Máximo (anos)
Leiomiomas	47,08	46,87	26	74
Leiomiomas não usuais	43,38	44,61	27	59
Leiomiiossarcomas	52,96	50,22	27	84

Tabela 2 - Tamanho das lesões de acordo com os tipos histológicos (A.C.Camargo Cancer Center 1982 - 2013).

Tipos Histológicos	Média (mm)	Mediana(mm)	Mínimo (mm)	Máximo(mm)
Leiomiomas	53,87	45,0	12	110
Leiomiomas não usuais	93,87	75,0	25	350
Leiomiiossarcomas	124,32	80,0	10,0	600,0

Os sintomas das pacientes com variantes do leiomioma foram: dor pélvica em 6,7% dos casos, sangramento vaginal em 40% e massa pélvica palpável em 20%. Eram assintomáticas 20% das pacientes. O diagnóstico foi realizado por curetagem em 6,3% dos casos e na grande maioria (87,3%) o diagnóstico foi realizado somente no pós operatório após análise da peça cirúrgica.

As pacientes com leiomiossarcomas apresentaram-se assintomáticas em 11,8% dos casos. Os principais sintomas foram: dor pélvica (29,4%), sangramento vaginal (44,1%), corrimento vaginal (2,9%) e massa pélvica palpável (11,8%). O diagnóstico foi feito por curetagem em 20% dos casos, histeroscopia 2,9% e biópsia de colo em 2,9%. Na grande maioria dos casos (74,3%) o diagnóstico só foi realizado após o

resultado anatomopatológico definitivo. A distribuição dos tipos de cirurgia realizadas nas pacientes encontra-se na Tabela 3.

Tabela 3 - Cirurgias realizadas nas paciente com leiomiossarcomas uterinos. (A.C.Camargo Cancer Center 1982 - 2013).

	N	%
HTA	12	32,4
HTA+ SOB	20	54,1
HTA+ SOB+ Linf Pelvica	2	5,4
HTA+ SOB+ Linf Pelvica e Retrop	1	2,7
Exenteração posterior	1	2,7

HTA: Histerectomia total abdominal; SOB: Salpingooforectomia bilateral; LNP: Linfadenectomia pélvica; LNRP: Linfadenectomia retroperitoneal

As características demográficas, clínicas, cirúrgicas e tratamento das pacientes com leiomiossarcoma estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4 - Características clínicas das pacientes com leiomiossarcomas uterinos (A.C.Camargo Cancer Center 1982 - 2013).

Variáveis	Categorias	N (%)
Idade	≤50 anos	17 (45,9)
	> 50 anos	19 (51,4)
	Ignorado	1 (2,7)
Sintomas	Assintomáticas	4 (11,8)
	Dor pélvica	10 (27,0)
	Sangramento vaginal	15 (40,5)
	Corrimento vaginal	1 (2,7)
	Tumoração pélvica	4 (10,8)
	Ignorado	3 (8,1)
Forma do Diagnóstico	Curetagem uterina	7 (18,9)
	Histeroscopia	1 (2,7)
	Biópsia de colo de útero	1 (2,7)
	Achados pós cirúrgicos	26 (70,3)
	Ignorado	2 (5,4)
Hospital onde foi realizada cirurgia	ACC	16 (43,2)
	Externo	21 (56,8)
Tipo de cirurgia	HTA	1 (2,7)
	HTA + SOB	12 (32,4)
	HTA + SOB + LNP	20 (54,1)
	HTA + SOB + LNP +	2 (2,7)
	LNRP	1 (2,7)
Estadiamento FIGO	I	18(48,6)
	II	6 (16,2)
	III	4 (10,8)
	IV	9 (24,3)
Radioterapia externa *	Sim	6 (16,2)
	Não	29 (78,4)
	Ignorado	2 (5,4)
Braquiterapia *	Sim	4 (10,8)
	Não	31 (83,8)
	Ignorado	2 (5,4)
Quimioterapia *	Sim	16 (43,2)
	Com Adriamicina	6 (16,2)
	Sem Adriamicina	10 (27,0)
	Não	19 (51,4)
	Ignorado	2 (5,4)

*02 casos não havia informação sobre o tratamento adjuvante. ACC - AC Camargo Cancer Center
HTA: Histerectomia total abdominal; SOB: Salpingooforectomia bilateral; LNP: Linfadenectomia pélvica; LNRP: Linfadenectomia retroperitoneal

5.2 VARIÁVEIS ANATOMOPATOLÓGICAS DOS LEIOMIOMAS NÃO USUAIS E DOS LEIOMIOSSARCOMAS UTERINOS

As características anatomopatológicas das pacientes com leiomiomas não usuais e leiomiossarcoma de útero estão relacionadas nas Tabelas 5 e 6, respectivamente.

Tabela 5 - Características anatomopatológicas das pacientes com leiomiomas não usuais (A.C.Camargo Cancer Center 1982 - 2013).

Variáveis	Categorias	N (%)
Mitose (M/10 CGA)	≤ 10	13 (81,3)
	> 10	3 (18,8)
Atipia	Leve /Moderada	15 (93,8)
	Intensa	1 (6,3)
Celularidade	Baixa/moderada	6 (37,5)
	Alta	10 (62,5)
Tamanho	≤ 10 cm	10 (66,7)
	> 10 cm	5 (33,3)
Necrose coagulativa	Presente	1 (6,3)
	Ausente	12 (75)
	Inclassificável	3 (18,8)

M: mitoses; CGA: campos de grande aumento

Tabela 6 - Características anatomopatológicas das pacientes com leiomiossarcomas uterinos (A.C.Camargo Cancer Center 1982 - 2013).

Variáveis	Categorias	N (%)
Mitoses (M/10 CGA)	≤ 20	13 (35,1)
	> 20	24 (64,9)
Atipia	Leve e moderada	18 (48,6)
	Intensa	19 (51,4)
Celularidade	Baixa/moderada	12 (32,4)
	Alta	25 (67,6)
Tamanho	≤ 10 cm	13 (35,1)
	> 10 cm	12 (32,4)
	Ignorado	12 (32,4)
Necrose	Presente	34 (91,9)
	Ausente	3 (8,1)

M: mitoses; CGA: campos de grande aumento

5.3 TRATAMENTO ADJUVANTE

Dentre as pacientes com leiomiossarcomas estágio I, 25,0% foram submetidas a quimioterapia e 18,8% a radioterapia adjuvante. Nos estádios mais avançados (III e IV) 77,7% dessas pacientes foram submetidos a quimioterapia (Tabelas 7 e 8).

Tabela 7 - Relação entre estadiamento e radioterapia das pacientes com leiomiiossarcomas uterinos (A.C.Camargo Cancer Center 1982 - 2013).

		Estadio I	Estadio II	Estadio III/IV
		N (%)	N (%)	N (%)
Radioterapia**	Não	13 (81,2)	7 (70)	9 (100)
	Sim	3 (18,8)	3 (30)	0 (0)
	Total*	16 (100)	10 (100)	9 (100)

*2 casos não havia informação sobre o tratamento adjuvante

**Radioterapia externa

Tabela 8 - Relação entre estadiamento e quimioterapia das pacientes com leiomiiossarcomas uterinos (A.C.Camargo Cancer Center 1982 - 2013).

		Estadio I	Estadio II	Estadio III/IV
		n (%)	n (%)	n (%)
Quimioterapia*	Não	12 (75,0)	5 (50)	2 (22,2)
	Sem Adria**	4 (25,0)	3 (30,0)	3 (33,3)
	Com Adria**	0	2 (20,0)	4 (44,4)
	Total	15 (100)	10 (100)	8 (100)

* 02 casos não havia informação sobre o tratamento adjuvante

**Adriamicina

5.4 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DO mTOR

Considerando os tipos histológicos leiomiomas, leiomiomas não usuais e leiomiiossarcomas, as expressões imunoistoquímicas citoplasmática do mTor foram:

Para os leiomiomas: expressão fraca em 19 casos (82,6%), expressão forte em 4 casos (17,4%). Para os leiomiomas não usuais: expressão fraca em 8 casos

(53,3%), expressão forte em 7 casos (46,7%). Para os leiomiossarcomas: expressão fraca em 17 casos (58,6%), expressão forte em 12 casos (41,4%).

Quando agrupados os casos de leiomiomas não usuais com os leiomiossarcomas, houve expressão aumentada em relação aos leiomiomas (17,4% vs. 43,2%; $p=0.035$) (Tabela 13).

Não houve correlação entre as variáveis clínicas e patológicas com a expressão do mTOR nos leiomiossarcomas (Tabela 9).

Tabela 9 - Correlação das expressões imunoistoquímicas citoplasmática do mTOR com as variáveis clínico patológicas nos leiomiossarcomas uterinos. (A.C.Camargo Cancer Center 1982 - 2013)

Variável	Categoria	Expressão de mTOR		p
		Fraca	Forte	
Idade	≤50 anos	9 (69,2%)	4 (30,8%)	0,390
	>50 anos	8 (53,3%)	7 (46,7%)	
Estádio	I	6 (46,2%)	7 (53,8%)	0,261
	II	3 (50%)	3 (50%)	
	III	4 (100%)	0 (0%)	
	IV	4 (66,7%)	2 (33,3%)	
Índice mitótico	≤10/10CGA	3 (60,0%)	2 (40,0%)	0,945
	>10/10CGA	14 (58,3%)	10 (41,7%)	
Tamanho do tumor	≤5cm	2 (100%)	0 (0%)	0,156
	>5cm	8 (47,1%)	9 (52,9%)	
Celularidade	Baixa/Moderada	6 (60,0%)	4 (40,0%)	0,913
	Alta	11 (57,9%)	8 (42,1%)	
Atipia	Grau 1+2	8 (57,1%)	6 (42,9%)	0,876
	Grau 3	9 (60,0%)	6 (40,0%)	

5.5 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DO PTEN

Obtivemos expressão imunoistoquímica nuclear positiva do PTEN em todos os tipos histológicos estudados (leiomiomas, leiomiomas não usuais e leiomiossarcomas). Para a confirmação desses resultados foram realizados novos cortes no TMA e confirmado o controle negativo.

5.6 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DO Akt

Obtivemos expressão imunoistoquímica nuclear negativa do Akt em todos os tipos histológicos estudados (leiomiomas, leiomiomas não usuais e leiomiossarcomas). Para a confirmação desses resultados foram realizados novos cortes no TMA e confirmado o controle positivo.

5.7 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DO PI3K

Considerando os tipos histológicos leiomiomas, leiomiomas não usuais e leiomiossarcomas as expressões imunoistoquímicas citoplasmático do PI3K foram:

Para os leiomiomas: expressão negativa em 7 casos (35,0%) e expressão positiva em 13 casos (65,0%).

Para os leiomiomas não usuais: expressão negativa em 3 casos (37,5%) e expressão positiva em 5 casos (62,5%).

Para os leiomiossarcomas: expressão negativa em 9 casos (37,5%) e expressão positiva em 15 casos (62,5%).

Não houve correlação entre a expressão imunoistoquímica do PI3K com as variáveis clínicas e patológicas nos leiomiossarcomas (Tabela 10).

Tabela 10 - Correlação das expressões imunoistoquímicas citoplasmática do PI3K com as variáveis clínico patológicas nos leiomiossarcomas uterinos. (A.C.Camargo Cancer Center 1982 - 2013)

Variável	Categoria	Expressão de PI3K		p
		Negativo	Positivo	
Idade	<=50 anos	3 (30,0%)	7 (30,8%)	0,673
	>50 anos	5 (38,5%)	8 (61,5%)	
Estádio	I	3 (23,1%)	10 (76,9%)	0,452
	II,	3 (60%)	2 (40%)	
	III	2 (50%)	2 (50%)	
	IV	1 (50%)	1 (50%)	
Índice mitótico	≤15/10CGA	1 (14,3%)	6 (85,7%)	0,132
	>15/10CGA	8 (47,%)	9 (52,9%)	
Tamanho do tumor	≤10cm	2 (25,0%)	6 (75,0%)	0,402
	>10cm	4 (44,4%)	5 (55,6%)	
Celularidade	Baixa/Moderada	2 (25,0%)	6 (75,0%)	0,371
	Alta	7 (43,8%)	9 (56,2%)	
Atipia	Grau 1+2	4 (30,8%)	9 (69,2%)	0,459
	Grau 3	5 (45,5%)	6 (54,5%)	

Tabela 11 - Correlação da expressão imunoistoquímica citoplasmático do mTor comparando os tipos histológicos leiomiomas com os leiomiomas não usuais ($p=0,073$). (A.C.Camargo Cancer Center 1982 - 2013)

		Expressão imunoistoquímica do mTOR		Total
		Fraca	Forte	
Leiomioma	N	19	4	23
	%	82,6%	17,4%	100%
Leiomiomas não usuais	N	8	7	15
	%	53,3%	46,7%	100%
Total	N	27	11	38
	%	71,1%	28,9%	100%

Tabela 12 - Correlação das expressões imunoistoquímica citoplasmático do mTor comparando os tipos histológicos leiomiomas não usuais com os leiomiossarcomas ($p=0,73$) (A.C.Camargo Cancer Center 1982 - 2013).

		Expressão imunoistoquímica do mTOR		Total
		Fraca	Forte	
Leiomiomas não usuais	N	8	7	15
	%	53,3%	46,7%	100%
Leiomiossarcoma	N	17	12	29
	%	58,6%	41,4%	100%
Total	N	25	19	44
	%	56,8%	43,2%	100%

Tabela 13 - Correlação das expressões imunoistoquímica citoplasmático do mTor comparando os tipos histológicos leiomiomas com leiomiomas não usuais /leiomiossarcomas ($p=0,035$) (A.C.Camargo Cancer Center 1982 - 2013).

		Expressão imunoistoquímica do mTOR		Total
		Fraca	Forte	
Leiomioma	N	19	4	23
	%	82,6%	17,4%	100%
LNU +LMS	N	25	19	44
	%	56,8%	43,2%	100%
Total	N	44	23	67
	%	65,7%	34,3%	100%

LMS-leiomiossarcoma; LNU- leiomioma não usual

Tabela 14 - Correlação das expressões imunoistoquímica citoplasmático do PI3K comparando os tipos histológicos leiomiomas com leiomiomas não usuais (p= 1,0) (A.C.Camargo Cancer Center 1982 - 2013).

		Expressão imunoistoquímica PI3K		Total
		Negativo	Positivo	
Leiomioma	N	7	13	20
	%	35,0%	65,0%	100%
Leiomiomas não usuais	N	3	5	8
	%	37,5%	62,5%	100%
Total	N	10	18	28
	%	35,7%	64,3%	100%

Tabela 15 - Correlação da expressão imunoistoquímica citoplasmático do PI3K comparando os tipos histológicos leiomiomas não usuais com os leiomiossarcomas (p=1,0) (A.C.Camargo Cancer Center 1982 - 2013).

		Expressão imunoistoquímica PI3K		Total
		Negativo	Positivo	
Leiomiomas não usuais	N	3	5	8
	%	37,5%	62,5%	100%
Leiomiossarcoma	N	9	15	24
	%	37,5%	62,5%	100%
Total	N	12	20	32
	%	35,7%	64,3%	100%

5.8 DADOS DO SEGUIMENTO

O seguimento mediano das pacientes com leiomiossarcomas foi de 21,2 meses, variando entre 1 a 237,9 meses. Das 37 pacientes do estudo com diagnóstico de leiomiossarcomas de útero, 32,4% não apresentaram recidiva, 43,2% apresentaram recidiva e 9 pacientes (24,3%) apresentaram persistência da doença por serem estágio clínico IV. Das pacientes que apresentaram recidivas, 8 (42,1%) apresentaram recidivas pélvicas, 9 (47,4%) à distância e 2 (10,5%) apresentaram recidivas pélvicas e à distância. O tempo médio para recidiva foi de 16 meses e

mediano de 12 meses, variando de 4,6 a 69 meses. A situação final das pacientes está resumida na Tabela 16.

Tabela 16 - Situação final das pacientes com leiomiossarcomas uterinos (A.C.Camargo Cancer Center 1982 - 2013).

Situação	n (%)
Vivo sem doença	6 (16,2)
Vivo com doença	2 (5,4)
Morte pela doença	24 (64,9)
Morte pelo tratamento	1 (2,7)
Morte pós operatória *	1 (2,7)
Morte por outras causas	2 (5,4)
Perdido do seguimento	1 (2,7)
Total	37 (100)

Morte em período < 30 dias após a cirurgia

5.9 ANÁLISE DA SOBREVIDA GLOBAL

A sobrevida global mediana foi de 24,0 meses para pacientes portadoras de leiomiossarcomas uterinos.

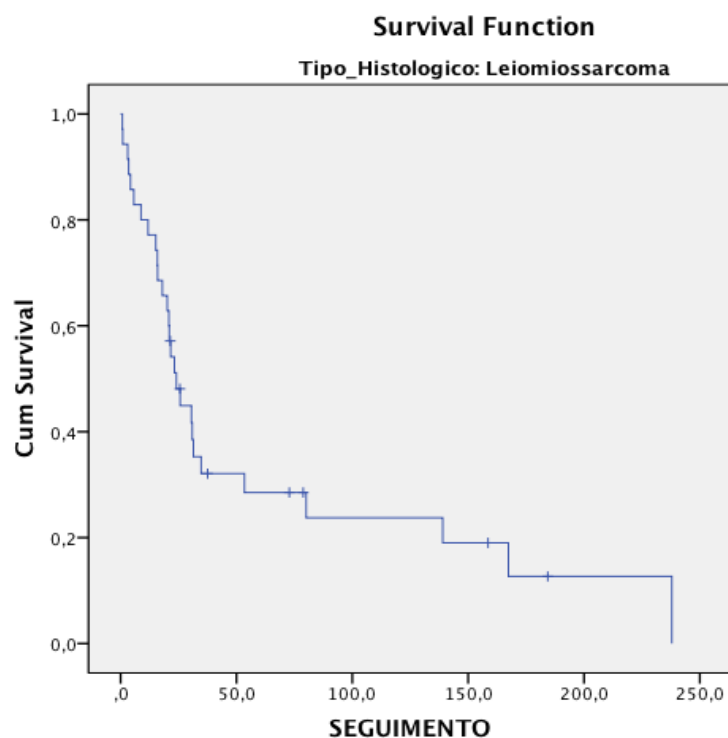


Figura 10 - Curva de sobrevida global nos leiomiossarcomas uterinos. (A.C.Camargo Cancer Center 1982 - 2013).

A sobrevida global mediana do estádio I foi de 80 meses, II de 15,9 meses, III de 5,7 meses e IV de 11,8 meses. Não houve diferenças estatisticamente significativa quando comparados os estádios II, III e IV. Quando agrupados os casos de doença extra-uterina (estádios II, III e IV), a sobrevida mediana foi de 15,8 meses, com diferença significativa quando comparado ao estágio I ($p < 0.001$) (Figuras 11 e 12)

As outras variáveis clínico-patológicas não tiveram impacto em sobrevida (Tabela 17).

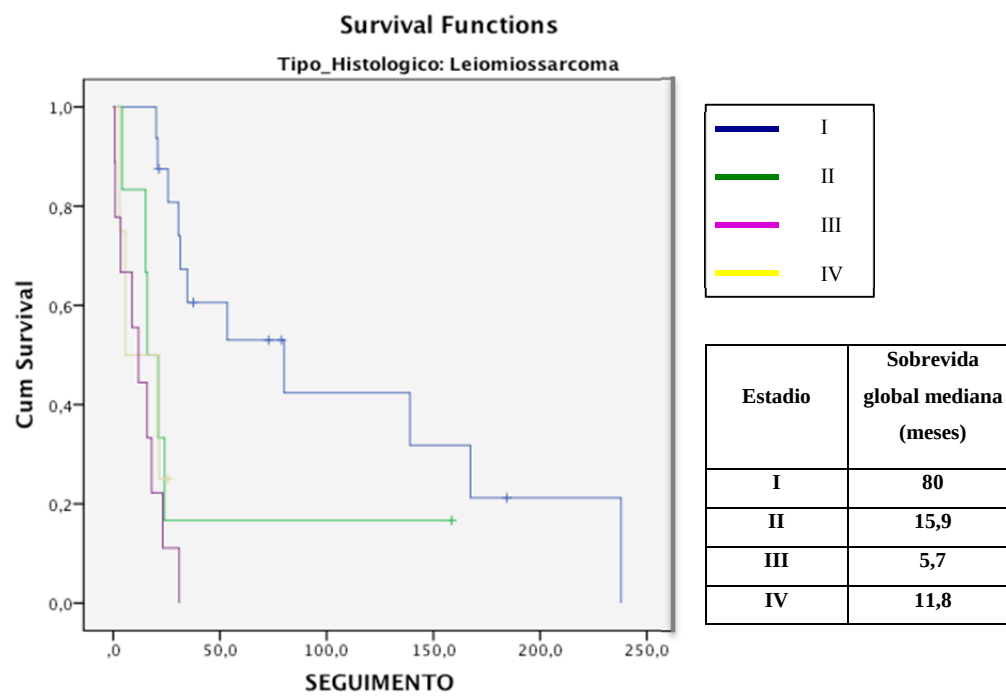


Figura 11 - Curvas de sobrevida global dos leiomiiossarcomas uterinos por estadiamento ($p=0,08$) (A.C.Camargo Cancer Center 1982 - 2013).

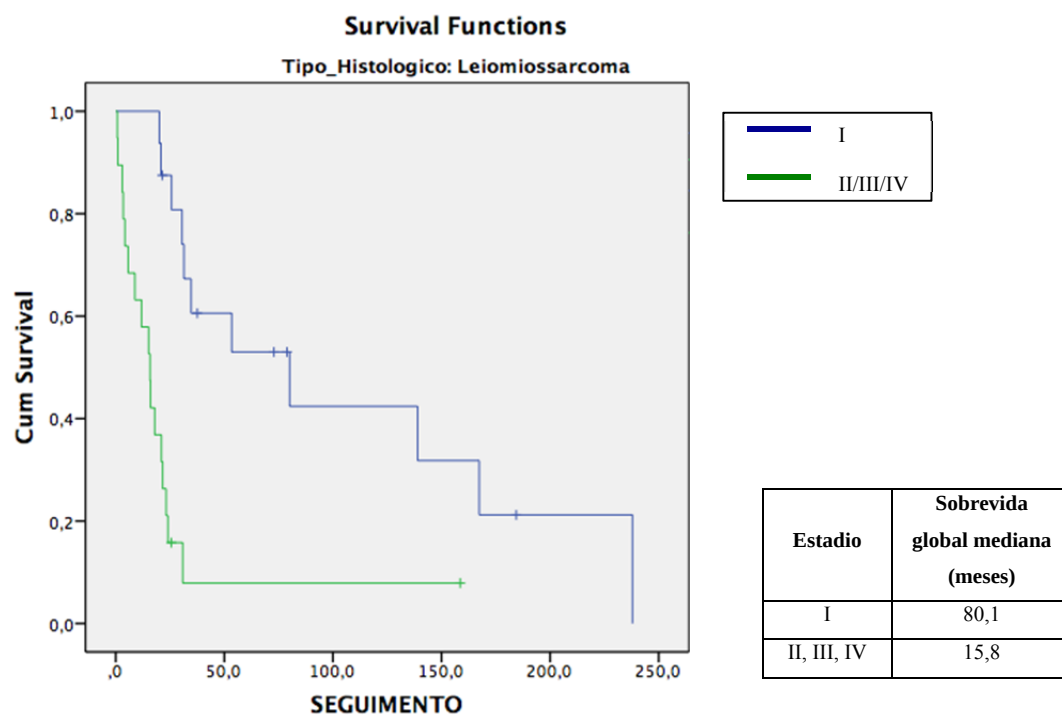


Figura 12 - Curvas de sobrevida global dos leiomiossarcomas uterinos considerando doença restrita ao útero (estádio I) e doença extra-uterina (estádios II, III, IV) ($p < 0,001$) (A.C.Camargo Cancer Center 1982 - 2013).

Tabela 17 - Correlação dos dados clínicos, tratamentos e anatomopatológico com a sobrevida global mediana nos leiomiossarcomas uterinos (A.C.Camargo Cancer Center 1982 - 2013).

Variável	Categoria	SG (meses)	p
Idade	≤ 50 anos	25,69	0,554
	> 50 anos	23,22	
Atipia celular	Graus 1+2	23,22	0,697
	Grau 3	25,69	
Mitose	≤ 10/CGA	80,10	0,142
	> 10/CGA	21,02	
Tamanho da neoplasia	≤10 cm	31,41	0,253
	>10 cm	21,61	
Celularidade	Baixa/moderada	30,85	0,626
	Alta	21,02	
Expressão mTOR (citoplasmática)	Fraco	20,82	0,091
	Forte	31,41	
Expressão PI3K (citoplasmática)	Negativa	15,16	0,23
	Positiva	34,70	

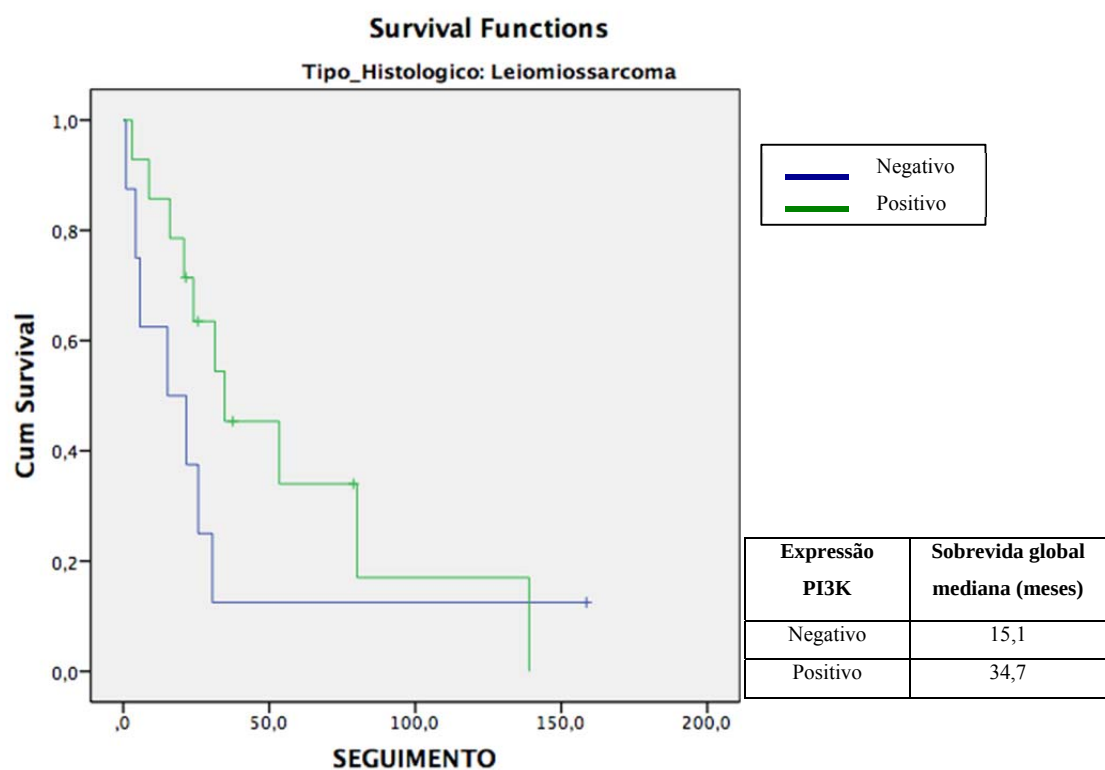


Figura 13 - Curvas de sobrevida global dos casos de leiomiossarcomas uterinos segundo expressão imunoistoquímica do PI3K ($p=0,23$) (A.C.Camargo Cancer Center 1982 - 2013).

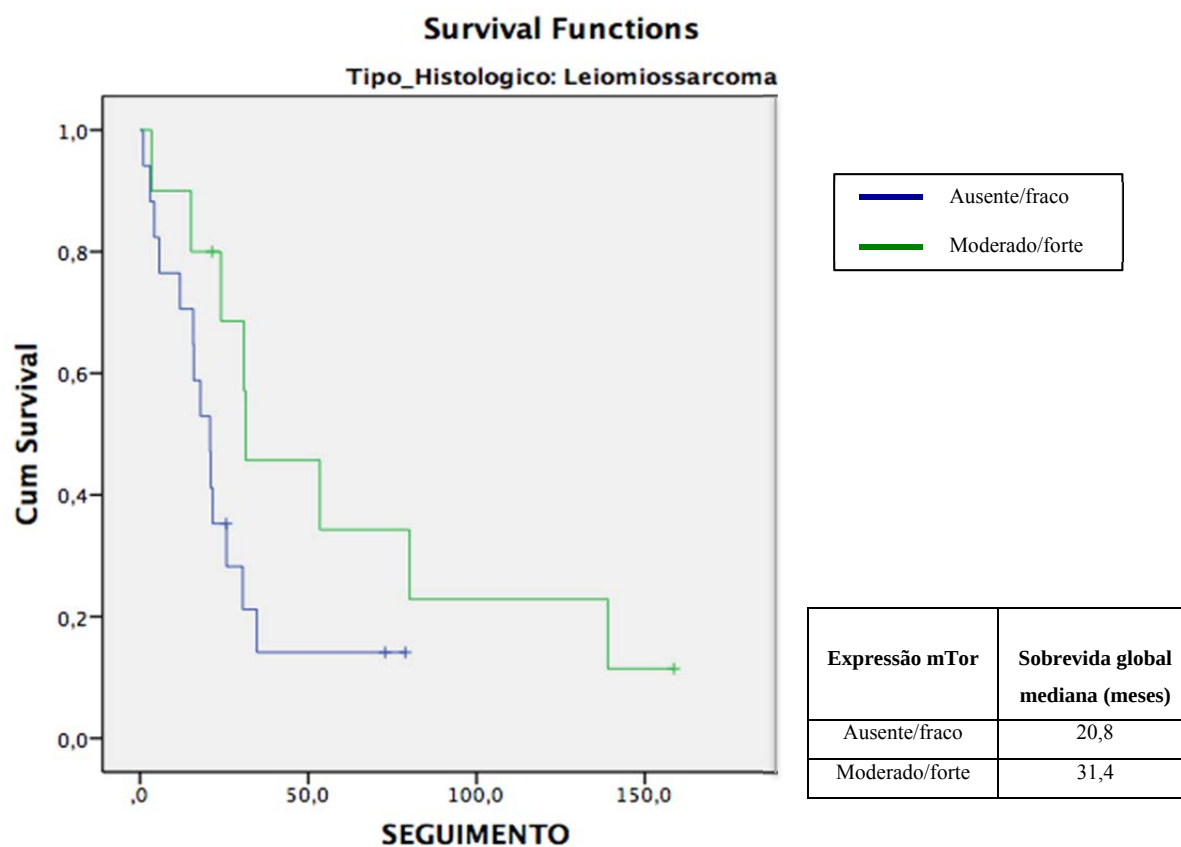


Figura 14 - Curvas de sobrevida global dos casos de leiomiiossarcomas uterinos segundo expressão imunoistoquímica citoplasmática do mTOR ($p=0,091$) (A.C.Camargo Cancer Center 1982 - 2013).

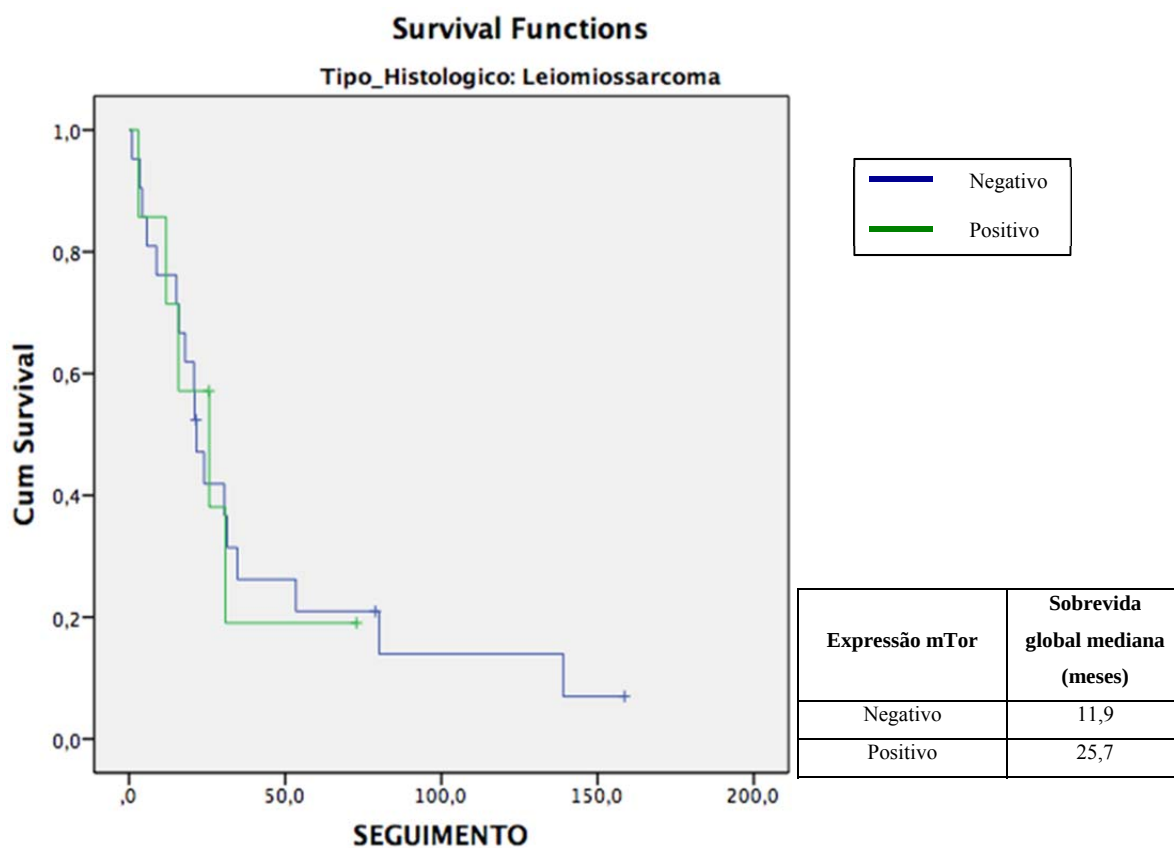


Figura 15 - Curvas de sobrevida global dos casos de leiomiiossarcomas uterinos segundo expressão imunoistoquímica nuclear do mTOR ($p= 0,52$) (A.C.Camargo Cancer Center 1982 - 2013).

Tabela 18 - Correlação da expressão imunoistoquímica citoplasmática do mTor por estadiamento com a sobrevida global mediana nos leiomiossarcomas uterinos. (A.C.Camargo Cancer Center 1982 - 2013).

Estádio FIGO	Expressão do mTor	Mediana	<i>p</i>
I	Fraca	30,53	0,37
	Forte	53,42	
II, III, IV	Fraca	15,82	1,94
	Forte	24,05	
GLOBAL		24,05	

A expressão imunoistoquímica citoplasmática do mTOR também não tiveram impacto em sobrevida na doença restrita ao útero (estádio I) e na doença extra-uterina (estadio II/III/IV) (Tabela 18).

Tabela 19 - Correlação da expressão imunoistoquímica citoplasmática PI3K por estadiamento com a sobrevida global mediana nos leiomiossarcomas uterinos (A.C.Camargo Cancer Center 1982 - 2013).

Estádio FIGO	PI3K	Mediana	<i>p</i>
I	Negativa	25,6	0,025
	Positiva	53,4	
II, III, IV	Negativa	5,7	0,619
	Positiva	15,9	
Global		24,7	

No estágio I, a expressão imunoistoquímica negativa do PI3K teve impacto negativo em sobrevida global ($p=0,025$). No caso de presença de doença extra-uterina (estádios II, III e IV), a expressão imunoistoquímica do PI3K não teve impacto prognóstico ($p=0,619$) (Tabela 19).

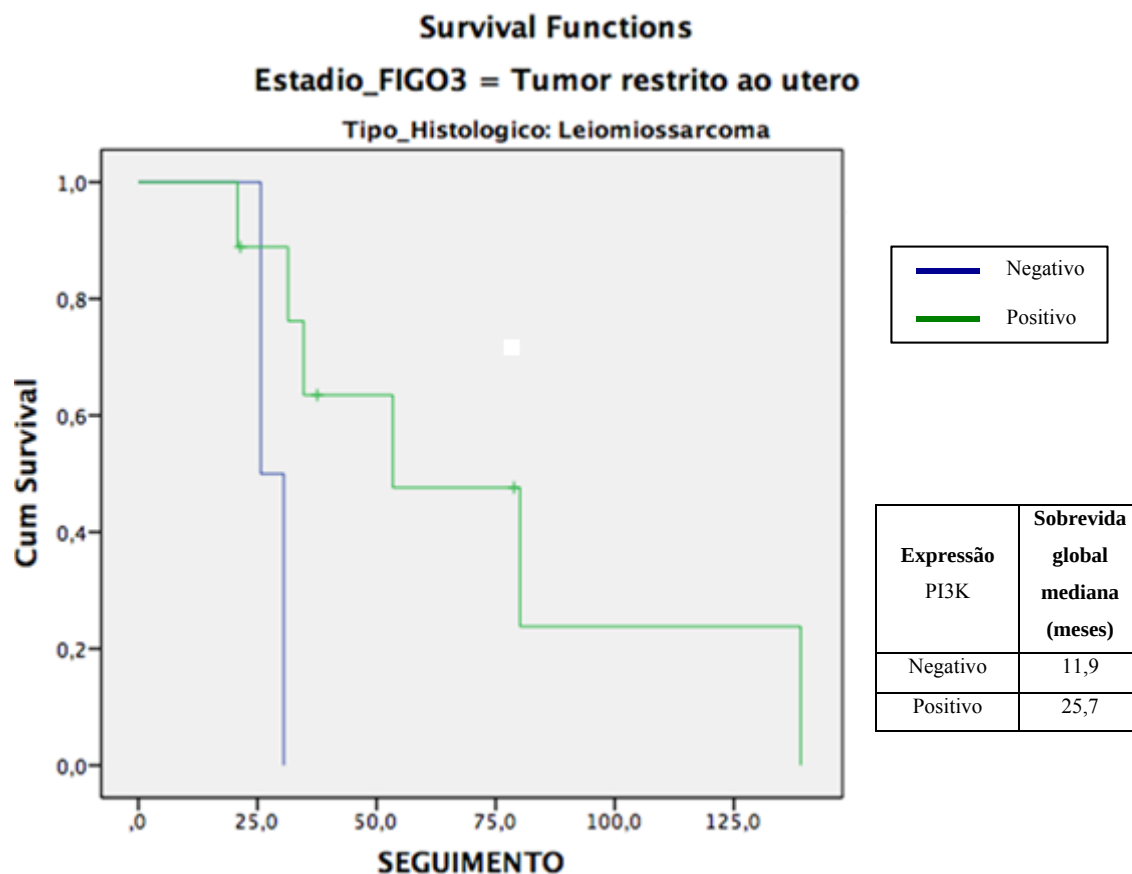


Figura 16 - Curvas de sobrevida global dos casos de leiomiossarcomas uterinos estágio I conforme expressão de PI3K ($p=0,025$) (A.C.Camargo Cancer Center 1982 - 2013).

5.10 ANÁLISE DA SOBREVIDA LIVRE DE DOENÇA

Foram excluídas nesta avaliação as pacientes com leiomiossarcomas com metástase visceral inicial, totalizando 27 pacientes. A taxa de sobrevida livre de doença em 2 anos foi de 34% e a mediana foi de 16,9 meses.

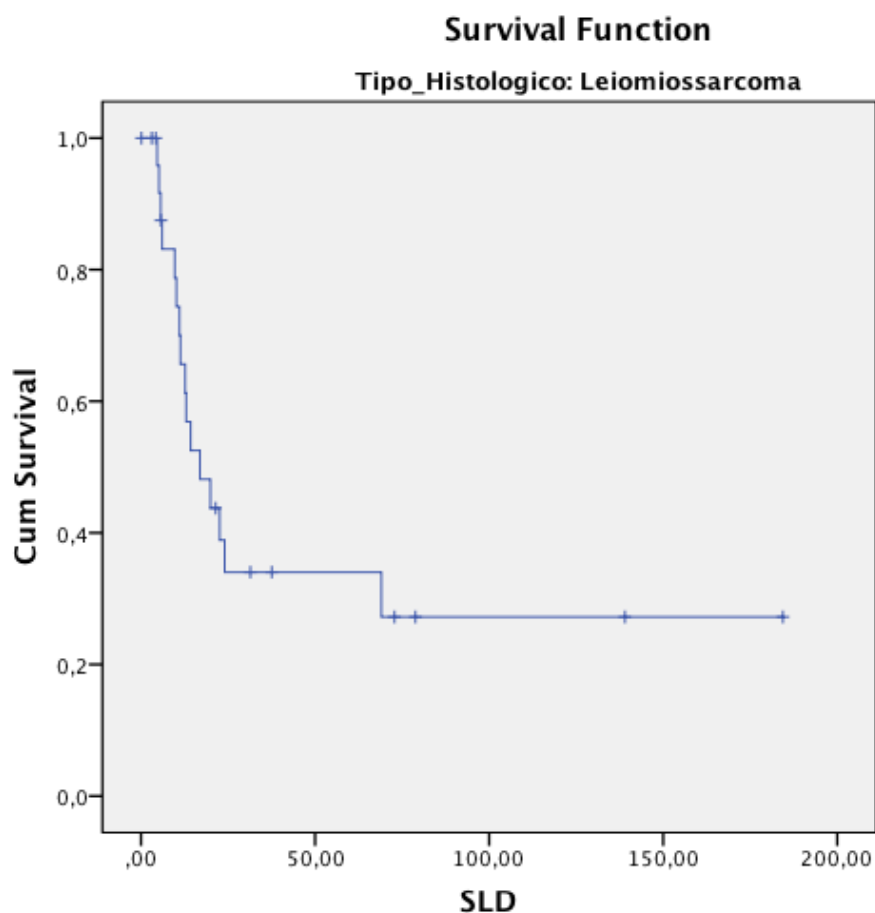


Figura 17 - Curva de sobrevida livre de doença dos leiomiossarcomas uterinos. (A.C.Camargo Cancer Center 1982 - 2013).

O estágio do tumor teve impacto em sobrevida livre de doença. As pacientes com diagnóstico de leiomiossarcomas estágio I tiveram sobrevida livre de doença mediana de 24,1 meses. No caso dos estágios II e III a sobrevida livre de doença mediana foi de 11,05 meses e nenhuma paciente apresentou-se livre de doença após 2 anos ($p=0,02$) (Figura 18).

O índice mitótico teve impacto em sobrevida livre de doença, sendo as pacientes portadoras de $IM > 20/10cGA$ apresentaram sobrevida mediana de 12,9 meses em comparação com $IM \leq 20/10cGA$ que tiveram sobrevida mediana de 69 meses ($p=0.041$) (Figura 19).

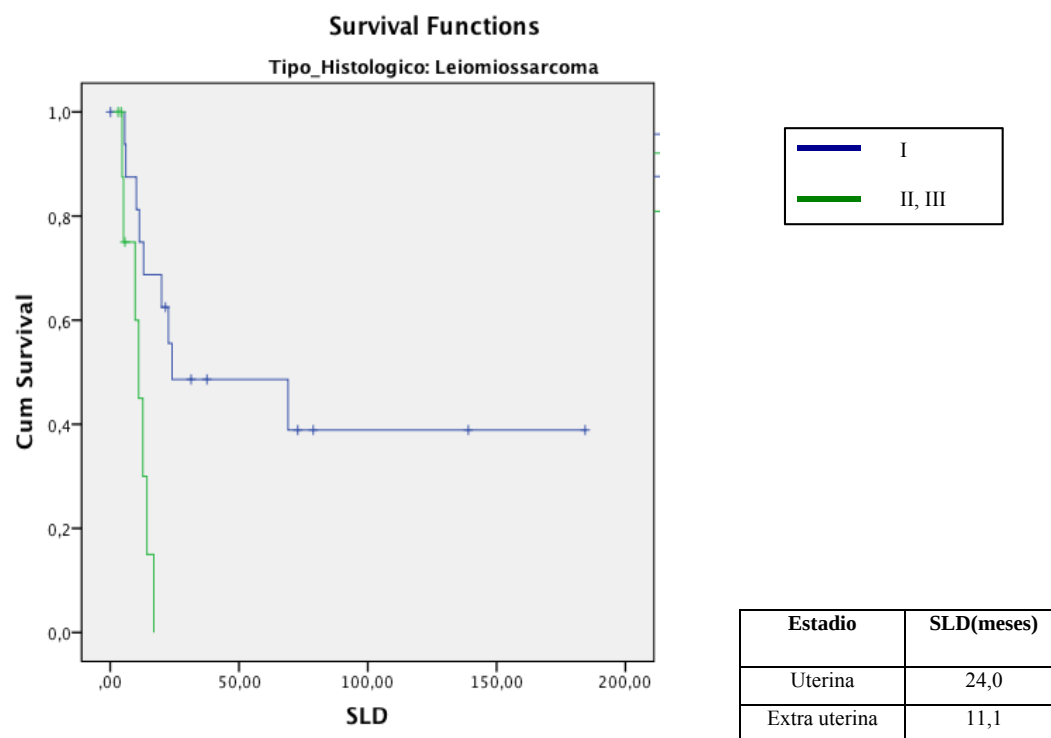


Figura 18 - Curvas de sobrevida livre de doença dos leiomiiossarcomas uterinos por estadiamento ($p=0,02$) (A.C.Camargo Cancer Center 1982 - 2013).

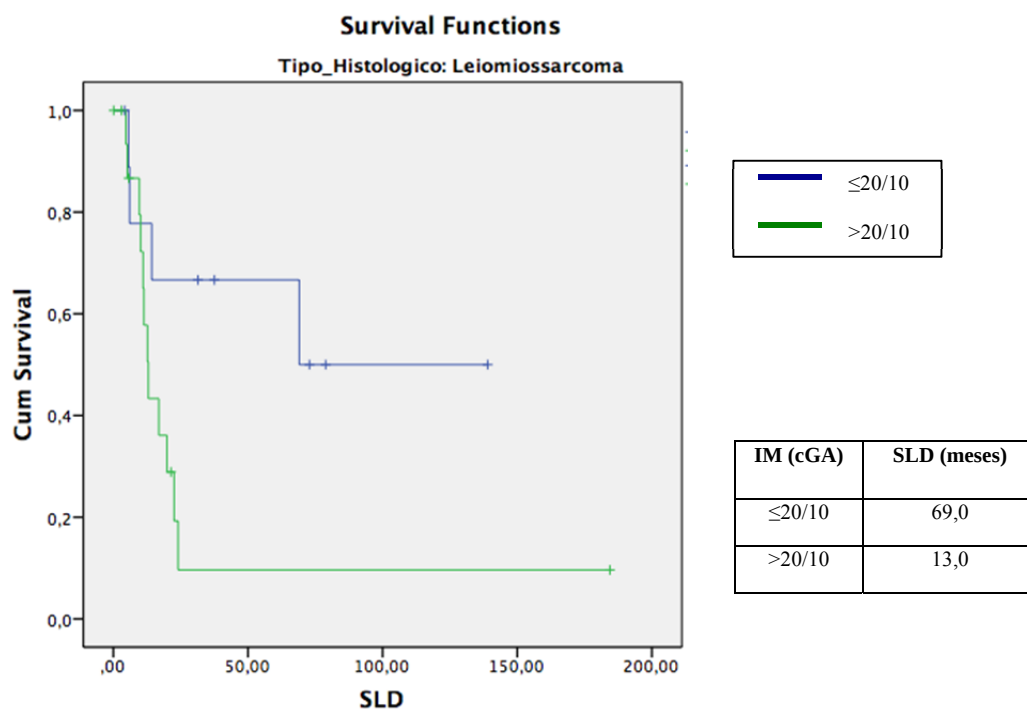


Figura 19 - Curvas de sobrevida livre de doença dos leiomiossarcomas uterinos em relação ao índice mitótico ($p=0,041$) (A.C.Camargo Cancer Center 1982 - 2013).

Quanto ao tamanho do tumor, em tumores ≤ 10 cm, a sobrevida livre de doença mediana foi de 16,9 meses. Nos tumores >10 cm a sobrevida livre de doença mediana foi de 14,2 meses ($p= 0,998$) (Figura 20).

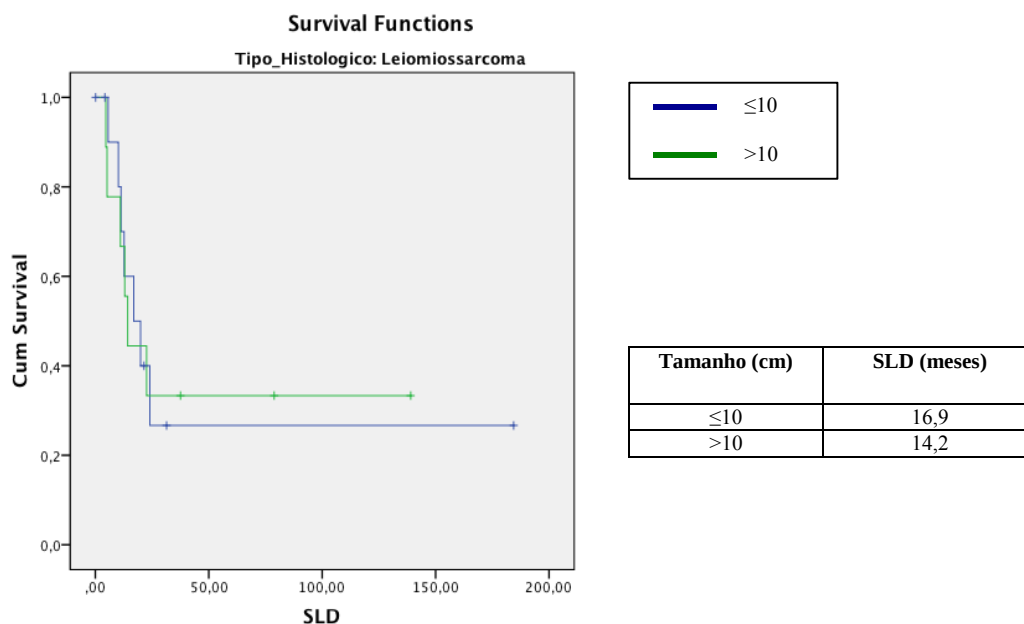


Figura 20 - Curvas de sobrevida livre de doença dos leiomiossarcomas uterinos em relação ao tamanho dos tumores ($p=0,998$) (A.C. Camargo Cancer Center 1982 - 2013).

Não houve diferença significativa na sobrevida livre de doença para aquelas pacientes que realizaram tratamento com quimioterapia ou radioterapia adjuvantes. (Figuras 21 e 22). As expressões imunoistoquímica de mTOR e PI3K não tiveram impacto em sobrevida livre de doença (Figuras 23 e 24). A Tabela 20 resume a relação entre as variáveis clínico-patológicas e a sobrevida livre de doença.

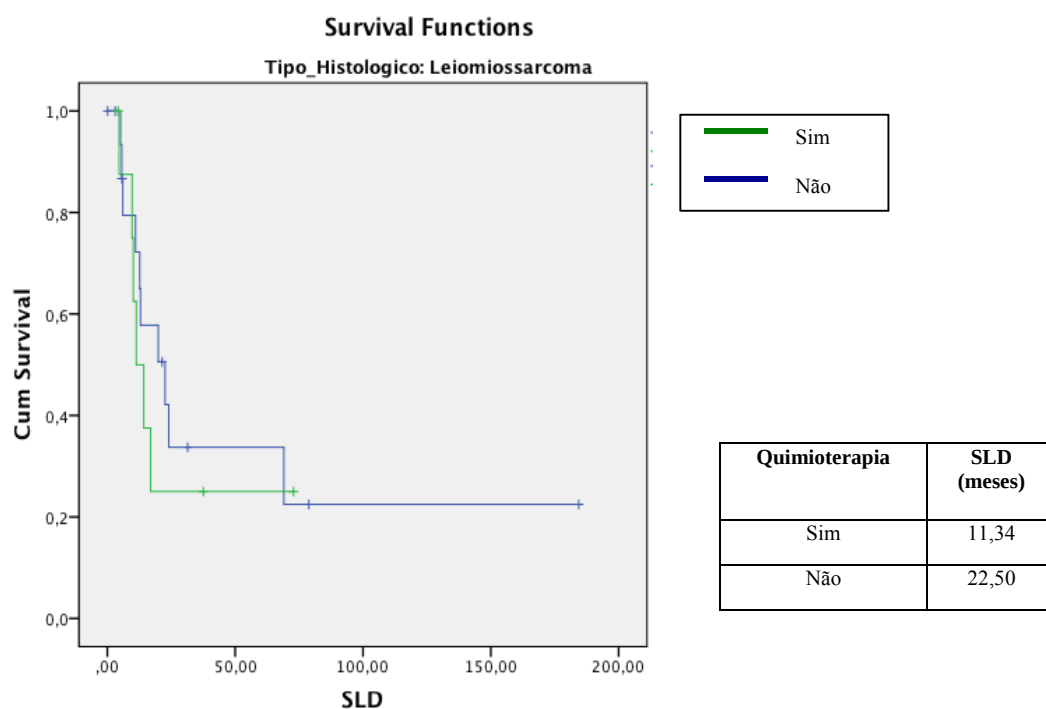


Figura 21 - Curvas de sobrevida livre de doença conforme realização de quimioterapia adjuvante nos leiomiossarcomas uterinos estádios I, II e III ($p=0,56$) (A.C.Camargo Cancer Center 1982 - 2013).

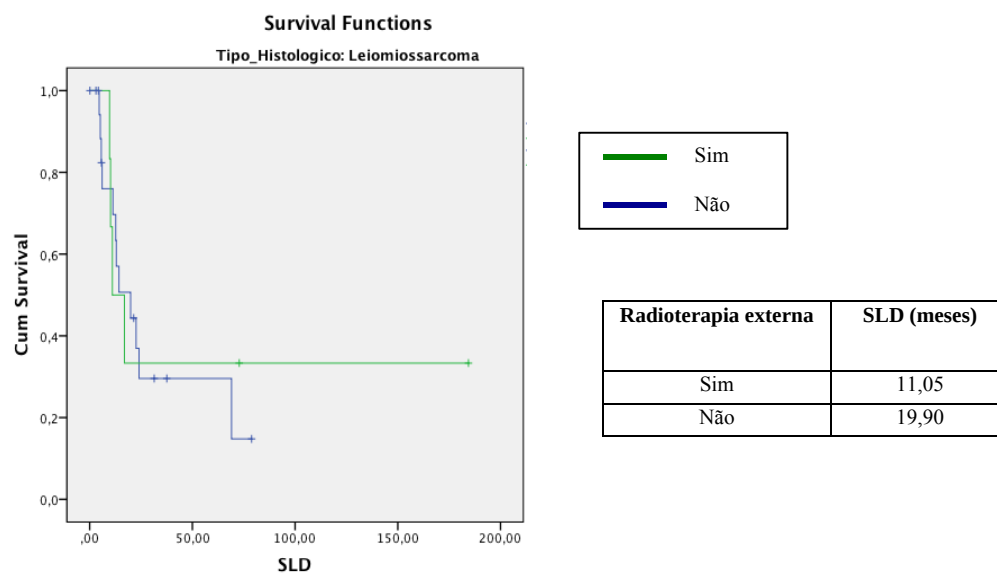


Figura 22- Curvas de sobrevida livre de doença conforme realização da radioterapia adjuvante nos leiomiossarcomas uterinos estádios I, II e III ($p=0,81$) (A.C.Camargo Cancer Center 1982 - 2013).

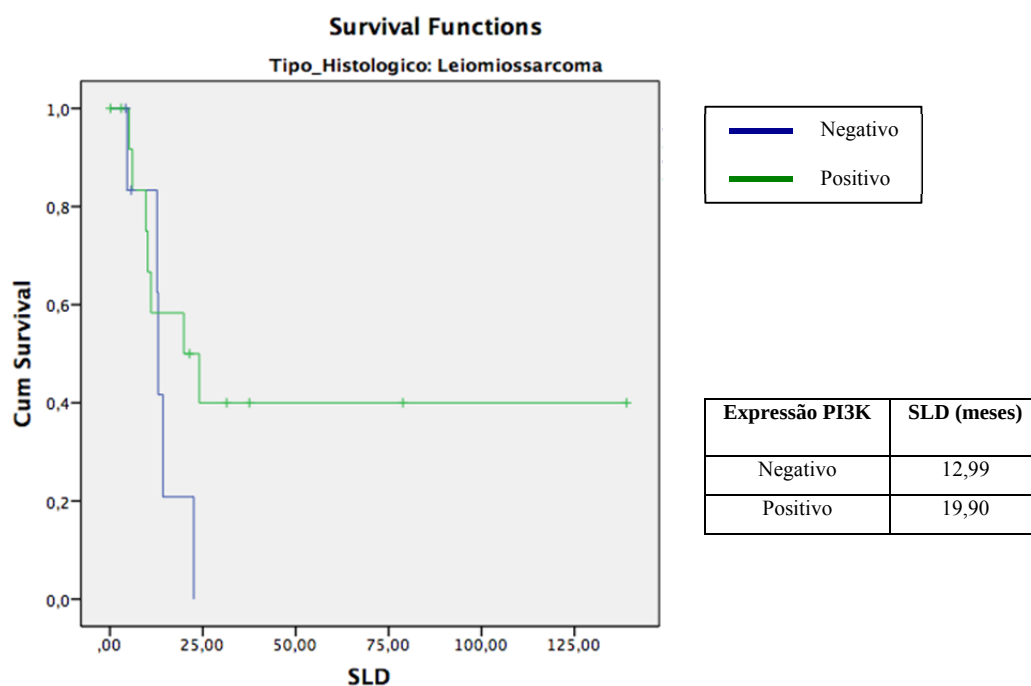


Figura 23 - Curvas de sobrevida livre de doença correlacionado com a expressão imunoistoquímica citoplasmática de PI3K nos leiomiiossarcomas uterinos ($p=0,170$) (A.C.Camargo Cancer Center 1982 - 2013).

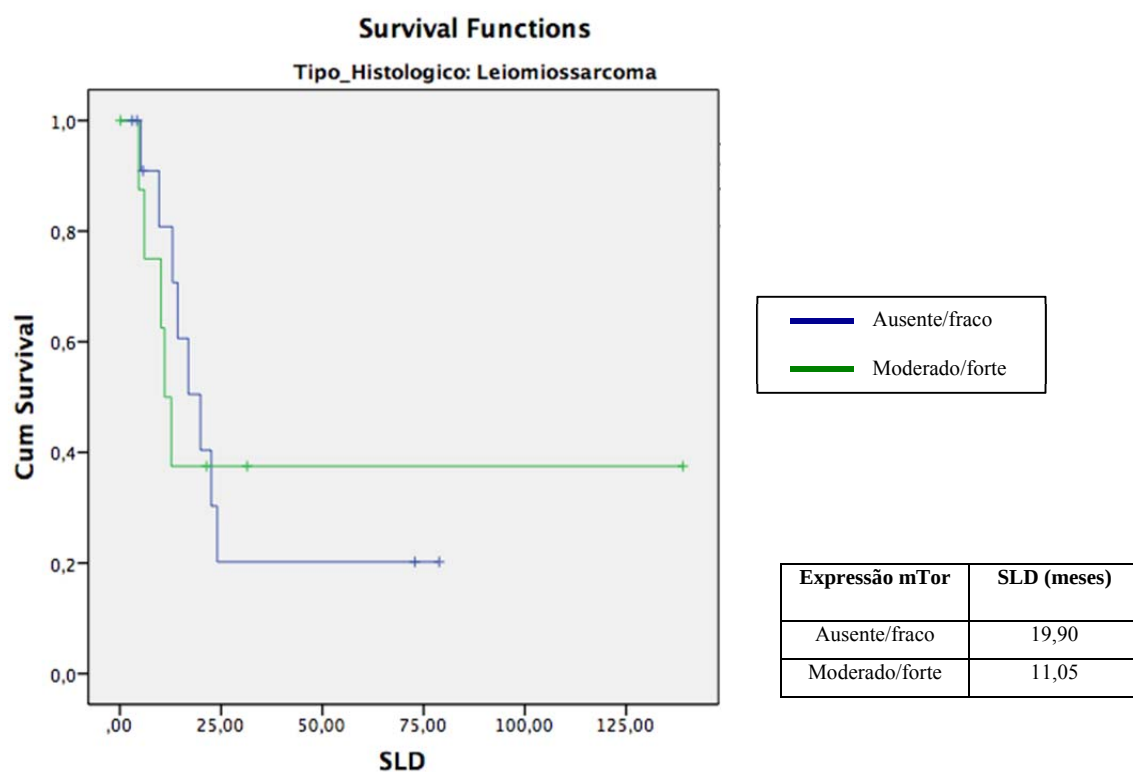


Figura 24 - Curvas de sobrevida livre de doença correlacionado a expressão imunoistoquímica citoplasmática de mTOR nos leiomiossarcomas uterinos ($p=0.91$) (A.C.Camargo Cancer Center 1982 - 2013).

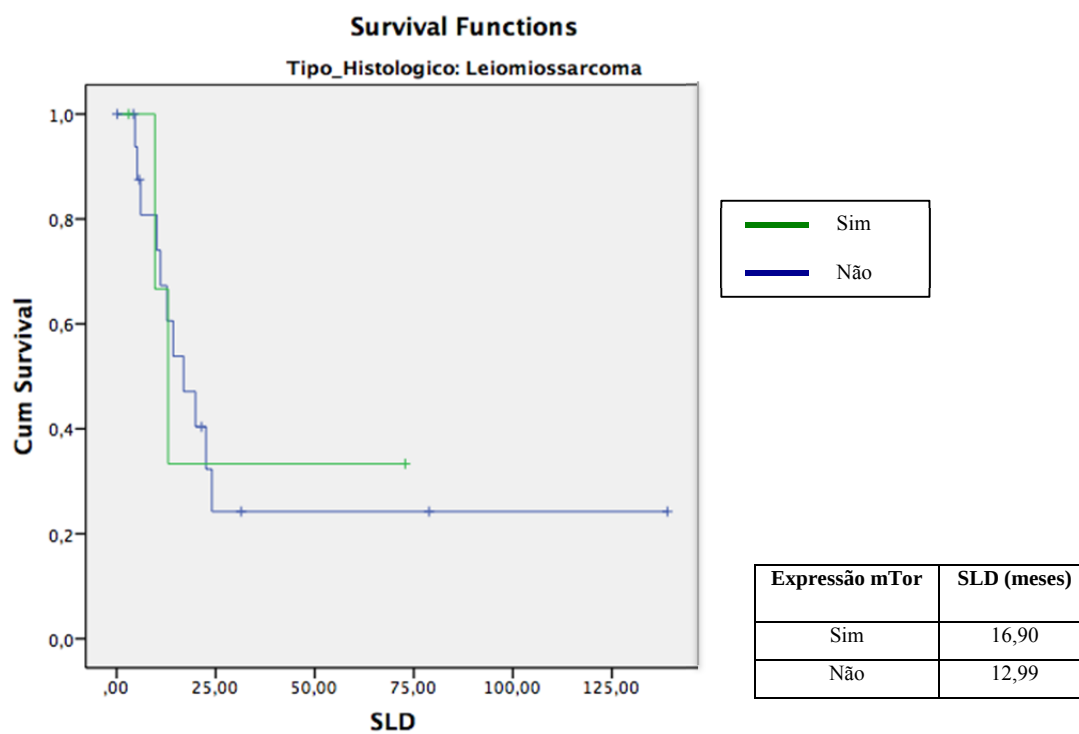


Figura 25 - Curvas de sobrevida livre de doença correlacionado a expressão imunoistoquímica nuclear do mTOR nos leiomiossarcomas uterinos ($p=0,096$) (A.C.Camargo Cancer Center 1982 - 2013)

Tabela 20 - Taxas de sobrevida mediana livre de doença em relação as variáveis clínicas e anatomopatológicas nos leiomiossarcomas uterinos. (A.C.Camargo Cancer Center 1982 - 2013).

Variável	Categoria	SLD 2 anos (%)	SLM (meses)	P
Estádio	I	47,1	24	0,02
	II e III	30,0	11,05	
Índice mitótico (M/10CGA)	≤20	60,0	69,04	0,041
	>20	29,4	12,99	
Atipia celular	Graus 1+2	42,9	19,90	0,860
	Grau 3	38,5	12,69	
Celularidade	Baixa/moderada	33,3	14,27	0,970
	Intensa	44,4	16,90	
Expressão	Negativa	28,6	12,99	0,170
pI3K	Positiva	50,6	19,90	
Expressão	Fraca	38,5	19,90	0,912
mTor	Forte	44,4	11,05	
Expressão	sim	38,9	16,91	0,0964
mTor núcleo	não	50,0	12,99	
Idade (anos)	≤50	25,0	16,90	0,721
	>50	57,1	14,27	
Radioterapia externa	Não	40,0	19,90	0,814
	Sim	33,3	11,05	
Quimioterapia	Não	41,2	22,50	0,564
	Sim	33,3	11,34	

SLD: Sobrevida livre de doença; SM: Sobrevida mediana; CGA: campos de grande aumento

6 DISCUSSÃO

O estudo foi retrospectivo, uni institucional, tendo sido analisado os casos de leiomiomas, leiomiomas não usuais e leiomiossarcomas uterinos que continham material anatomopatológico da instituição no período de 1982 até 2013. Apesar da raridade das lesões (leiomiossarcomas, variantes dos leiomiomas e STUMP uterinos), o estudo apresentou significativa redução da amostra devido a não localização do material anatomopatológico para análises e inclusão apenas das pacientes que fizeram seguimento no hospital.

Os leiomiomas uterinos são extremamente comuns. Nos EUA, os leiomiomas são encontrados em pelo menos 10% das mulheres brancas e 30-40% das mulheres negras com idade superior a 35 anos. No grupo pós-menopausa, a incidência aumenta para 30% em mulheres brancas e 50% em mulheres negras (WALLACH e VLAHOS 2004). Felizmente essas neoplasias costumam diminuir de tamanho após a menopausa, especialmente em pacientes que não recebem estimulação exógena de estrogênio. Apesar da alta incidência, a patogênese do leiomioma uterino permanece obscura. Avanços recentes na definição dos mecanismos moleculares relacionados ao crescimento e desenvolvimento dos leiomiomas sugerem que os leiomiomas crescem sob o controle de hormônios ovarianos que atuam regulando os fatores de crescimento e suas vias de sinalização. Níveis elevados de receptores de estrogênio e progesterona foram demonstrados em leiomiomas em comparação com o miométrio autólogo, sugerindo que os leiomiomas são estimulados por esses hormônios. Estudos em células uterinas de ratos e células de câncer de mama demonstraram que o

estrogênio e a progesterona podem ativar rapidamente a via de sinalização de fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K-Akt) e a desregulação dessa via tem sido implicada na origem de muitas neoplasias, inclusive nos leiomiossarcomas (MAKKER et al. 2014).

Em relação ao Akt, a expressão similar de pAkt em leiomioma uterino e tecido miometrial normal foram relatadas por pesquisadores (YU et al. 2008; TSAI et al. 2011). MAKKER et al. (2016) demonstraram que a expressão de pAkt foi baixa ou ausente em um grande número de amostras de leiomiomas (73%), achado apoiado por outro estudo (DHINGRA et al. 2011). Considerando o fato de que PTEN regula a ativação de Akt, MAKKER et al. (2016) evidenciaram baixa expressão pAkt e aumento dos níveis de expressão protéica do PTEN nos leiomiomas uterinos, sugerindo uma downregulation da via PI3K-Akt-mTor. Contrariamente a esses estudos, já foram relatados altos níveis de pAkt, exclusivamente em leiomiomas no período de crescimento desses tumores ou em fibromas grandes (PENG et al. 2009).

Os LMSs uterinos ocorrem tipicamente em mulheres perimenopausa e pós-menopausa com idade mediana de 51 a 56 anos (GIUNTOLI et al. 2003; ABELER et al. 2009). Clinicamente, são tumores altamente agressivos, mesmo quando confinados ao corpo uterino e apresentam prognóstico globalmente ruim, com uma sobrevida e recorrência em 5 anos de 25-75% e 45-73%, respectivamente (MAYERHOFER et al. 1999; GIUNTOLI et al. 2003). Na série estudada da instituição, verificou-se que os leiomiossarcomas uterinos são diagnosticados em pacientes com idade mediana de 50,2 anos.

Os sintomas de apresentação mais freqüentes dos LMS uterinos são sangramento vaginal anormal (56%), dor pélvica ou abdominal (22%) e massa

palpável (52%) (RICCI et al. 2017). Os sintomas menos comuns incluem perda de peso, fraqueza, letargia e febre (BARTER et al. 1985; SCHWARTZ et al. 1985; ZALOUDEK e NORRIS 1994). Foi evidenciado na nossa série que 11,8% eram assintomáticos, 29,4% apresentavam dor pélvica, 44,1% apresentavam sangramento, 2,9% apresentavam corrimento vaginal e 10,8% apresentavam massa pélvica. Historicamente, pacientes com um crescimento rápido da massa uterina (definida como um aumento de 6 cm em 6-12 meses) deveria-se pensar no diagnóstico de sarcomas uterino (RICCI et al. 2017). Porém, apenas menos de 0,5% dos casos operados como leiomiomas tem diagnóstico final de LMS (LEIBSOHN et al. 1990; PARKER et al. 1994; TAKAMIZAWA et al. 1999; LEUNG et al. 2009; DHINGRA et al. 2011).

O diagnóstico do leiomiossarcoma uterino é extremamente difícil, pois surge dentro do músculo liso uterino, a biópsia do tecido maligno é difícil e muitas lesões só são encontradas na patologia após o estudo anatomopatológico da peça da histerectomia. Nos estudos de LEIBSOHN et al. (1990), nenhum dos sete pacientes relacionados com leiomiossarcoma foram identificados na biópsia pré-operatória, e em apenas três casos houve suspeita intra-operatória de sarcoma.

MAYERHOFER et al. (1999), demonstraram que a doença em estágio inicial tem uma influência na sobrevida global de 5 anos em pacientes com LMS. No presente estudo 48,6% encontrava-se no estadió clínico I, 16,2% no estadió II, 10,8% no estadió III e 24,3% no estadió IV, portanto a maioria encontrava-se no estadió inicial e dessa forma influenciando a sobrevida. MAYERHOFER et al. (1999) também sugeriram que a idade ≥ 50 anos estivesse associada independentemente com o aumento da sobrevida global em pacientes com LMS em análise multivariada.

Porém, no presente estudo a idade não mostrou impacto prognóstico.

A influência da contagem mitótica no prognóstico permanece controversa. NOLA et al. (1996) e BLOM et al. (1998) não relataram correlação significativa entre contagem mitótica e prognóstico. LARSON et al. (1990) entretanto, sugeriram que a contagem mitótica seria um forte preditor de sobrevida. No estudo de MAYERHOFER et al. (1999), após análises univariadas e multivariadas, verificou-se que uma contagem mitótica baixa estava associada a um melhor prognóstico em análise univariada, mas não em análise multivariada. Além disso, observou-se uma interação estatisticamente significativa entre a contagem mitótica e o estágio do tumor, sendo que a contagem mitótica assumiria maior importância em tumores com estágio inicial. No presente estudo também encontramos o índice mitótico como variável prognóstica para recidiva, sendo que pacientes portadoras de $IM > 20/10cGA$ apresentaram pior sobrevida livre de doença.

MAYERHOFER et al. (1999) também demonstraram que o envolvimento do espaço vascular é um parâmetro prognóstico independente para a sobrevida global. Uma explicação para este achado seria que quanto mais cedo as células tumorais se aproximam a pequenos vasos mais precoce ganham a circulação sanguínea e maior a probabilidade disseminação local e metástase distância. Este foi o primeiro estudo que mostrou que o envolvimento do espaço vascular foi significativamente correlacionado com a sobrevida global, tanto na análise univariada quanto na multivariada.

Do ponto de vista genético e molecular, os LMSs são caracterizados por numerosas alterações genômicas, que incluem amplificações e deleções genômicas. Entre estas, a mais frequente é a deleção que ocorre no cromossomo 10, que engloba

PTEN (fosfatase e tensina homóloga), um gene supressor de tumor e regulador negativo da fosfoinositide-3-quinase (PI3K), podendo ocorrer em 40-50% dos casos (FOURNEAUX et al. 2017).

A ativação das vias PI3K-Akt-mTOR através de diferentes mecanismos incluindo a ativação de IGFR ou PI3K, perda de *PTEN*, amplificação de RICTOR e/ou aumento de pAKT tem sido relatada no LMS e outros tipos de sarcomas (BABICHEV et al. 2016), sendo dessa forma implicado seu papel na progressão tumoral e metástase. A via mTOR desempenha um papel significativo nas vias de sinalização celular, promovendo a tumorigênese através da fosforilação coordenada de proteínas que regulam diretamente a síntese protéica, progressão do ciclo celular, crescimento e proliferação celular (CHEN et al. 2010). Através do estudo dessas vias pode-se avaliar inibidores com possíveis efeito terapêutico. A inibição dupla de PI3K-mTOR representa uma potencial estratégia terapêutica no tratamento dos leiomiossarcoma (CUPPENS et al. 2017). Os inibidores duplos de PI3K e mTOR, como o BEZ235, visam os sítios ativos de ambas as holoenzimas, inibindo a via do Akt e evitando o problema da ativação do Akt após a abolição do loop de feedback negativo mTORC1-S6K-IRS-1 (MAIRA et al. 2008).

No estudo realizado, inicialmente foram avaliadas as expressões imunoistoquímicas do PTEN, PI3K, Akt e mTor nos tipos histológicos mesenquimais uterinos (leiomiomas, leiomiomas não usuais e leiomiossarcomas) sendo correlacionados com os dados clínicos e anatomopatológicos.

Em relação a expressão imunoistoquímica do PTEN e do Akt no nosso estudo, obtivemos a presença expressão imunoistoquímica nuclear do PTEN e ausência de expressão nuclear do Akt em todos os tipos histológicos (leiomiomas, leiomiomas

não usuais e leiomiossarcomas). Esse fato é discordante em relação a literatura pois esperaríamos a expressão do PTEN nos leiomiomas e leiomiomas não usuais e perda de expressão nos leiomiossarcomas uterinos, pois a perda de expressão do PTEN proporcionaria ativação da via PI3K-Akt-mTOR e consequente tumorigênese. Em relação ao Akt, esperaríamos então uma menor expressão nos leiomiomas e leiomiomas não usuais do que em relação aos leiomiossarcomas uterinos, na qual haveria a ativação da via PTEN-PI3K-Akt-mTOR.

Apesar da expressão imunoistoquímica nuclear do PTEN estar presente nos leiomiomas, leiomiomas não usuais e leiomiossarcomas e a expressão imunoistoquímica nuclear do Akt não estar expressa nessas lesões mesenquimais, foi encontrado uma menor expressão imunoistoquímica citoplasmática do mTor nos leiomiomas em relação aos leiomiomas não usuais e leiomiossarcomas uterinos. No estudo realizado, ao se agrupar os leiomiomas não usuais com os leiomiossarcomas e comparar a expressão imunoistoquímica citoplasmática do mTor em relação aos leiomiomas, observou-se expressões fortes em 43,2% e 17,4% respectivamente ($p=0,035$). Esse resultado de expressão imunoistoquímica do mTor está de acordo com a literatura, sendo uma maior expressão imunoistoquímica citoplasmática do mTor nos leiomiossarcomas uterinos pois a ativação da via PI3K-Akt -mTOR está presente nos leiomiossarcomas de outros sítios e em outros tipos de sarcoma (BARRETINA et al. 2010; BABICHEV et al. 2016). Os dados encontrados em relação a expressão do PTEN e Akt nessas lesões mesenquimais não condiz com a literatura e provavelmente o mTOR foi ativado por uma outra via não PI3K-Akt. O esperado seria que o Akt ativasse a via mTOR e, mais especificamente, o complexo mTOR 1 que controla o crescimento celular e o metabolismo implicadas na

tumorigênese (GIBAULT et al. 2012).

Não houve correlação da expressão imunoistoquímica citoplasmática do mTor nos leiomiossarcomas uterinos em relação aos dados clínicos e anatomopatológicos

Alguns autores sugeriram que o aumento da expressão do PI3K fizesse parte da sarcogênese do leiomiossarcoma uterino e dessa forma esperaria uma maior expressão imunoistoquímica ao se comparar com os demais tipos histológicos estudados. Isso poderia ocorrer por mutações de função em p53 ou PTEN e mutações ativadoras na via PI3K-Akt-mTOR. Dentre as mutações ativadoras da via PI3K-Akt-mTOR podemos citar: ativação dos receptores de tirosina quinase, mutação do Akt e mutação da sub-unidade p85 do PI3K como fator ativador do mesmo (BARRETINA et al. 2010; BABICHEV et al. 2016). No presente estudo, a expressão imunoistoquímica citoplasmática do PI3K nos LMS não apresentou diferença em relação aos leiomiomas e leiomiomas não usuais. Tal achado reitera a possibilidade uma possível ativação do mTor por uma outra via não relacionada ao PTEN- PI3K-Akt.

Ao correlacionar a expressão imunoistoquímica citoplasmática do PI3K com os dados clínicos e anatomopatológicos dos leiomiossarcomas, não houve diferenças estatisticamente significativa.

Alguns artigos demonstram que a tumorigênese pode ser explicada pela existência de outras vias paralelas que se confluem e interagem com a do PTEN-PI3K-Akt-mTor (ASATI et al. 2016). Estudos recentes sugerem que as cascatas PI3K / Akt / mTOR e Raf / MEK / ERK estão interligadas com múltiplos pontos de convergência. A inibição de qualquer uma das vias pode resultar na manutenção da

sinalização através da outra via (recíproca) (ASATI et al. 2016; HU e HU 2017; WU et al. 2017). A via MEK / ERK é ativada simultaneamente com a via PI3K / AKT em múltiplos cânceres humanos, incluindo gliomas, próstata (BITTING e ARMSTRONG 2013; WU et al. 2017). SCHIAVON et al. (2017) ao estudar a caracterização de microRNA associado a variações genéticas em leiomiossarcomas uterinos demonstraram que o membro da família let-7, o let-7a-5p, foi encontrado pouco expresso em LMS quando comparado ao miométrio normal. Esse microRNA está relacionado a via Raf / MEK / ERK podendo ser um supressor de tumor, estando diminuído nos LMS em comparação com os miométrios normais, sugerindo que esse miRNA não está atuando em mecanismos de inibição da proliferação celular e dessa forma, caracterizando o potencial oncogênico do LMS uterino.

Em relação à sobrevida global, obtivemos uma sobrevida global mediana de 24 meses nas pacientes com leiomiossarcomas uterinos e somente o estágio teve impacto em sobrevida. Porém, no estágio I, a expressão imunoistoquímica citoplasmática fraca do PI3K teve impacto negativo em sobrevida global ($p=0,025$). Encontramos uma sobrevida livre de doença mediana de 16,9 meses. Paciente com doença extra-uterina e índice mitótico $>20/CGA$ apresentaram uma pior sobrevida livre de doença.

Em relação à sarcogênese do leiomiossarcoma uterino alguns autores sugerem a hipótese apartir da degeneração do leiomioma uterino ou surgido de novo (YANAI et al. 2010). A histogênese do leiomiossarcoma uterino tem sido controversa entre os autores. Embora a maioria dos casos de LMS uterino tenha surgido de novo, foram relatados vários casos de LMS comprovados histologicamente em leiomioma pré-existente do útero ou ligamento largo (KIR et al.

2003, YANAI et al. 2010). A transformação maligna de leiomioma pode ocorrer não só em leiomioma celular ou bizarro, mas também em leiomioma hialinizado (YANAI et al. 2010). No nosso estudo não foi possível correlacionar essa origem do leiomiossarcoma uterino a partir do leiomioma e outros marcadores poderiam ser úteis nessa investigação. O p16, p53 e Ki-67 poderiam ser usados no diagnóstico diferencial entre áreas sarcomatosas e células atípicas duvidosas (YANAI et al. 2010).

A via do PI3K-Akt-mTOR tem importância potencial na terapêutica dos leiomiossarcomas pelo fato de estudos preliminares sugerirem a importância da inibição simultânea do PI3K-mTOR como forma de controlar a doença (BABICHEV et al. 2016; FOURNEAUX et al. 2017). Porém, outros estudos confirmatórios ainda deverão ser desenvolvidos e incluindo outras potenciais vias com objetivo de melhor entendimento da sarcogênese dos leiomiossarcomas. No presente estudo, não conseguimos encontrar diferenças significativas entre as expressões proteicas por imunohistoquímica do PTEN, PI3K, Akt e mTOR nos leiomiossarcomas uterinos e variantes benignas do músculo liso.

7 CONCLUSÕES

- 1 As expressões nucleares do PTEN por imunoistoquímica estavam presentes em todos os tipos histológicos estudados (leiomiomas, leiomiomas não usuais e leiomiossarcomas).

As expressões nucleares do Akt por imunoistoquímica estavam ausentes em todos os tipos histológicos estudados (leiomiomas, leiomiomas não usuais e leiomiossarcomas).

As expressões citoplasmáticas do PI3K por imunoistoquímica nos leiomiomas, variantes do leiomioma e leiomiossarcoma foram positivas em 65%, 62,5% e 62,5% dos casos, respectivamente.

As expressões citoplasmáticas do mTor por imunoistoquímica nos leiomiomas, leiomiomas não usuais e leiomiossarcoma foram fortes em 17,4%, 46,7% e 41,4% dos casos, respectivamente. Agrupando-se os leiomiomas não usuais com os leiomiossarcomas observou-se expressões citoplasmáticas fortes em 43,2% e 17,4% respectivamente ($p=0,035$).

- 2 As expressões imunoistoquímicas do PTEN, PI3K, Akt e mTOR não se correlacionaram com as variáveis clínico-patológicas nos leiomiossarcomas uterinos;
- 3 As expressões imunoistoquímicas do PTEN, Akt e mTOR não tiveram impacto prognóstico nos leiomiossarcomas uterinos. A expressão imunoistoquímica citoplasmática fraca do PI3K teve impacto negativo em sobrevida global nas pacientes estágio I.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abeler VM, Royne O, Thoresen S, Danielsen HE, Nesland JM, Kristensen GB. Uterine sarcomas in Norway. A histopathological and prognostic survey of a total population from 1970 to 2000 including 419 patients. **Histopathology** 2009; 54:355-64.

Alves VAF, Bacchi CE, Vassalo J. **Manual de imuno-histoquímica**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia; 1999.

Andrade VP, Cunha IW, Silva EM, et al. O arranjo em matriz de amostras teciduais (tissue microarray): larga escala e baixo custo ao alcance do patologista. **Bras Patol Med Lab** 2007; 43:55-60.

Amant F, Coosemans A, Debiec-Rychter M, Timmerman D, Vergote I. Clinical management of uterine sarcomas. **Lancet Oncol** 2009; 10:1188-98.

Asati V, Mahapatra DK, Bharti SK. PI3K/Akt/mTOR and Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathways inhibitors as anticancer agents: Structural and pharmacological perspectives. **Eur J Med Chem** 2016; 109:314-41.

Barretina J, Taylor BS, Banerji S, et al. Subtype-specific genomic alterations define new targets for soft-tissue sarcoma therapy. **Nat Genet** 2010; 42:715-21.

Barter JF, Smith EB, Szpak CA, Hinshaw W, Clarke-Pearson DL, Creasman WT. Leiomyosarcoma of the uterus: clinicopathologic study of 21 cases. **Gynecol Oncol** 1985; 21:220-7.

Babichev Y, Kabaroff L, Datti A, et al. PI3K/AKT/mTOR inhibition in combination with doxorubicin is an effective therapy for leiomyosarcoma. **J Transl Med** 2016; 14:67.

Beck AH, West RB, van de Rijn M. Gene expression profiling for the investigation of soft-tissue sarcoma pathogenesis and the identification of diagnostic, prognostic, and predictive biomarkers. **Virchows Arch** 2009; 456:141-51.

Benson C, Miah AB. Uterine sarcoma - current perspectives. **Int J Womens Health** 2017; 9:597-606.

Bitting RL, Armstrong AJ. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in castration-resistant prostate cancer. **Endocr Relat Cancer** 2013; 20:R83-99.

Bjornsti MA, Houghton PJ. The TOR pathway: a target for cancer therapy. **Nat Rev Cancer** 2004; 4:335-48.

Blom R, Guerrieri C, Stal O, Malmstro'm H, Simonsen E: Leiomyosarcoma of the uterus: a clinicopathologic, DNA flow cytometric, p53, and mdm-2 analysis of 49 cases. **Gynecol Oncol** 1998; 68:54-61.

Brooks SE, Zhan M, Cote T et al. Surveillance, epidemiology, and end results analysis of 2677 cases of uterine sarcoma 1989-1999. **Gynecol Oncol** 2004; 93:204-8.

Chen XG, Liu F, Song XF, et al. Rapamycin regulates Akt and ERK phosphorylation through mTORC1 and mTORC2 signaling pathways. **Mol Carcinog** 2010; 49:603-10.

Chiang S, Oliva E. Recent developments in uterine mesenchymal neoplasms (review). **Histopathology** 2013; 62:124-37.

Clement PB. Intravenous leiomyomatosis of the uterus. **Pathol Annu** 1988; 2:153-83.

Cuppens T, Tuyaerts S, Amant F. Potential therapeutic targets in uterine sarcomas. **Sarcoma** 2015; 2015:243298

Cuppens T, Annibali D, Coosemans A, et al. Potential Targets' Analysis Reveals Dual PI3K/mTOR Pathway Inhibition as a Promising Therapeutic Strategy for Uterine Leiomyosarcomas-an ENITEC Group Initiative. **Clin Cancer Res** 2017; 23:1274-85.

D'Angelo E, Prat J. Uterine sarcomas: a review. **Gynecol Oncol** 2010; 116:131-9.

Dafopoulos A, Tsikouras P, Dimitraki M, et al. The role of lymphadenectomy in uterine leiomyosarcoma: review of the literature and recommendations for the standard surgical procedure. **Arch Gynecol Obstet** 2010; 282:293-300.

Dhingra S, Rodriguez ME, Shen Q, et al. Constitutive activation with overexpression of the mTORC2-phospholipase D1 pathway in uterine leiomyosarcoma and STUMP: morphoproteomic analysis with therapeutic implications. **Int J Clin Exp Pathol** 2011; 4:134-46.

Fourneaux B, Chaire V, Lucchesi C, Karanian M, Pineau R, Laroche-Clary A, Italiano A. Dual inhibition of the PI3K/AKT/mTOR pathway suppresses the growth of leiomyosarcomas but leads to ERK activation through mTORC2: biological and clinical implications. **Oncotarget** 2017; 8:7878-90.

Gadducci A, Cosio S, Romanini A, Genazzani AR. The management of patients with uterine sarcoma: a debated clinical challenge. **Crit Rev Oncol Hematol** 2008; 65:129-42.

Gibault L, Ferreira C, Pérot G, et al. From PTEN loss of expression to RICTOR role in smooth muscle differentiation: complex involvement of the mTOR pathway in leiomyosarcomas and pleomorphic sarcomas. **Mod Pathol** 2012; 25:197-211.

Giltane JM, Rimm DL. Technology insight: Identification of biomarkers with tissue microarray technology. **Nat Clin Pract Oncol** 2004; 1:104-11.

Giuntoli RL, Metzinger DS, DiMarco CS, et al. Retrospective review of 208 patients with leiomyosarcoma of the uterus: prognostic indicators, surgical management, and adjuvant therapy. **Gynecol Oncol** 2003; 89:460-9.

Hernando E, Charytonowicz E, Dudas ME, et al. The AKT-mTOR pathway plays a critical role in the development of leiomyosarcomas. **Nat Med** 2007; 13:748-53

Hu J, Rao UN, Jasani S, Khanna V, Yaw K, Surti U. Loss of DNA copy number of 10q is associated with aggressive behavior of leiomyosarcomas: a comparative genomic hybridization study. **Cancer Genet Cytogenet** 2005; 161:20-7.

Hu J, Hu WX. Targeting signaling pathways in multiple myeloma: pathogenesis and implication for treatments. **Cancer Lett** 2017; 414:214-21.

Kaplan E, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. **J Am Stat Assoc** 1958; 8:423-46.

Kapp DS, Shin JY, Chan JK. Prognostic factors and survival in 1396 patients with uterine leiomyosarcomas: emphasis on impact of lymphadenectomy and oophorectomy. **Cancer** 2008; 112:820-30.

Karpathiou G, Sivridis E, Giatromanolaki A. Myxoid leiomyosarcoma of the uterus: a diagnostic challenge. **Eur J Gynaecol Oncol** 2010; 31:446-8.

Kildal W, Abeler VM, Kristensen GB, Jenstad M, Thoresen S, Danielsen HE. The prognostic value of DNA ploidy in a total population of uterine sarcomas. **Ann Oncol** 2009; 20:1037-41.

Kir G, Eren S, Akoz I, Kir M. Leiomyosarcoma of the broad ligament arising in a pre-existing pure neurilemmoma-like leiomyoma. **Eur J Gynaecol Oncol** 2003; 24:505-6.

Kobayashi H, Uekuri C, Akasaka J, et al. Mol The biology of uterine sarcomas: A review and update. **Clin Oncol** 2013; 1:599-609.

Kurman RJ, Carcangiu ML, Herrington CS. **WHO classification of tumours on female reproductive organs**. 4th ed. Lyon: IARC; 2014. (World Health Organization Classification of Tumours)

Larson B, Silfverswärd C, Nilsson B, Pettersson F. Prognostic factors in uterine leiomyosarcoma: a clinical and histopathological study of 143 cases. The Radiumhemmet series 1936-1981. **Acta Oncol** 1990; 29:185-92.

Lee CH, Turbin DA, Sung YC, et al. A panel of antibodies to determine site of origin and malignancy in smooth muscle tumors. **Mod Pathol** 2009; 22:1519-31.

Leibsohn S, d'Ablaing G, Mishell DR Jr, Schlaerth JB. Leiomyosarcoma in a series of hysterectomies performed for presumed uterine leiomyomas. **Am J Obstet Gynecol** 1990; 76:162-6.

Leitão MM, Sonoda Y, Brennan MF, Barakat RR, Chi DS. Incidence of lymph node and ovarian metastases in leiomyosarcoma of the uterus. **Gynecol Oncol** 2003; 91:209-12.

Leung F, Terzibachian JJ, Gay C, et al. [Hysterectomies performed for presumed leiomyomas: should the fear of leiomyosarcoma make us apprehend non laparotomic surgical routes?]. **Gynecol Obstet Fertil** 2009; 37:109-14.

Maira S-M, Stauffer F, Brueggen J, et al. Identification and characterization of NVP-BEZ235, a new orally available dual phosphatidylinositol 3-kinase/ mammalian target of rapamycin inhibitor with potent in vivo antitumor activity. **Mol Cancer Ther** 2008; 7:1851-63.

Major FJ, Blessing JA, Silverberg SG, et al. Prognostic factors in early-stage uterine sarcoma. A Gynecologic Oncology Group study. **Cancer** 1993; 71:1702-9.

Majumder PK, Febbo PG, Bikoff R, et al. mTOR inhibition reverses Akt-dependent prostate intraepithelial neoplasia through regulation of apoptotic and HIF-1-dependent pathways. **Nat Med** 2004; 10:594-601.

Makker A, Goel MM, Mahdi AA. PI3K/PTEN/Akt and TSC/mTOR signaling pathways, ovarian dysfunction, and infertility: an update. **J Mol Endocrinol** 2014; 53:R103-18.

Makker A, Goel MM, Mahdi AA, et al. PI3K/Akt/mTOR signaling & its regulator tumour suppressor genes PTEN & LKB1 in human uterine leiomyomas. **Indian J Med Res** 2016; 143(Suppl):S112-S9.

Martelli AM, Tabellini G, Bressanin D, et al. The emerging multiple roles of nuclear Akt. **Biochim Biophys Acta** 2012; 1823:2168-78.

Martins FC, Santiago I, Trinh A, et al. Combined image and genomic analysis of high-grade serous ovarian cancer reveals PTEN loss as a common driver event and prognostic classifier. **Genome Biol** 2014; 15:526.

Mayerhofer K, Obermair A, Windbichler G, et al. Leiomyosarcoma of the uterus: a clinicopathologic multicenter study of 71 cases. **Gynecol Oncol** 1999; 74:196-201.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa/2016 incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2016.

Moinfar F, Azodi M, Tavassoli FA. Uterine sarcomas. **Pathology** 2007; 39:55-71.

Murray S, Linardou H, Mountzios G, et al. Low frequency of somatic mutations in uterine sarcomas: a molecular analysis and review of the literature. **Mutat Res** 2010; 686:68-73.

Nola M, Babic D, Ilic J, et al. Prognostic parameters for survival of patients with malignant mesenchymal tumors of the uterus. **Cancer** 1996; 78:2543-50.

Osaki M, Oshimura M, Ito H. PI3K-AKT pathway: its functions and alterations in human cancer. **Apoptosis** 2004; 9:667-76.

Parker WH, Fu YS, Berek JS. Uterine sarcoma in patients operated on for presumed leiomyoma and rapidly growing leiomyoma. **Obstet Gynecol** 1994; 83:414-8.

Peng L, Wen Y, Han Y, et al. Expression of insulin-like growth factors (IGFs) and IGF signaling: molecular complexity in uterine leiomyomas. **Fertil Steril** 2009; 91:2664-75.

Perri T, Korach J, Sadetzki S, Oberman B, Fridman E, Ben-Baruch G. Uterine leiomyosarcoma: does the primary surgical procedure matter. **Int J Gynecol Cancer** 2009; 19:257-60.

Porta C, Paglino C, Mosca A. Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling in cancer. **Front Oncol** 2014; 4:64.

Raish M, Khurshid M, Ansari MA, et al. Analysis of molecular cytogenetic alterations in uterine leiomyosarcoma by array-based comparative genomic hybridization. **J Cancer Res Clin Oncol** 2012; 138:1173-86.

Reed N, Mangioni C, Malmstrem H, et al. First results of a randomized trial comparing radiotherapy versus observation posoperatively in patients with uterine sarcoma. An EORTC-GCG study. **Int J Gynaecol Cancer** 2003; 13.

Ricci S, Stone RL, Fader AN. Uterine leiomyosarcoma: Epidemiology, contemporary treatment strategies and the impact of uterine morcellation. **Gynecol Oncol** 2017; 145:208-16.

Saji M, Ringel MD. The PI3K-Akt-mTOR pathway in initiation and progression of thyroid tumors. **Mol Cell Endocrinol** 2010; 321:20-8.

Schiavon BN. **Caracterização de micoRNA associados a variações genéticas em leiomiiossarcomas uterino**. São Paulo; 2017. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente]

Schwartz Z, Dgani R, Lancet M, Kessler I. Uterine sarcoma in Israel: a study of 104 cases. **Gynecol Oncol** 1985; 20:354-63.

Silverberg SG, Kurman RJ. **Tumor of the uterine corpus and gestational trophoblastic disease**. Washington DC: Armed Force Institute of Pathology; 1992. (Atlas of Tumor Pathology - Armed Force Institute of Pathology, electronic fascicle version 2.0).

Sun Y, Gao D, Liu Y, Huang J, Lessnick S, Tanaka S. IGF2 is critical for tumorigenesis by synovial sarcoma oncoprotein SYT-SSX1. **Oncogene** 2006; 25:1042-52.

Takamizawa S, Minakami H, Usui R, et al. Risk of complications and uterine malignancies in women undergoing hysterectomy for presumed benign leiomyomas. **Gynecol Obstet Invest** 1999; 48:193-6.

Terakawa N, Kanamori Y, Yoshida S. Loss of PTEN expression followed by Akt phosphorylation is a poor prognostic factor for patients with endometrial cancer. **Endocr Relat Cancer** 2003; 10:203-8.

Toro JR, Travis LB, Wu HJ, Zhu K, Fletcher CD, Devesa SS. Incidence patterns of soft tissue sarcomas, regardless of primary site, in the surveillance, epidemiology and end results program 1978-2001: an analysis of 26,758 cases. **Int J Cancer** 2006; 119:2922-30.

Tropé CG, Abeler VM, Kristensen GB. Diagnosis and treatment of sarcoma of the uterus: a review. **Acta Oncol** 2012; 51:694-705.

Tsai FC, Liu WM, Pai MH, Hsieh MS, Lin JY, Chou CM. Down regulation of the integrin α_v signaling pathway in uterine leiomyomas. **Gynecol Obstet Invest** 2011; 71:129-35.

Ueda SM, Kapp DS, Cheung MK, et al. Trends in demographic and clinical characteristics in women diagnosed with corpus cancer and their potential impact on the increasing number of deaths. **Am J Obstet Gynecol** 2008; 198:218-26.

Vadlakonda L, Dash A, Pasupuleti M, Kumar KA, Reddanna P. The paradox of Akt-mTOR interactions. **Front Oncol** 2013; 3:165.

Vanhaesebroeck B, Stephens L, Hawkins P. PI3K signalling: the path to discovery and understanding. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2012; 13:195-203.

Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. **Nat Rev Cancer** 2002; 2:489-501.

Wallach EE, Vlahos NF. Uterine myomas: an overview of development, clinical features and management. **Obstet Gynecol** 2004; 104:393-406.

Wu YL, Maachani UB, Schweitzer M, et al. Dual Inhibition of PI3K/AKT and MEK/ERK Pathways Induces Synergistic Antitumor Effects in Diffuse Intrinsic Pontine Glioma Cells. **Transl Oncol** 2017; 10:221-8.

Xiao GH, Jeffers M, Bellacosa A, et al. Anti-apoptotic signaling by hepatocyte growth factor/Met via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mitogen-activated protein kinase pathways. **Proc Natl Acad Sci USA** 2001; 98:247-52.

Yanai H, Wani Y, Notohara K, Takada S, Yoshino T. Uterine leiomyosarcoma arising in leiomyoma: Clinicopathological study of four cases and literature review. **Pathol Int** 2010; 60:506-9.

Yang Q, Guan KL. Expanding mTOR signaling. **Cell Res** 2007; 17:666-81.

Yu L, Saile K, Swartz CD, et al. Differential expression of receptor tyrosine kinases (RTKs) and IGF-1 pathway activation in human uterine leiomyomas. **Mol Med** 2008; 14:264-75.

Zaloudek C, Norris HJ. Mesenchymal tumors of the uterus. In: Kurman RJ, editor. **Blaustein's pathology of the female genital tract**. 4th ed. New York, Springer-Verlag; 1994. p.487-528.

Anexo 1 - Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP



**A.C. Camargo
Cancer Center**

**Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP**

São Paulo, 26 de junho de 2013.

Ao
Dr. Glauco Baiocchi Neto.

Aluno: Carlos Chaves Faloppa (Doutorado).

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1796/13

“Avaliação das expressões imunistoquímicas de Akt, mTOR, PTEN e PI3K em leiomiomas, leiomiomas atípicos e leiomiossarcomas uterinos”.

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente - Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 18/06/2013, aprovaram a realização do projeto do estudo em referência (datado de 29 de abril de 2013) e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

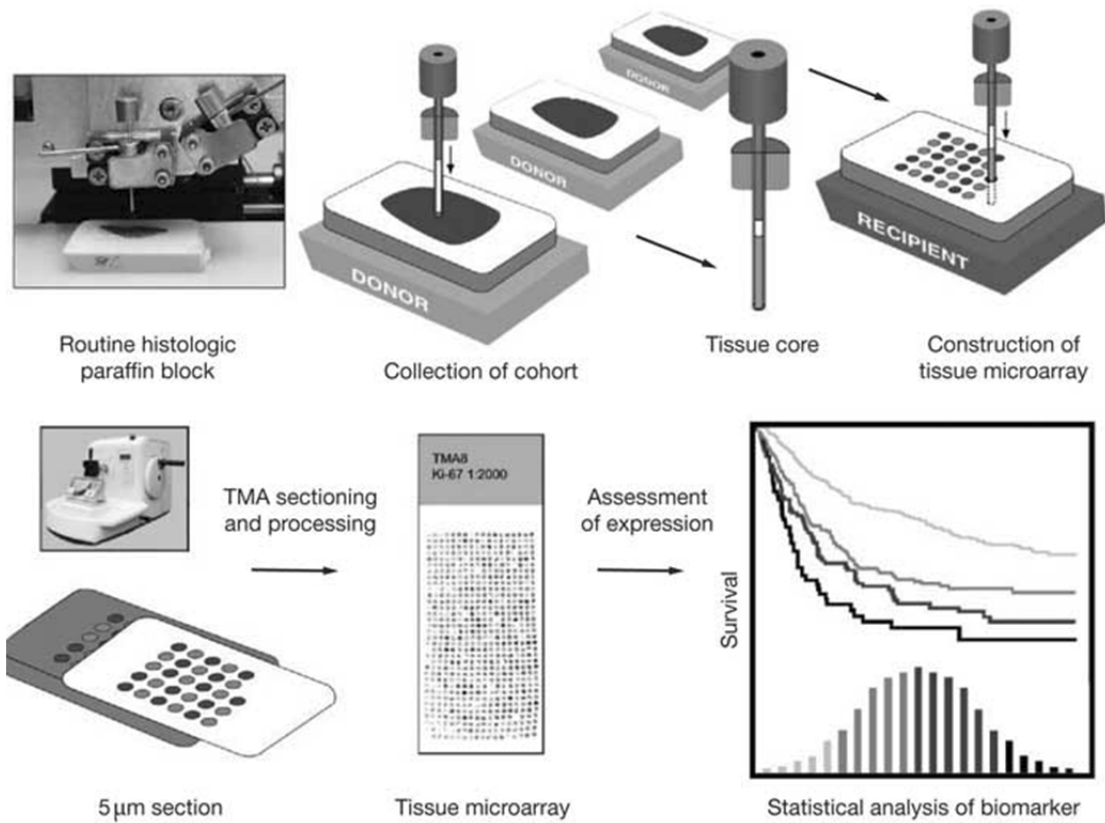
- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com Resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Termo de Dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido;
- Declaração Sobre os Dados Coletados, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração Sobre o Uso e Destino do Material Biológico, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Ginecologia do AC Camargo Cancer Center;
- Declaração de Infraestrutura e Instalações do Departamento de Ginecologia do AC Camargo Cancer Center;
- Cronograma do Estudo;
- Orçamento Financeiro Detalhado.

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas ao CEP dentro de 12 meses.

Atenciosamente,


Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

Anexo 2 - Construção do Tissue Microarray



Fonte: GILTNANE e RIMM (2004)

Apêndice 1 - Protocolo Sarcoma Uterino

PACIENTE

1. NOME- _____ nome
2. RGH- _____ rgh
3. DATA DE NASCIMENTO- _____/_____/_____ data_nasc
4. RAÇA- (0) branca (1) negro (2) pardo (3) amarelo.....|_____|raça
5. DATA DA ADMISSÃO _____/_____/_____ |cons
6. MENOPAUSA- (0) sim (1) não|_____|meno
7. IDADE DA MENOPAUSA.....|_____|idade_meno
8. RADIOTERAPIA PÉLVICA.....(0) não.....(1) sim.....|_____|rxt

SINTOMAS/EXAMES

9. SINTOMAS- (0) não (1) dor (2) sangramento (3) corrimento (4) massa pélvica
(5) outro.....|_____|sint
10. INTERVALO TEMPO PRIMEIROS SINTOMAS.....|_____|sint_temp
11. DIAGNOSTICO- (0) curetagem (1) histeroscopia (2) biopsia colo (3) achado pos operatório (4) outro -
qual?|_____|diag
12. AP- (1) carcinosarcoma (2) leiomiomasarcoma (3) estroma endometrial (4) adenosarcoma.....|_____|
13. CA 125 (0) não realizado (1) realizado|_____|ca125
14. VALOR DO CA 125 |_____|valor_ca125

TRATAMENTO

15. LOCAL CIRURGIA INICIAL- (0) ACC (1) fora |_____|1ª cir
16. TIPO DE TRATAMENTO INICIAL (quando não HTA): (0) não (1) miomectomia via aberta (2) miomectomia
via laparoscopia (3) ressecção pólio (3) outro - qual?|_____|tipo_tratapré
17. DATA DO TRATAMENTO INICIAL (quando não HTA). _____/_____/_____
18. 1ª CIRURGIA (qdo HTA) - DATA--..... _____/_____/_____ 1ª cir_data
19. TIPO DE CIRURGIA— (1) HTA (2) HTA+SOB (3) HTA+SOB+linf pelvica (4) HTA+SOB+linf
pélvica+retrop (5) exenteração anterior (6) exenteração posterior (7) exenteração total (8) linfadenectomia
pélvica +retroperitoneal|_____|tipo_1ª cir
20. 2ª CIRURGIA- DATA--..... _____/_____/_____ 2ª cir_data
21. TIPO DE CIRURGIA—|_____|tipo_2ª cir

ACHADOS OPERATORIO:

22. ASCITE (0) não (1) sim.....|_____|asc
23. CARCINOMATOSE..... (0) não (1) sim.....|_____|carcin
24. ADERENCIA TUMORAL(UTERO C/ ORGAOS)..... (0) não (1) sim.....|_____|adere_tumor
25. LINFONODOMEGALIA..... (0) não (1) sim.....|_____|linfonodo
26. METASTASE..... (0) não (1) sim.....|_____|meta

TRATAMENTO ADJUVANTE

27. RADIOTERAPIA EXTERNA- (0) não (1) sim ..dose?|_____|Rxt_ext
28. BRAQUITERAPIA- (0) não (1) sim ..dose?.....|_____|braq
29. QUIMIOTERAPIA- (0) não (1) sim. Qual?|_____|QT
30. HORMONIOTERAPIA- (0) não (1) sim Qual?.....|_____|hormonio

ANATOMIA PATOLOGICA

31. TAMANHO(CM)|_____|tamanho
32. LOCALIDADE- (0) FUNDO (1) CORPO (2) CERVIX (3) FUNDO-CORPO (4) FUNDO-CORPO-CERVIX
(5) CORPO-CERVIX.....|_____|local

