

**IMUNOEXPRESSÃO DE CLAUDINAS NOS
CARCINOMAS ENDOMETRIAIS E SUA
CORRELAÇÃO COM ASPECTOS
HISTOPATOLÓGICOS E CLÍNICOS**

ANNACAROLINA FABIANA LÚCIA DA SILVA

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do Título de Mestre
em Ciências**

Área de concentração: Oncologia

**Orientador: Prof. Dr. Fernando Augusto
Soares**

São Paulo

2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Silva, Annacarolina Fabiana Lúcia

Imunoexpressão de Claudinas nos carcinomas endometriais e sua correlação com aspectos histopatológicos e clínicos /

Annacarolina Fabiana Lúcia da Silva - São Paulo, 2010.

89p.

Dissertação (Mestrado) - Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Fernando Augusto Soares

Descritores: 1. ADESÃO CELULAR. 2. ENDOMÉTRIO. 3. CÂNCER DE ÚTERO. 4. IMUNOHISTOQUÍMICA. 5. CLAUDINAS.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais pelo apoio e confiança em todos os momentos.
Ao meu primo Giba pelo exemplo de vida e amor pela medicina.

AGRADECIMENTOS

À Fundação Antônio Prudente

À secretaria da pós graduação

À biblioteca do Hospital AC Camargo

Ao departamento de Anatomia Patológica

Ao SAME

Aos professores dos cursos de pós graduação

Aos meus professores de patologia geral da Universidade Federal do

Triângulo Mineiro (UFTM)

A todos os meus amigos, namorado Fernando e aqueles que estiveram ao

meu lado nas horas mais críticas, pela compreensão, auxílio e carinho

Ao Dr José Humberto Fregnani

Ao Prof. Dr Fernando Augusto Soares, pela confiança, paciência e apoio

fundamentais para conclusão deste trabalho

RESUMO

Silva AFL. **Imunoexpressão de Claudinas nos carcinomas endometriais e sua correlação com aspectos histopatológicos e clínicos.** 2010. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Introdução: As Claudinas, proteínas transmembrana recentemente descritas, são as principais proteínas constituintes das *Tight Junctions* e estudos sugerem que estão envolvidas na carcinogênese e progressão tumoral em vários tumores, incluindo os cânceres ginecológicos. **Objetivos:** Caracterizar a expressão das Claudinas 1, 2, 3, 4, 5, 7 no endométrio normal em várias fases, hiperplasias e pólipos endometriais adenocarcinomas tipo I e II e carcinossarcomas. Estabelecer comparações entre a intensidade de expressão das Claudinas e características clínicas e histopatológicas. **Material e métodos:** Estudo de coorte retrospectivo em que foram selecionadas 192 pacientes com diagnóstico de carcinoma endometrial e 132 pacientes sem diagnóstico de câncer (endométrio em várias fases, hiperplásico e pólipos), cujas amostras foram avaliadas segundo a expressão de Claudinas por estudo imuno-histoquímico em *tissue microarrays*. **Resultados e Conclusão:** A expressão da Claudina 1 associa-se aos tipos histológicos mais agressivos clinicamente (carcinomas tipo II e carcinossarcomas), assim como maior grau histológico, presença de metástases linfonodais e invasão linfovascular. Além disso, a diferença de expressão entre o endométrio normal, hiperplásico e adenocarcinomas endometrióides podem sugerir um possível papel desta molécula da via de carcinogênese dos carcinomas tipo I. A expressão da Claudina 3 associa-se com a presença de infiltração miometrial, podendo ser um preditor de comportamento mais agressivo das diversas categorias diagnósticas. A importância clínico-epidemiológica desta constatação se deve ao fato de estudos utilizando a CPE mostram que há afinidade entre esta e o domínio externo das Claudinas 3 e 4, podendo assim tornar-se uma opção terapêutica nos casos que expressam de forma moderada a intensa a Claudina 3.

SUMMARY

Silva AFL. **[Claudin immunoexpression in endometrial carcinomas and its correlation with histopathological and clinical factors]**. São Paulo; 2010. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Introduction: Claudins, proteins transmembrane described recently, are the major protein constituent of *tight junctions* and studies suggest they are involved in carcinogenesis and tumor progression in various tumors, including gynecologic cancers. **Objectives:** To characterize the expression of claudins 1, 2, 3, 4, 5, 7 in normal endometrium at various stages, hyperplasia, endometrial polyps, type I and II carcinomas and carcinosarcomas. Comparisons between the intensity of expression of claudins and clinical and histopathological features. **Methods:** A retrospective cohort study in which were selected 192 patients with endometrial carcinoma and 132 patients without cancer (endometrium at various stages, hyperplastic endometrium and polyps), whose samples were evaluated according to the expression of claudins by immunohistochemistry on tissue microarrays. **Results and Conclusion:** The expression of Claudin 1 is associated with clinically more aggressive histologic types (type II carcinomas and carcinosarcomas), and higher histological grade, presence of lymph node metastasis and lymphovascular invasion. Furthermore, the difference in expression between normal endometrium, hyperplastic and endometrioid adenocarcinomas may suggest a possible role of this molecule on the pathway of carcinogenesis carcinoma type I. The expression of Claudin 3 is associated with the presence of myometrial infiltration and may be a predictor of more aggressive behavior of the various diagnostic categories. The clinical and epidemiological importance of this finding is because of studies using the CPE show that there is affinity between it and the external domain of claudins 3 and 4 can thus become a therapeutic option in cases involving moderately or intense expression of Claudin 3.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema mostrando as <i>tight junctions</i> e junções aderentes no papel de adesão intercelular.....	9
Figura 2	Diagrama esquemático de uma <i>tight junction</i> . As setas denotam as funções de barreira e fenda.....	10
Figura 3	Estrutura molecular das Claudinas.....	10
Figura 4	Claudina 1. Distribuição das categorias diagnósticas de acordo com a expressão da Claudina 1 (positivo ou negativo). Abscissa indica as categorias diagnósticas e ordenada número de amostras.....	47
Figura 5	Claudina 1. Distribuição das amostras dos carcinomas endometriais de acordo com a com a expressão da Claudina 1 (positivo ou negativo). Abscissa indica intensidade de coloração e ordenada número de amostras..	47
Figura 6	Claudina 1, imunoexpressão negativa. Aumento de 200x.....	49
Figura 7	Claudina 1, imunoexpressão positiva. Aumento de 200x.....	49
Figura 8	Claudina 2, imunoexpressão negativa. Aumento de 200x.....	50
Figura 9	Claudina 1, imunoexpressão negativa. Aumento de 200x.....	50
Figura 10	Claudina 3. Distribuição das categorias diagnósticas de acordo com a expressão da Claudina 3 (positivo ou negativo). Abscissa indica as categorias diagnósticas e ordenada número de amostras.....	53

Figura 11	Claudina 3. Distribuição das amostras dos carcinomas endometriais de acordo com a com a expressão da Claudina 3 (positivo ou negativo). Abscissa indica intensidade de coloração e ordenada número de amostras..	53
Figura 12	Claudina 3, imunoexpressão negativa. Aumento de 200x.....	55
Figura 13	Claudina 3, imunoexpressão positiva. Aumento de 200x.....	55
Figura 14	Claudina 4. Distribuição das categorias diagnósticas de acordo com a expressão da Claudina 4 (positivo ou negativo). Abscissa indica as categorias diagnósticas e ordenada número de amostras.....	58
Figura 15	Claudina 4. Distribuição das amostras dos carcinomas endometriais de acordo com a com a expressão da Claudina 4 (positivo ou negativo). Abscissa indica intensidade de coloração e ordenada número de amostras..	58
Figura 16	Claudina 4, imunoexpressão negativa. Aumento de 200x.....	60
Figura 17	Claudina 4, imunoexpressão negativa. Aumento de 200x.....	60
Figura 18	Claudina 5. Distribuição das categorias diagnósticas de acordo com a expressão da Claudina 5 (positivo ou negativo). Abscissa indica as categorias diagnósticas e ordenada número de amostras.....	63
Figura 19	Claudina 5. Distribuição das amostras dos carcinomas endometriais de acordo com a intensidade de coloração da membrana. Abscissa indica intensidade de coloração e ordenada número de amostras.....	63

Figura 20	Claudina 5, imunoexpressão negativa. Aumento de 200x.....	65
Figura 21	Claudina 5, imunoexpressão positiva. Aumento de 200x.....	65
Figura 22	Claudina 7. Distribuição das categorias diagnósticas de acordo com a expressão da Claudina 7 (positivo ou negativo). Abscissa indica as categorias diagnósticas e ordenada número de amostras.....	68
Figura 23	Claudina 7. Distribuição das amostras dos carcinomas endometriais de acordo com a intensidade de coloração da membrana. Abscissa indica intensidade de coloração e ordenada número de amostras.....	68
Figura 24	Claudina 7, imunoexpressão negativa. Aumento de 200x.....	70
Figura 25	Claudina 7, imunoexpressão positiva. Aumento de 200x.....	70
Figura 26	Análise do tempo de sobrevida livre de recorrência de acordo com o estadiamento (análise univariada).....	73
Figura 27	Análise do tempo de sobrevida livre de recorrência de acordo com o tipo histológico (análise univariada).....	73
Figura 28	Análise do tempo de sobrevida livre de recorrência de acordo com o grau histológico (análise univariada).....	74
Figura 29	Análise de sobrevida livre de recorrência de acordo com a década de tratamento (análise univariada).....	74
Figura 30	Análise de sobrevida global de acordo com a expressão de Claudina 4 (análise univariada).....	76

Figura 31	Análise de sobrevida global de acordo com o estadiamento (análise univariada).....	76
Figura 32	Análise de sobrevida global de acordo com o tipo histológico (análise univariada).....	77
Figura 33	Análise de sobrevida global de acordo com o grau histológico (análise univariada).....	77
Figura 34	Análise de sobrevida global de acordo com a década do tratamento (análise univariada).....	78

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1	Distribuição das amostras endometriais segundo as categorias diagnósticas.....	41
Tabela 2	Distribuição das amostras endometriais segundo as categorias diagnósticas por agrupamento de lesões.....	41
Tabela 3	Categorias diagnósticas dos carcinomas endometriais.....	41
Tabela 4	Hiperplasias endometriais, distribuição das amostras.....	41
Tabela 5	Endométrio normal e atrófico, distribuição das amostras.....	42
Tabela 6	Grau histológico dos carcinomas endometriais, distribuição das amostras.....	42
Tabela 7	Distribuição dos casos de carcinoma segundo a presença de infiltração miometrial.....	42
Tabela 8	Distribuição dos casos de carcinoma segundo a profundidade de infiltração miometrial.....	43
Tabela 9	Distribuição dos casos de carcinoma segundo a presença de invasão neoplásica linfovascular.....	43
Tabela 10	Distribuição dos casos de carcinoma segundo o estatus de comprometimento linfonodal por carcinoma.....	43
Tabela 11	Distribuição das pacientes segundo o uso de Tamoxifeno....	43
Tabela 12	Distribuição das pacientes segundo o intervalo de tempo de uso de Tamoxifeno.....	43

Tabela 13	Distribuição das pacientes segundo o tipo de procedimento cirúrgico realizado para diagnóstico ou tratamento.....	44
Tabela 14	Distribuição das pacientes segundo a década do tratamento..	44
Tabela 15	Distribuição das pacientes segundo o tratamento adjuvante ou neoadjuvante.....	44
Tabela 16	Claudina 1: Distribuição das amostras segundo a intensidade de coloração.....	46
Tabela 17	Distribuição das amostras de carcinoma endometrial segundo a positividade para Claudina 1 e sua correlação com características histopatológicas e clínicas	48
Tabela 18	Claudina 3: Distribuição das amostras segundo a intensidade de coloração.....	52
Tabela 19	Distribuição das amostras de carcinoma endometrial segundo a positividade para Claudina 3 e sua correlação com características histopatológicas e clínicas	54
Tabela 20	Claudina 4: Distribuição das amostras segundo a intensidade de coloração.....	57
Tabela 21	Distribuição das amostras de carcinoma endometrial segundo a positividade para Claudina 4 e sua correlação com características histopatológicas e clínicas	59
Tabela 22	Claudina 5: Distribuição das amostras segundo a intensidade de coloração.....	62
Tabela 23	Distribuição das amostras de carcinoma endometrial segundo a positividade para Claudina 5 e sua correlação com características histopatológicas e clínicas.....	64

Tabela 24	Claudina 7: Distribuição das amostras segundo a intensidade de coloração.....	67
Tabela 25	Distribuição das amostras de carcinoma endometrial segundo a positividade para Claudina 7 e sua correlação com características histopatológicas e clínicas.....	69
Tabela 26	Fatores de risco para recorrência em 5 anos de acordo com o modelo de riscos proporcionais de Cox. Variáveis de ajuste consideradas na análise: estadiamento, tipo histológico, grau histológico e década de tratamento (excluíram-se da análise as mulheres no estágio IVB).....	72
Tabela 27	Fatores de risco para óbito em 5 anos de acordo com o modelo de riscos proporcionais de Cox. Variáveis de ajuste consideradas na análise: estadiamento, tipo histológico, grau histológico, idade e década de tratamento.....	75
Quadro 1	Características dos anticorpos utilizados.....	26
Quadro 2	Estadiamento TNM (2002) / FIGO 1988.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS

CAR	Coksakie e Adenovirus Receptor
CI	Claudina
CI 1	Claudina 1
CI2	Claudina 2
CI3	Claudina 3
CI4	Claudina 4
CI5	Claudina 5
CI7	Claudina 7
CPE	Enterotoxina citolítica do Clostridium perfringens
dp	Desvio padrão da média
EPC	Molécula de adesão EPCAM
Est FIGO	Estadiamento segundo a FIGO
FIGO	Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
HE	Hematoxilina Eosina
HESA	Hiperplasia endometrial simples sem atipias
HEA	Hiperplasia endometrial atípica
IH	Imuno-histoquímica
IM	Infiltração miometrial
IV	Invasão linfovascular
JAM	Molécula de adesão juncional
Linfonodo meta	Presença de metástase linfonodal
OMS	Organização Mundial da Saúde
TJ	<i>Tight Junction</i>
TMA	<i>Tissue microarray</i>
TNM	Sistema TNM de estadiamento
UV	ultravioleta

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	<i>Tight Junctions</i>	2
1.2	Claudinas.....	4
1.2.1	Claudina 1	11
1.2.2	Claudina 2	11
1.2.3	Claudina 3	12
1.2.4	Claudina 4	12
1.2.5	Claudina 5	12
1.2.6	Claudina 7	13
1.3	Claudinas e câncer ginecológico	13
1.4	Claudinas e endométrio.....	15
1.5	Claudinas: possíveis alvos terapêuticos.....	17
2	OBJETIVOS DO ESTUDO.....	19
3	JUSTIFICATIVA.....	20
4	MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1	Pacientes e amostras biológicas	21
4.1.1	Critérios de inclusão	22
4.1.2	Critérios de exclusão	22
4.1.3	Revisão de casos	22
4.2	<i>Tissue microarray</i> e imuno-histoquímica	24
4.3	Classificação da expressão protéica	28
4.4	Banco de dados clínicos e patológicos.....	30
4.5	Análise estatística.....	35
5	RESULTADOS.....	37

6	DISCUSSÃO	79
7	CONCLUSÃO	83
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

1 INTRODUÇÃO

O carcinoma endometrial é a malignidade mais prevalente do trato genital feminino nos países desenvolvidos (SOBEL et al. 2006). O carcinoma de endométrio pode ser classificado biológica e histologicamente em dois grupos distintos, com patogêneses distintas (SOBEL et al. 2006). A forma mais comum que compreende cerca de 80% dos carcinomas endometriais é o chamado endometrióide ou tipo I (SOBEL et al. 2006; PAN et al. 2007) que, de forma geral é de baixo grau, estrogênio dependente e usualmente associado a hiperplasia complexa e atípica, com melhor prognóstico. Os carcinomas mais agressivos, não dependentes de estrogênios, chamados tipo II, ocorrem em mulheres mais velhas, pós menopausa, sendo de alto grau e não se associam a hiperplasia. Os tipos histológicos mais comuns são os carcinomas seroso e células claras (KOUL et al. 2002; LAX 2004; ZORN et al. 2005; HECHT e MUTTER 2006; SOBEL et al. 2006). Por outro lado, há casos em que se observa uma sobreposição de padrões clínico, morfológico, imuno-histoquímico e molecular entre os dois tipos (KOUL et al. 2002; LAX 2004; ZORN et al. 2005; HECHT e MUTTER 2006; SOBEL et al. 2006).

O modelo de carcinogênese estrogênio dependente nos carcinomas tipo I denota a progressão de endométrio normal, hiperplasia complexa atípica e carcinoma. Isso não ocorre com os tumores tipo II. Diferentes anormalidades genéticas têm sido detectadas nos carcinomas do

endométrio como instabilidade de microssatélites, mutações nos genes PTEN, KRAS, Beta-catenina e TP53, perda de heterozigose em vários cromossomos, acrescentando novas informações ao modelo dualístico para a carcinogênese endometrial (KOUL et al. 2002; LAX 2004; ZORN et al. 2005; HECHT e MUTTER 2006; SOBEL et al. 2006).

Devido ao curso mais agressivo dos tumores tipo II, uma detalhada caracterização das características celulares e histogênese dos dois tipos pode facilitar o diagnóstico e até mesmo proporcionar um tratamento mais efetivo além de novas formas de tratamento (SOBEL et al. 2006; PAN ET AL. 2007).

As Claudinas, proteínas transmembrana recentemente descritas, são as principais proteínas constituintes das *Tight Junctions* e estudos sugerem que estão envolvidas na carcinogênese e progressão tumoral em vários tumores, incluindo os cânceres ginecológicos (SWISSHELM et al. 2005; SOBEL et al. 2006; OLIVEIRA e MORGADO-DIAZ 2007; PAN et al. 2007).

1.1 TIGHT JUNCTIONS

A estrutura molecular das *tight junctions* (TJ) tem sido objeto de extensos estudos que mostram que as TJ são constituídas por proteínas periféricas e integrais da membrana plasmática. Porém, o seu papel nos eventos patofisiológicos incluindo o desenvolvimento dos carcinomas humanos começou a ser estudado recentemente (OLIVEIRA e MORGADO-DIAZ 2007). Tem-se buscado compreender o envolvimento destas proteínas

no estabelecimento da polaridade das células, controle do transporte paracelular, transdução de sinais e tumorigênese (OLIVEIRA e MORGADO-DIAZ 2007).

As TJ são parte de um complexo juncional apical e são intimamente envolvidas na permeabilidade e polaridade celular. São junções ocludentes e servem como uma membrana de permeabilidade seletiva (ALBERTS et al. 2002) agindo como uma barreira entre os tecidos e regulando os movimentos paracelulares de solutos de acordo com gradientes osmóticos. Possuem também função de rede mantendo a composição diferencial entre os domínios apical e basolateral por prevenir a livre difusão de lipídios e proteínas entre os compartimentos (OLIVEIRA e MORGADO-DIAZ 2007). Enquanto as junções aderentes e desmossomos são primariamente envolvidas na adesão célula a célula e as junções GAP, na comunicação célula a célula, as TJ têm uma função de selo entre as porções apicais adjacentes às membranas celulares basolaterais (KOMINSKY 2006).

Cada TJ é composta por proteínas de adesão transmembrana e os domínios extracelulares dessas proteínas interagem entre si para ocluir o espaço intercelular (ALBERTS et al. 2002). Vários constituintes moleculares das TJ têm sido identificados sendo os mais importantes: Claudinas, Ocludinas, Moléculas de Adesão Juncional (JAM) (OLIVEIRA e MORGADO-DIAZ 2007). e os mais recentemente descritos tricelulinas e *Coxsackie e Adenovírus Receptor* (CAR) (TSUKITA et al. 2008). As Claudinas, Ocludinas e Tricelulinas possuem quatro domínios transmembrana e as JAM e CAR são proteínas transmembrana isoladas ou com apenas um domínio. A

organização e função destes componentes isolados ou em conjunto é complexa e é uma das principais linhas de estudo de grupos que buscam entender os papéis destas moléculas na regulação do microambiente das células epiteliais e de funções biológicas como controle de proliferação celular auxiliando, em última instância, na busca por novos tratamentos anti-câncer (TSUKITA et al. 2008). Figuras 1, 2, 3.

As TJ são encontradas principalmente nas células epiteliais e endoteliais (SOINI 2005). Acredita-se que a perda das funções normais das TJ constituam a marca dos carcinomas humanos (SWISSELM et al. 2005; OLIVEIRA e MORGADO-DIAZ 2007).

1.2 CLAUDINAS

Desde a sua descoberta em 1998 muitas pesquisas mostram que as Claudinas são as principais proteínas constituintes das TJ (OLIVEIRA e MORGADO-DIAZ 2007). As Claudinas são membros de uma família de múltiplos genes com cerca de 24 membros em humanos e camundongos apresentando padrões individuais de expressão nos tecidos (SWISSELM et al. 2005; OLIVEIRA e MORGADO-DIAZ 2007) isto é, exibem padrões específicos de distribuição entre tecidos normais e tumores correspondentes (PAN et al. 2007). Células individuais podem expressar múltiplos membros dessa família ou um único tipo (KOMINSKY 2006). Devido a sua versatilidade as Claudinas parecem ser mais importantes para as funções seletivas e sítio específicas das TJ (SOINI 2005). As Claudinas são

proteínas transmembrana com quatro regiões mantidas na membrana, duas alças extracelulares, uma intracelular e domínios citoplasmáticos N e C terminais, ver Figura 3 (RANGEL et al. 2003; HEWITT et al. 2006; OLIVEIRA e MORGADO-DIAZ 2007).

O alto grau de organização celular tipicamente observado em tecidos normais diferenciados são frequentemente perdidas no câncer. As células tumorais exibem deficiências nas funções das TJ, responsáveis pela diferenciação e polaridade celular. A perda da integridade das TJ pode ser particularmente importante na difusão de nutrientes e outros fatores necessários para a sobrevivência e crescimento tumoral. A diminuição da polaridade e diferenciação podem ser importantes no fenótipo metastático. A relação entre a expressão de Claudinas e iniciação ou progressão do câncer permanece pouco clara (RANGEL ET AL. 2003). Recentemente tem-se observado que os níveis de expressão de algumas Claudinas estão alterados em cânceres se comparados às células normais (TSUKITA et al. 2008). A superexpressão ou subexpressão de um mesmo tipo de Claudina variam dependendo do tipo de câncer (TSUKITA et al. 2008).

A perda de funções das TJ pode estar relacionada a progressão tumoral especialmente através da perda da adesão célula a célula e diferenciação celular. Alguns estudos têm mostrado que as Claudinas são subexpressas em alguns tipos de câncer. Por exemplo, a Claudina 1 está reduzida no câncer de mama onde parece ter uma potencial função de supressão tumoral, assim como no carcinoma colônico em que está associada a recorrências e diminuição da sobrevivência. A Claudina 7 tem sido

relatada como subexpressa no carcinoma de mama invasivo, correlacionando-se com o grau histológico e metástases, assim como nos carcinomas da cabeça e pescoço, corroborando com a hipótese de que a expressão de proteínas relacionadas a adesão está reduzida no câncer. A diminuição da expressão de proteínas relacionadas a TJ, especialmente as Claudinas está em concordância com a hipótese de que a tumorigênese é acompanhada pela rotura de TJ e perda de adesão célula a célula, um processo que pode ter papel na perda de diferenciação, perda de coesão e invasividade. Por outro lado, alguns estudos mostram que algumas Claudinas estão superexpressas em determinados tipos de câncer. A superexpressão de Claudina 4 nas células pancreáticas causa redução na invasividade, tumorigenicidade, e potencial metastático. A superexpressão de Claudina 1 nos carcinomas de tireóide não ocorre nos casos agressivos.. A superexpressão de Claudinas parece ser um evento precoce na carcinogênese e pelo menos para alguns tipos celulares pode ser encontrada em lesões precursoras. Por exemplo, o adenocarcinoma esofágico e seus precursores apresentam aumento da expressão de Claudinas 3, 4 e 7 (HEWITT et al. 2006; OLIVEIRA e MORGADO-DIAZ 2007).

As razões para essas discrepâncias observadas na expressão entre os diferentes tecidos é pouco clara. Pode estar relacionada a diferenças tecido-específicas das funções das Claudinas, ou até mesmo devido às características do microambiente. Permanece a dúvida se a superexpressão de Claudinas pode estar associada a perda de polaridade celular. O

aumento de permeabilidade celular no câncer colorretal a despeito da superexpressão de Claudinas poderia ser explicada pela redução na expressão de outras proteínas das TJ como a Ocludina que é subexpressa no câncer colorretal (OLIVEIRA e MORGADO-DIAZ 2007).

A perda de inibição por contato que reflete uma desordem na via de transdução de sinal e interações célula a célula é típica dos eventos precoces e tardios da progressão tumoral. A TJ é importante na adesão intercelular, sinalização e está envolvida na regulação da proliferação, diferenciação e polarização celular. Neste contexto poucos estudos investigam o significado funcional das alterações das Claudinas na tumorigênese. Acredita-se que as Claudinas cooperem para a estabilidade da polaridade celular e as alterações na localização e expressão destas, podem levar a distúrbios de polarização observados no câncer. As Claudinas podem também contribuir para a invasividade do câncer pois podem interagir com metaloproteinases, como metaloproteinases 2 e 4 e promover ou exacerbar a sua atividade. A superexpressão de Claudina 3 e 4 nas células epiteliais ovarianas resultam em aumento de atividade de metaloproteinases, com aumento da mobilidade celular e invasão. Em geral, o aumento da expressão de Claudinas parece aumentar a capacidade de invasão e metástase dos carcinomas (RANGELL et al. 2006; OLIVEIRA e MORGADO-DIAZ 2007).

Um estudo recente corrobora com esta idéia por mostrar uma forte associação entre uma maior expressão de Claudina 4 e pior sobrevida nos carcinomas gástricos. Por outro lado, em alguns carcinomas mamários a

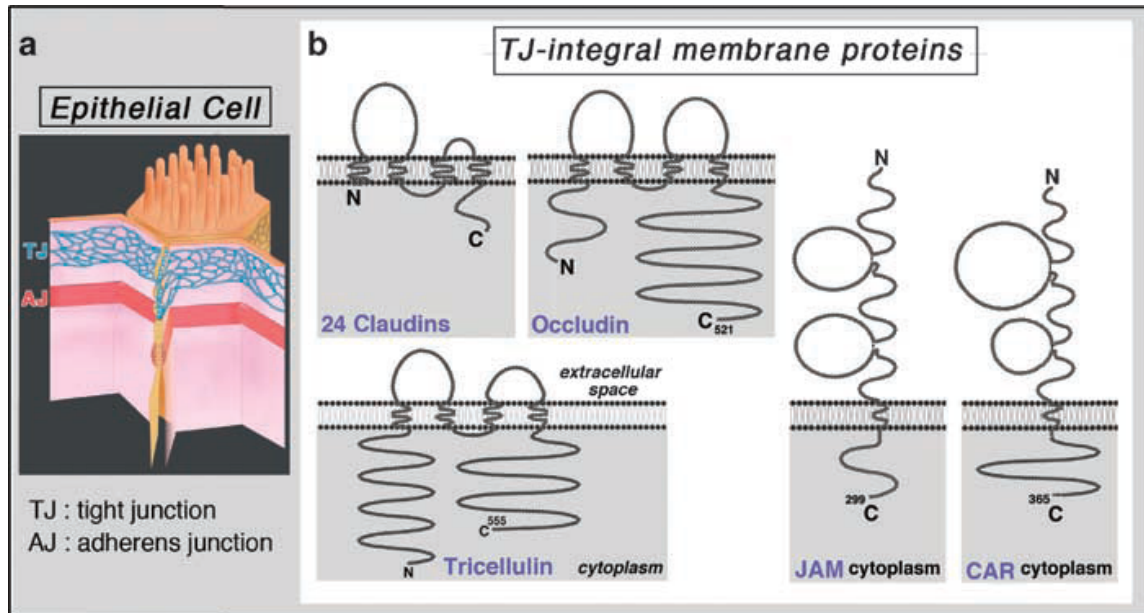
subexpressão de Claudinas está relacionada a um aumento de invasão e pior prognóstico (OLIVEIRA e MORGADO-DIAZ 2007).

Há outras funções recentemente atribuídas às Claudinas como influência na apoptose, ação no ciclo celular, migração celular e manutenção do citoesqueleto podendo auxiliar na compreensão do seu papel na etiopatogenia do câncer (SWISSHELM et al. 2005; KOMINSKY 2006; OLIVEIRA e MORGADO-DIAZ 2007; PAN et al. 2007). Por outro lado mutações relacionadas a tumorigênese não tem sido observadas nos genes das Claudinas embora mutações câncer dependentes nos genes das Claudinas não possam ser excluídas (TSUKITA et al. 2008).

O quanto a expressão das Claudinas é causa ou consequência da carcinogênese ainda não está claro e como poderiam contribuir para a progressão tumoral pode ser um tema interessante para estudos futuros (RANGEL et al. 2006; OLIVEIRA e MORGADO-DIAZ 2007). O que os estudos mais recentes mostram é que as Claudinas além de sua função de barreira intercelular podem ter papel na migração e invasividade das células cancerígenas. No entanto o papel da sub ou superexpressão de cada tipo de Claudina e a determinação da função de cada uma delas na tumorigênese permanece incerta até o momento (TAKEHARA et al. 2009).

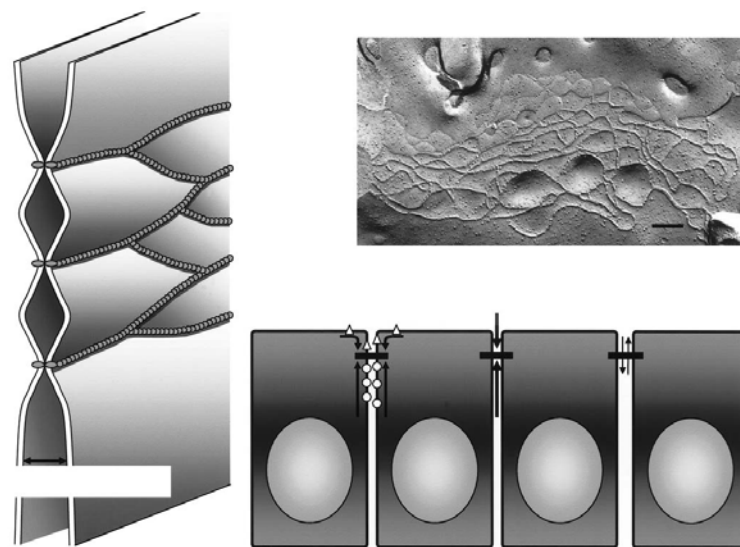
Há poucos estudos histopatológicos que avaliam a presença e a forma de expressão dos vários tipos de Claudinas nos tecidos tumorais (SOINI 2005). Como essas proteínas mostram expressões específicas e diferentes de acordo com o tipo de epitélio podem se tornar úteis no

diagnóstico diferencial entre os tipos de tumores epiteliais (SOINI 2005). e na compreensão dos eventos da tumorigênese.



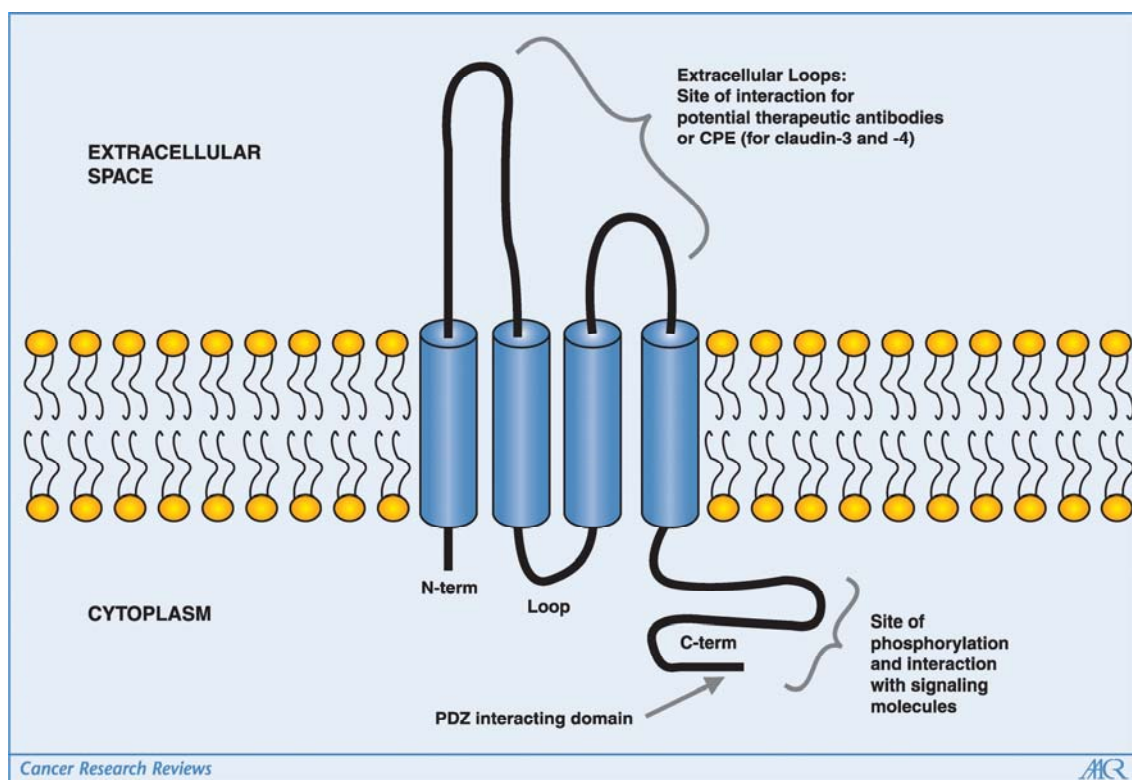
Fonte: TSUKITA et al. (2008).

Figura 1 - Esquema mostrando as *Tight junctions* e Junções aderentes no papel de adesão intercelular. b demonstra os componentes das *tight junctions*.



Fonte: SAWADA et al. (2003)

Figura 2 - Diagrama esquemático de uma *tight junction*. As setas denotam as funções de barreira e rede.



Fonte: MORIN (2005)

Figura 3 - Estrutura molecular das Claudinas (31)

1.2.1 Claudina 1

Este tipo de Claudina é expresso em uma ampla variedade de tumores, em geral com coloração forte na membrana plasmática. Cora também epitélios normais mas em intensidade muito maior nos carcinomas (SOINI 2005). A Claudina 1 é encontrada por exemplo em epitélios escamosos normais (SZABÓ et al. 2009). A superexpressão de Claudina 1 é encontrada principalmente em melanomas, carcinomas de células escamosas orais e genitais, adenocarcinomas prostáticos e adenocarcinomas cólon-rectais (SZABÓ et al. 2009).

Nos carcinomas escamosos da cavidade oral, se superexpressas, relacionam-se a pior prognóstico, com maior percentual de infiltração perineural e metástase linfonodal (SZABÓ et al. 2009).

A diminuição da expressão por outro lado relaciona-se a menor sobrevida em adenocarcinomas pulmonares e alguns tipos de carcinomas de mama e cólon-rectais (KOMINSKY et al. 2003; SZABÓ et al. 2009).

1.2.2 Claudina 2

A imunoexpressão de Claudina 2 é variável, podendo ser membranosa ou com padrão citoplasmático granular (SOINI 2005). Há uma ampla variação de expressão dentro dos mesmos tipos histológicos de uma ampla categoria de tumores (SOINI 2005).

TAKEHARA et al. (2009) sugere que a superexpressão de Claudina 2 estimula o desenvolvimento do câncer por diminuir a função de barreira intercelular das TJ e por aumentar a migração celular.

1.2.3 Claudina 3

A Claudina 3 apresenta em geral forte coloração de membrana em vários tipos de carcinomas e em geral é negativa nos carcinomas gástricos, renais e prostáticos. Tumores vasculares podem ser positivos para Claudina 3 assim como para Claudina 5 (SOINI 2005).

1.2.4 Claudina 4

A imunorreatividade para Claudina 4 em geral é forte e membranosa. Carcinomas negativos para este marcador incluem os originados no fígado e rim (SOINI 2005).

Acredita-se que a Claudina 4 possa também ser usada no diagnóstico diferencial entre células mesoteliais e epiteliais. O estudo de Fachetti et al demonstrou que células mesoteliais reativas ou malignas não expressam Claudina 4, ao contrário de carcinomas metastáticos de diversos sítios, auxiliando no diagnóstico diferencial (FACCHETTI et al. 2007).

1.2.5 Claudina 5

A Claudina 5, como outras Claudinas apresenta marcação membranosa mais forte em tumores que no tecido normal. Porém esta expressão é ainda mais acentuada em carcinomas de alto grau (SOINI 2005). É considerado principalmente um marcador de células endoteliais.

1.2.6 Claudina 7

De forma geral a Claudina 7 cora a maioria dos tumores epiteliais em padrões citoplasmático e membranoso (SOINI 2005). No entanto é subexpressa em alguns carcinomas de mama e cabeça e pescoço (KOMINSKY et al. 2003). Na mama a perda de expressão correlaciona-se ao grau de carcinomas ductais in situ e invasivos (KALLIONIEMI e SUKUMAR 2003).

A Claudina 7 pode associar-se ao EPCAM (EpC) molécula de adesão celular amplamente expressa em carcinomas e correlaciona-se com pior prognóstico de alguns tumores além de ser fator iniciador de cânceres de mama, pâncreas e intestino. Acredita-se que o EpC favoreça o crescimento tumoral por interferir na adesão celular mediada por e-caderina e promover a superregulação da expressão do gene c-myc. A associação entre a Claudina 7 e EpC pode potencializar estas funções tendo papel na tumorigênese (NÜBEL et al. 2009).

Nenhuma Claudina é expressa em neoplasias mesenquimais ou linfomas. Pontualmente alguns tipos de Claudina podem corar células névicas, dendríticas, melanomas e tumores vasculares (SOINI 2005).

1.3 CLAUDINAS E CÂNCER GINECOLÓGICO

Alterações na expressão das Claudinas em diversos tumores malignos e lesões pré-malignas ginecológicas têm sido descritas. Na maioria dos cânceres ocorre uma diminuição da expressão de Claudinas, mas no

carcinoma do colo uterino algumas estão superexpressas. Claudinas 1, 2, 4 e 7 são superexpressas nas lesões intraepiteliais escamosas de alto (NIC2 e NIC 3) e baixo grau (NIC 1) se comparadas ao epitélio escamoso normal. Por outro lado, no carcinoma invasivo estas mesmas Claudinas são muito menos expressas, apesar de serem um pouco mais expressas se comparadas ao epitélio normal. LEE et al. (2005) analisaram 89 casos de lesões cervicais e observaram um aumento gradual da expressão de Claudinas 1 e 7 de acordo com a progressão de lesões de baixo para alto grau e carcinomas invasivos.

Claudinas 3 e 4 são superexpressas nos carcinomas ovarianos, principalmente serosos e menos expressas nos cistadenomas e tumores borderlines (SZABÓ et al. 2009). Claudina 7 também apresenta superexpressão na maioria dos subtipos de cânceres epiteliais do ovário (SZABÓ et al. 2009).

Em análises de sobrevida dos adenocarcinomas serosos do ovário a superexpressão de Claudina 3 é um fator prognóstico independente de sobrevida mais curta (SZABÓ et al. 2009). Além disso, Claudinas 3 e 7 expressas em efusões são fator prognóstico independente de pior sobrevida nestes tumores (SZABÓ et al. 2009). Claudinas 1, 4, 5 e 7 são expressas na maioria dos tumores ovarianos epiteliais de diversos subtipos, mas não em tumores mesenquimais ou neoplasias germinativas podendo ser usadas como marcadores de diferenciação epitelial em casos de difícil definição histológica (SOINI e TALVENSSARI-MATTILA 2006).

A expressão de Claudinas no carcinoma endometrial é discutida no item 1.4.

1.4 CLAUDINAS E ENDOMÉTRIO

Um estudo realizado por SOINI (2005). avaliou a expressão de Claudinas 1, 2, 3, 4, 5 e 7 em uma ampla gama de tumores incluindo diferentes tipos de carcinomas, linfomas, tumores vasculares e de partes moles além de lesões melanocíticas. Os tumores que mostraram positividade mais constante e regular para Claudinas 1, 2, 3, 4, 5 e 7 foram os carcinomas de endométrio e de tireóide. Em geral a imunoreatividade é claramente na membrana plasmática embora forte imunorreatividade citoplasmática também possa ser observada (SOINI 2005).

Recentemente evidenciou-se que a expressão de Claudina 3 e Claudina 4 aumentam gradualmente do endométrio normal a hiperplásico até o carcinoma endometrióide. Uma significativa superexpressão foi observada na hiperplasia atípica e no carcinoma endometrióide. Esses achados sugerem que o aumento na expressão dessas proteínas pode ser a chave de uma alteração precoce na progressão da doença e associada com a transformação maligna do endométrio normal. Podem especialmente se tornar marcadores úteis em conjunto com a avaliação morfológica clássica dos estágios pré-malignos e selecionar subpopulações de pacientes com aumento de risco de desenvolvimento de câncer endometrial (PAN et al. 2007).

No carcinoma endometrial os principais fatores que determinam o prognóstico são o grau histológico, estadió clínico e invasão miometrial. Observou-se que a superexpressão de Claudinas 3 e 4, especialmente a 4 correlaciona-se com a invasão miometrial nos carcinomas endometrióides. Pacientes com metástases linfonodais também mostraram maiores níveis de expressão dessas proteínas. Desse modo, podem se tornar potenciais marcadores prognósticos para discriminar subpopulações de tumores agressivos (PAN et al. 2007).

Os carcinomas serosos, tipo II, também apresentam superexpressão de Claudinas 3 e 4 o que, de maneira simples, pode sugerir que a superexpressão das Claudinas pode estar mesmo envolvida na carcinogênese endometrial (SOBEL et al. 2006; PAN et al. 2007; KONECNY et al. 2008).

Além disso a análise comparativa entre carcinomas serosos primários e suas metástases mostrou que as metástases apresentam maiores níveis de expressão de Claudinas 3 e 4 se comparadas aos tumores primários, mostrando mais uma vez que a expressão destas duas Claudinas pode estar relacionada a um comportamento mais agressivo (SANTIN et al. 2007a).

Os carcinosarcomas, tumores uterinos agressivos hoje considerados carcinomas metaplásicos, apresentam superexpressão de Claudinas 3 e 4 podendo ser também candidatos a terapias alvo-induzidas para receptores destas moléculas (SANTIN et al. 2007b).

SOBEL et al. (2006) tentaram acrescentar novas informações ao modelo dualístico de carcinogênese endometrial através do estudo da

expressão de diferentes Claudinas nos carcinomas endometrioides e serosos. Mostrou-se que é possível distinguir as duas entidades pelas expressões imuno-histoquímicas de Claudinas 1 e 2, o que poderia refletir diferentes vias celulares ou patogénéticas, assim como explicar diferenças nos padrões de adesão celular e propriedades invasivas. Os carcinomas endometrioides apresentam alta expressão de Claudina 2 e baixa de Claudina 1. O contrário ocorre com os carcinomas serosos. As proteínas 3, 4, 7 não se mostraram úteis nesta diferenciação, no entanto, sua intensa expressão nos tumores endometriais pode ser levada em consideração nos casos de pesquisa de sítios primários de metástases.

Contudo, ainda não está definido como a expressão de Claudinas contribui para a progressão neoplásica nos carcinomas endometriais.

1.5 CLAUDINAS: POSSÍVEIS ALVOS TERAPÊUTICOS

A expressão diferencial de Claudinas entre as células tumorais e normais e a sua localização na membrana celular tornam-nas candidatas a terapia alvo induzida.

Estudos pré-clínicos têm mostrado que as células tumorais que superexpressam Claudinas podem ser alvos de vários tipos de abordagens desde anticorpos anti-Claudinas até o uso da enterotoxina citolítica do *Clostridium perfringens* (CPE), que age principalmente sobre as Claudinas 3 e 4, que possuem receptores para esta toxina (SWISSHELM et al. 2005; SOBEL et al. 2006; PAN et al. 2007).

A CPE, principalmente associada ao *Clostridium perfringens* tipo A, é um polipeptídeo simples (SANTIN et al. 2007a) que atua principalmente através de citólise.

Estudos mostram que células cancerígenas mamárias modificadas ou carcinomas serosos disseminados no peritônio de ratos respondem a ação citolítica desta toxina em menos de 5 minutos levando a necrose maciça das células tumorais (SANTIN et al. 2007a e b; TSUKITA et al. 2008).

O grau de afinidade entre a CPE e as Claudinas tem sido estimada como: Claudina4>Claudina6>Claudina7>Claudina3>Claudina14>Claudina8 e não há afinidade entre CPE e as Claudinas 1, 2, 5 e 10. Deste modo, tumores com aumento da expressão das Claudinas citadas poderiam ser mais susceptíveis aos efeitos citolíticos da CPE. Além deste efeito direto, a CPE ligando-se ao domínio externo do receptor localizado nas Claudinas poderia ser endocitada juntamente com parte do receptor levando a redução da barreira intercelular das células neoplásicas facilitando a ação de outros quimioterápicos (TSUKITA et al. 2008).

Uma segunda possibilidade de medicamentos tendo Claudinas como alvo são os anticorpos contra Claudinas. As reações antígeno anticorpo podem destruir as moléculas das TJ ou enfraquecê-las e até mesmo induzir reações inflamatórias contra a célula de interesse. Podem também reduzir a permeabilidade das TJ causando alterações no microambiente celular e redução da proliferação celular (TSUKITA et al. 2008).

2 OBJETIVOS DO ESTUDO

- Caracterizar e comparar a expressão imuno-histoquímica de Claudinas 1, 2, 3, 4, 5 e 7 no tecido endometrial normal, em fases proliferativa, secretora e atrófica, na hiperplasia endometrial com ou sem atipias, pólipos endometriais e carcinomas endometriais tipos I e II e carcinossarcomas em *tissue microarrays*;
- Verificar se há correlação entre a expressão das Claudinas nos tumores tipos I e II e carcinossarcomas e características clínico-patológicas (tipo histológico, estadiamento, grau de diferenciação patológica, nível de infiltração miometrial, infiltração neoplásica vascular e metástases);
- Verificar se há correlação entre a expressão de Claudinas e prognóstico dos carcinomas (tempo de sobrevida livre de doença e sobrevida global).

3 JUSTIFICATIVA

O padrão de expressão das Claudinas nos carcinomas endometriais é pouco conhecida, e a determinação dos padrões pode auxiliar na detecção de lesões pré-neoplásicas, diferenciação entre os tipos histológicos e correlação com o prognóstico dos tumores.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 PACIENTES E AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Foram selecionadas dos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer AC Camargo, amostras de tecido fixado em formalina e incluídos em parafina e seus cortes correspondentes em lâminas coradas pela Hematoxilina e Eosina (HE).

Foram incluídas no estudo 192 pacientes do Hospital AC Camargo submetidas a procedimentos diagnósticos e/ou cirúrgicos de neoplasias endometriais sem tratamento quimio ou radioterápico relacionados a malignidades ginecológicas anteriores à obtenção da amostra biológica, no período de 1980 a 2006.

Todas as lâminas de HE foram submetidas a revisão por dois observadores independentes, médicos patologistas, sendo um deles o pesquisador (mestrando). Estabeleceu-se um consenso entre os observadores para os casos de dúvidas ou discordância. A classificação e graduação dos tipos histológicos foi realizada a partir dos critérios preconizados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e Federação Internacional de Ginecologia e obstetrícia (FIGO) (SILVERBERG et al. 2003).

As amostras não neoplásicas foram obtidas a partir do levantamento dos laudos anátomo-patológicos de 134 pacientes submetidas a

procedimentos terapêuticos ou diagnósticos no Hospital AC Camargo, no período de 1998 a 2006, por outras razões como leiomiomas, carcinomas de colo uterino sem comprometimento miometrial, prolapsos genitais ou por outras afecções em que não havia comprometimento neoplásico secundário do endométrio.

4.1.1 Critérios de inclusão

- ❖ mulheres submetidas a procedimentos diagnósticos e/ou cirúrgicos de neoplasias endometriais sem tratamento quimio ou radioterápico anterior à obtenção da amostra biológica
- ❖ amostras de endométrio não neoplásico obtidas de pacientes submetidas a procedimentos diagnósticos ou terapêuticos em decorrência de outras malignidades extra endometriais sem comprometimento secundário do endométrio e afecções benignas

4.1.2 Critérios de exclusão

Pacientes com malignidade epitelial concomitante em ovários e/ou tubas uterinas, em que não foi possível estabelecer o sítio primário da neoplasia.

4.1.3 Revisão dos casos

Os casos foram revisados e os diagnósticos reclassificados de acordo com critérios morfológicos estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde em 2003 (SILVERBERG et al. 2003) sendo os casos separados nas

seguintes categorias: pólipos endometriais, hiperplasia endometrial simples sem atipias, hiperplasia endometrial simples com atipias, hiperplasia endometrial complexa com atipias, adenocarcinoma endometriode, adenocarcinoma seroso, carcinoma de células claras e carcinosarcomas. Os tumores endometrioides não foram classificados quanto às suas variantes histológicas.

O sistema de graduação utilizado foi o proposto pela FIGO em 1988 e modificado por ZAINO et al. (1995) e revisado por ZAINO (2009).

A graduação dos carcinomas tipo I é baseada na porcentagem de áreas sólidas (grau arquitetural) e grau nuclear (ZAINO et al. 1995; CLEMENT e YOUNG 2002; SILVERBERG et al. 2003).

Grau arquitetural:

Grau 1: porcentagem de áreas sólidas menor ou igual a 5%

Grau 2: porcentagem de áreas sólidas entre 6 e 50%, excluindo-se áreas de diferenciação escamosa

Grau 3: porcentagem de áreas sólidas maior que 50%, excluindo-se áreas de diferenciação escamosa

Grau nuclear: 1, 2, 3

Grau 3: marcado pleomorfismo nuclear, cromatina grosseira e nucléolo evidente.

O grau arquitetural em geral corresponde ao grau final. A presença de atipia nuclear considerável interpretada como grau 3, eleva o grau final do adenocarcinoma em 1 grau. Por exemplo, um adenocarcinoma com grau

arquitetural 2 e grau nuclear 3, terá como grau final o valor 3 (ZAINO et al. 1995; CLEMENT e YOUNG 2002; SILVERBERG et al. 2003).

4.2 TISSUE MICROARRAY E IMUNO-HISTOQUÍMICA

Após a revisão das lâminas coradas pelo HE procedeu-se a seleção dos blocos de parafina e identificação das áreas de interesse nos mesmos com caneta marcadora. Os *tissue microarrays* (TMA) foram construídos através de ressecções por agulha das amostras de tecidos nos blocos de parafina originais (blocos “doadores”) e os fragmentos recolocados em um novo bloco de parafina (bloco “receptor”). Cada caso no bloco de parafina receptor foi representado por 1 ou 2 spots medindo cada um em média 1,0 milímetro (mm) de diâmetro.

As amostras foram distribuídas em 3 blocos de *tissue microarray* e a organização foi realizada da seguinte forma:

Array 1 - carcinomas endometrioides, hiperplasia endometrial simples sem atipias, pólipos endometriais e hiperplasia endometrial complexa com atipias;

Array 2 - carcinomas endometrioides e carcinomas serosos (incluindo carcinomas de células claras, carcinossarcomas e outros carcinomas);

Array 3 - pólipos endometriais, hiperplasias endometriais (simples sem atipias, simples com atipias e complexa com atipias), endométrio proliferativo, endométrio secretor, endométrio atrófico.

A seguir os blocos de TMA foram cortados e os seguintes passos para realização das reações imuno-histoquímicas foram seguidos e

realizados no laboratório de imuno-histoquímica do departamento de Anatomia Patológica do Hospital AC Camargo:

1) O bloco de TMA é cortado no micrótomo rotativo na espessura de 5 µm. Coloca-se o tape contra o bloco de TMA e corta-se. O tape com o material é colado na lâmina apropriada e com a pressão manual de um rolo o tape é fixado na lâmina. A lâmina com o tape sofre a irradiação com UV por 30 min, sendo em seguida mergulhada em solução solvente (TPC) e seca a temperatura ambiente. Os tapes são retirados após a secagem. As lâminas sofrem banho de parafina, estando prontas para o armazenamento em freezer.

2) Desparafinização das lâminas deixadas por 24 horas em estufa 60°C:

-Xilol a 60°C por 20 minutos

-Xilol à temperatura ambiente por 20 minutos

-Etanol 100% 30 segundos

-Etanol 85% 30 segundos

-Etanol 70% 30 segundos

3) Lavar as lâminas em água corrente e destilada.

4) Ferver a solução tampão citrato 10 mM pH 6.0 em panela de pressão (Eterna®, Nigro) destampada, mergulhar as lâminas e lacrar a panela com a válvula de segurança aberta.

Após a saída do vapor saturado, abaixar a válvula de segurança e aguardar a pressurização total. Cronometrar 4 minutos após esse sinal. Deixar a panela fechada sob água corrente até a despressurização total.

- 5) Destampar a panela com as lâminas e lavar em água corrente e destilada
- 6) Proceder ao bloqueio da peroxidase endógena com H_2O_2 3%, (água oxigenada 10 vol) com 3 trocas de 10 minutos cada. Lavar em água corrente e destilada e com solução salina tamponada com fosfatos (PBS-phosphate buffered saline) 10mM pH 7.4 por 5 minutos.
- 7) Incubar as lâminas com o anticorpo primário diluído em título pré-estabelecido, conforme quadro 1 abaixo, em tampão PBS contendo albumina bovina (BSA) 1% (Sigma, A9647, EUA) e azida sódica (NaN_3) 0,1%, por 18 horas a 4°C em câmara úmida.

Quadro 1 - Características dos anticorpos utilizados.

Anticorpos	Clones	Títulos	Fabricantes
Claudina 1	Policlonal feito em coelho	1:400	Zymed # 18-7362
Claudina 2	Policlonal feito em coelho	1:400	Neomarkers # RB9260, Fremont, CA, EUA
Claudina 3	Policlonal feito em coelho	1:400	Neomarkers # RB9651
Claudina 4	Policlonal feito em coelho	1:100	Affinity Bioreagents # PA1-20906,
Claudina 5	Policlonal feito em coelho	1:1000	Neomarkers # rb 9243
Claudina 7	Policlonal feito em coelho	1:800	Zymed # 18-7378

- 8) Lavar em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada.
- 9) Incubar por 30 min a 37° C com Novolink™ Pos Primary antibody (NovoLink Max Polymer cod# RE7260-k, Reino Unido).
- 10) Lavar com tampão PBS com 3 trocas de 3 min cada.
- 11) Incubar com o Novolink Polymer™ por 30 min a 37° C
- 12) Lavar em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada.

- 13) Incubar as lâminas em solução substrato: 100 mg% de 3,3' Diaminobenzidine Tetrahydrochloride (DAB) (Sigma, D-5637, EUA); 1 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO); 1 mL de H₂O₂ 6% (água oxigenada 20 vol); 100 mL de PBS; por 5 minutos a 37°C, ao abrigo da luz.
 - 14) Observar ao microscópio, nas lâminas controles, o desenvolvimento de precipitado castanho dourado, como produto final da reação.
 - 15) Lavar em água corrente e água destilada por 3 minutos.
 - 16) Contracorar com Hematoxilina de Harris por 1 minuto.
 - 17) Lavar bem em água corrente e destilada
 - 18) Imergir 2 vezes em água amoniacal (solução de hidróxido de amônio 0,5%), lavando em seguida em água corrente e destilada.
 - 19) Desidratar as lâminas em:
 - Etanol 80%, 30 segundos
 - Etanol 95%, 30 segundos
 - Etanol 100% 2 vezes, 30 segundos cada
 - Xilol 4 vezes, 30 segundos cada
 - 20) Montagem das lâminas em Entellan neu (Merck, 1.07961, Alemanha).
- As reações foram realizadas em duplicata em cada array a fim de se evitar a perda de representação de algum spot ou artefatos de coloração que prejudicassem a interpretação.

4.3 CLASSIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTEICA

A avaliação da intensidade de expressão dos marcadores é subjetiva e os critérios variam amplamente nos estudos anteriores (SOBEL et al. 2006; PAN et al. (2007).

Realizou-se a interpretação das reações imuno-histoquímicas nas lâminas de *tissue microarray* através de análise em microscópio ótico Nikon E200 avaliando-se o padrão e intensidade de coloração nas membranas plasmáticas e quantificação das células positivas. A avaliação da intensidade de coloração e porcentagem de células coradas foi feita de maneira independente. A categorização da intensidade de coloração e porcentagem de células positivas é descrita abaixo.

Intensidade de coloração:

Utilizamos a quantificação da intensidade em cruzes segundo PAN et al. (2007):

- sem coloração (negativo)

+ fraco

++ médio

+++ intensa

Optamos por categorizar a intensidade da seguinte maneira:

Escore 0: sem coloração (negativo)

Escore 1: positividade leve/fraca (+)

Escore 2: positividade moderada (++)

Escore 3: positividade intensa (+++)

Porcentagem de células coradas:

As células com maior intensidade de coloração foram contadas em cada spot e a proporção em 100 células foi estimada para a categorização em intervalos de células coradas.

- Escore 0: nenhuma
- Escore 1: 1 a 30% das células positivas com maior intensidade de coloração
- Escore 2: 31 a 60% das células positivas com maior intensidade de coloração
- Escore 3: >60% das células positivas com maior intensidade de coloração

A partir destes dois agrupamentos independentes (intensidade de coloração e porcentagem de células positivas) desenvolvemos um escore multiplicando as categorias de intensidade de coloração pela porcentagem de células positivas, obtendo as seguintes categorias:

- Negativo/Positivo leve: escores 0 a 1
- Positivo moderado: escores 2, 3 e 4
- Positivo forte: escores 6 a 9

Para a realização da análise estatística, as categorias foram agrupadas nos seguintes escores finais:

- ❖ Negativo: compreendendo os escores 0 - 1
- ❖ Positivo: compreendendo os escores 2 - 9

As análises relacionadas a comparações entre os grupos e análises uni e multivariadas levaram em consideração a separação em escores e o

agrupamento nas categorias negativo (0-1) e positivo (2-9), de forma semelhante ao que foi realizado no estudo de CHOI et al. (2009).

4.4 BANCO DE DADOS CLÍNICOS E PATOLÓGICOS

As seguintes variáveis foram coletadas a partir dos laudos anátomo-patológicos e consultas a prontuários de pacientes nos casos de carcinoma endometrial e tabuladas com as seguintes codificações:

a) Iniciais do nome das pacientes

b) Idade em anos

c) Raça

Codificação:

1- branca

2- negra

3-outras

d) Tempo de menopausa em anos (intervalo de tempo entre a idade de início da menopausa e idade ao diagnóstico)

e) Sintomas e/ou circunstâncias que levaram ao diagnóstico:

Codificação:

0- sangramento

1- alteração ultrassonográfica

2- biópsia prévia

3- dor abdominal

4- dor abdominal e sangramento

5- outros

f) Uso de tamoxifeno (se a paciente usou tamoxifeno previamente ao diagnóstico de carcinoma endometrial)

Codificação:

1-Sim

2-Não

g) Tempo de uso de tamoxifeno tabulado em meses até a data do diagnóstico

h) Tipo de cirurgia realizada para diagnóstico/terapêutica

Codificação:

0- Histerectomia total abdominal (HTA)

1- HTA + SOB (salpingooforectomia bilateral)

2- HTA+SOB+Linfadenectomia

3- Exanteração

4- Sem cirurgia (outro tratamento)

5- Curetagem

6- Histeroscopia

7- Laparotomia exploradora

8- HTA+SOB+ biópsias múltiplas do peritônio

i) Data da cirurgia

j) Diagnóstico anátomo-patológico original (sem revisão)

k) Grau histológico do diagnóstico anátomo-patológico original (sem revisão)

l) Tipo histológico após revisão de lâminas

0- Pólipo endometrial

- 1- Hiperplasia simples sem atipias
- 2- Hiperplasia simples com atipias
- 3- Hiperplasia complexa com atipias
- 4- Adenocarcinoma endometrióide
- 5- Adenocarcinoma seroso
- 6- Carcinoma de células claras
- 7- Carcinossarcoma
- 8- outros tumores epiteliais
- 9-Endométrio proliferativo
- 10-Endométrio secretor
- 11-Endométrio atrófico

M) Grau histológico da revisão

- 1- Grau 1
- 2- Grau 2
- 3- Grau 3

n) Nível de invasão miometrial

0- Restrito ao endométrio

1-<50% da parede

2->50% da parede

o) Avaliação de invasão angiolinfática:

Codificação:

0-não

1-sim

p) Comprometimento linfonodal:

0-não

1-Sim, metástase em linfonodo pélvico

2-Sim, metástase em linfonodo para-aórtico

3-Sim metástase linfonodal a distância

q) Terapia adjuvante

Codificação:

0- Nenhuma

1- Radioterapia

2- Quimioterapia

3- Hormonioterapia

4- Radio, quimio e braquiterapia

5- Radioterapia prévia a cirurgia

6- Radioterapia externa e braquiterapia

7- Radioterapia exclusiva

8- Radio e quimioterapia

9- Quimioterapia prévia

10- Braquiterapia

r) Estadiamento anátomo-patológico

Realizado de acordo com o sistema TNM 2002 (SOBIN e WITTEKIND 2004; ZAINO 2009), ver Quadro 2.

s) Estadiamento clínico:

Todos os casos foram uniformizados pelos critérios da Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO), 1988 (SOBIN e WITTEKIND 2004; ZAINO 2009), ver Quadro 2.

t) Recorrência

0-Não

1- Sim

u) Intervalo de tempo de recorrência

Intervalo de tempo em meses desde a cirurgia até a data da primeira recorrência

v) Follow up

Intervalo de tempo de seguimento em meses

x) Situação do último follow up

Codificação:

0- vivo sem doença

1- vivo com doença

2-sem follow up (tratou for a do hospital após diagnóstico ou cirurgia)

3- óbito por câncer endometrial

4- óbito por outras causas

z) Data do óbito

Nos casos não neoplásicos coletamos os mesmos dados acima relatados, salvo as diferenças entre a informação e o diagnóstico anátomo-patológico. Caso o caso não se encaixasse na categorização a informação foi referida como ignorado.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste de qui-quadrado foi usado para comparar proporções de variáveis categóricas de grupos não pareados, com mais de 20 casos no total, e ausência de valores esperados na tabela de contingência menores que 1 e menos de 20% dos valores menores que 5. Valores de probabilidade menores que 0.05 foram considerados significativos.

As curvas de sobrevida (Kaplan-Meier) foram utilizadas para a análise univariada. O modelo de riscos proporcionais de Cox foi utilizado para análise de sobrevida em análises multivariadas. Realizou-se a análise univariada dos fatores prognósticos por meio das curvas de sobrevida global e livre de doença. Os cálculos de probabilidade de sobrevida em 5 anos foram realizados através do estimador produto limite de Kaplan-Meier. Para a comparação das curvas de sobrevida utilizou-se o teste de log-rank. O modelo de riscos proporcionais de Cox foi empregado para a análise multivariada. As variáveis de interesse para a análise multivariada foram todas aquelas com o valor do nível descritivo do teste de até 0,20 na análise univariada e também as claudinas (de 1 a 7), independentemente dos valores de P. As variáveis de ajuste (compulsórias) do modelo multivariado para predição de óbito foram: estadiamento, tipo histológico, grau histológico, década em que ocorreu o tratamento e idade. O modelo multivariado para predição de recorrência adotou as mesmas variáveis de ajuste, exceto a idade. Em todos os testes estatísticos o nível de significância considerado foi de 5%.

Quadro 2 - Estadiamento TNM 2002/FIGO 1988.

TNM T	TNM N	TNM M	FIGO 1988	CLASSIFICAÇÃO
TX	N0	M0	-	Tumor primário não localizado
T0	N0	M0	-	Sem evidência de tumor primário
Tis	N0	M0	0	Carcinoma “in situ”
T1	N0	M0	I	Tumor restrito ao corpo uterino
T1a	N0	M0	IA	Tumor restrito ao endométrio
T1b	N0	M0	IB	Tumor invade menos da metade da espessura do miométrio
T1c	N0	M0	IC	Tumor invade a metade ou mais da espessura do miométrio
T2	N0	M0	II	Tumor invade o colo uterino mas não se estende além do útero
T2a	N0	M0	IIA	Somente envolvimento glandular endocervical
T2b	N0	M0	IIB	Invasão do estroma do colo uterino
T3	N0	M0	III	Disseminação neoplásica local e/ou locorregional
T3a	N0	M0	IIIA	Tumor envolve a serosa do corpo uterino e/ou anexos (extensão direta ou metástase) e/ou células neoplásicas no líquido ascítico ou peritoneal
T3b	N0	M0	IIIB	Comprometimento da vagina (extensão direta ou metástase)
T1,T2,T3	N1	M0	IIIC	Metástase a linfonodo pélvico e/ou para-aórtico
T4	Qualquer N	M0	IVA	Tumor invade a mucosa da bexiga ou intestino, comprovada por biópsia
Qualquer T	Qualquer N	M1	IVB	Disseminação neoplásica à distância, incluindo metástases intra-abdominais e linfonodos inguinais (excluindo metástases à serosa pélvica, vagina e anexos uterinos)

5 RESULTADOS

O estudo realizado foi um estudo de coorte retrospectivo, observacional, em que foram selecionadas 192 pacientes com diagnóstico de carcinoma endometrial no período de 1980 a 2006, totalizando 192 amostras representadas por Adenocarcinoma endometriode, 155 casos, Adenocarcinoma Seroso, 31 casos, Adenocarcinoma de células claras, 1 caso e 5 casos de pacientes com Carcinosarcoma (Tabela 3). Foram também avaliadas 146 amostras de 134 pacientes com diagnósticos categorizados em endométrio normal em fases secretora e proliferativa, endométrio atrófico, pólio endometrial, hiperplasia endometrial simples sem atipias, hiperplasia endometrial simples com atipias e hiperplasia endometrial complexa com atipias com distribuição indicada na Tabela 2. O detalhamento das categorias diagnósticas é observado nas Tabelas 1 a 5.

A idade média da idade das pacientes do estudo foi de 61,86 anos, dp 11,208 anos. A idade média das pacientes com carcinoma 60 anos, dp 10,414, das pacientes com endométrio proliferativo foi de 42,5, dp 7,47, endométrio secretor 48 anos, dp 3,68, endométrio atrófico 66, 22 anos, dp 12,082 e as pacientes com hiperplasias tiveram idade média de 53, 5 anos , dp 12, 486 anos.

Com relação a raça 252 (73,3%) pacientes eram brancas, 26 (8%) não brancas e em 48 pacientes (14,7%) não havia informação sobre a raça no prontuário.

Para as pacientes menopausadas a média do tempo de menopausa foi de 14,9 anos, dp 8,932 anos, calculado a partir do início do climatério até o diagnóstico de câncer ou até o início dos sintomas que levaram a um procedimento diagnóstico.

38 pacientes fizeram uso de tamoxifeno correspondendo a 11,7 %. Foram relacionadas as informações sobre o uso ou não de tamoxifeno antes do diagnóstico de carcinoma endometrial ou que motivaram a investigação diagnóstica. 38 pacientes fizeram uso de tamoxifeno, 15 por menos de 24 meses e 13 por mais de 24 meses (Tabelas 11 e 12). Na nossa casuística apenas 6 pacientes com diagnóstico de Adenocarcinoma endometriode fizeram uso prévio de tamoxifeno.

O sintoma mais freqüente nas pacientes com diagnóstico de carcinoma foi o sangramento transvaginal, seguido por alterações ultrasonográficas. Nas pacientes com hiperplasias endometriais o achado mais freqüente foi o espessamento endometrial, assim como nas pacientes com endométrio atrófico.

O tipo de cirurgia ou procedimento diagnóstico a que cada paciente foi submetida e a década de realização destes estão relacionadas nas Tabelas 13 e 14.

As pacientes submetidas a algum tipo de terapia neoadjuvante ou terapia prévia a cirurgia estão relacionadas a seus respectivos procedimentos na Tabela 15.

Demais características inerentes a dados histopatológicos são referidos nas Tabelas 6 a 10.

A avaliação da expressão das Claudinas foi realizada levando-se em consideração o padrão de expressão nas células e a intensidade de coloração na membrana plasmática. A análise quantitativa ou qualitativa da expressão citoplasmática não foi foco deste estudo. A intensidade de coloração foi tabulada em escores de 0 a 3 cruzes (0-intensidade leve, 1 + leve, 2+ moderada e 3+ intensa). Avaliou-se também a porcentagem de células positivas e categorizadas de 0 a 3 (0, nenhuma célula positiva, 1, 1-30%, 2, 31-60%, 3, >60%). A partir destas informações desenvolvemos um escore multiplicando as categorias de intensidade de coloração pela porcentagem de células positivas, obtendo as seguintes categorias:

- o Negativo/Positivo fraco: escores 0 a 1
- o Positivo moderado: escores 2, 3 e 4
- o Positivo forte: escores 6 a 9

Para a realização da análise estatística, as categorias foram agrupadas em:

- Negativo: compreende os escores 0 - 1
- Positivo: compreende os escores 2 - 9

As análises relacionadas a comparações entre os grupos e análises uni e multivariadas levaram em consideração a separação em escores e o agrupamento nas categorias negativo 0-1 e positivo 2-9, de forma semelhante ao que foi realizado no estudo de CHOI et al. (2009).

De forma geral, a análise do padrão de expressão das Claudinas mostrou positividade predominantemente em membranas citoplasmáticas e eventualmente citoplasmática. Não houve imunoexpressão das Claudinas nas células mesenquimais como as estromais endometriais, células do

estroma tumoral, seja de sustentação, no estroma neoplásico dos carcinossarcomas ou nas células miometriais infiltradas pelos diversos tipos de carcinomas. Além disso, áreas de metaplasia escamosa nos adenocarcinomas endometrioides foram negativas para todas as Claudinas. Levamos em consideração apenas a coloração de membranas para análise estatística.

A Claudina 2 foi positiva em todos os casos de câncer, endométrio normal e hiperplasia com padrão exclusivamente citoplasmático. Não houve imunexpressão nas membranas citoplasmáticas. A verificação dos controles das reações evidenciou que os mesmos estavam adequados, porém optamos por repetir as reações imuno-histoquímicas nos *tissue microarrays* e evidenciamos resultados idênticos.

As Claudinas 5 e 7 mostraram padrão de coloração predominantemente na borda luminal e transição intercelular no ápice das células. Já as Claudinas 1, 3 e 4 apresentam disposição em toda a face da membrana intercelular, ora com padrão contínuo e linear de coloração ora grumoso. Não foram observadas diferenças no padrão da disposição da coloração nas membranas das Claudinas entre as categorias diagnósticas.

Tabela 1 - Distribuição das amostras endometriais segundo as categorias diagnósticas.

<i>Diagnóstico</i>	<i>Número de amostras</i>	<i>Frequência (%)</i>
Pólipo endometrial	62	18,3
Hiperplasia simples sem atipia	34	10
Hiperplasia simples com atipia	2	0,6
Hiperplasia complexa com atipia	11	3,2
Adenocarcinoma endometrióide	155	45,7
Adenocarcinoma seroso	31	9,1
Adenocarcinoma células claras	1	0,3
Carcinossarcoma	5	1,5
Outros tumores epiteliais	1	0,3
Endométrio proliferativo	10	2,9
Endométrio secretor	12	3,5
Endométrio atrófico	15	4,4
Total	339	100

Tabela 2 - Distribuição das amostras endometriais segundo as categorias diagnósticas por agrupamento de lesões.

<i>Tipo de lesão</i>	<i>Número de amostras</i>	<i>Frequência (%)</i>
Endométrio atrófico	15	4,4
Normal- fase secretora	12	3,5
Normal- fase proliferativa	10	2,9
Hiperplasia sem atipias	34	10
Hiperplasia com atipias	13	3,8
Pólipo endometrial	62	18,3
Câncer	193	56,9
Total	339	100

Tabela 3 - Categorias diagnósticas dos carcinomas endometriais.

<i>Tipo de carcinoma</i>	<i>Número de casos</i>	<i>Frequência (%)</i>
Adenocarcinoma endometrióide	155	80,7
Adenocarcinoma seroso	31	16,1
Adenocarcinoma de células claras	1	0,5
Carcinossarcoma	5	2,6
Total	192	100

Tabela 4 - Hiperplasias endometriais, distribuição das amostras.

<i>Hiperplasias</i>	<i>Número de amostras</i>	<i>Frequência (%)</i>
Hiperplasia simples sem atipias	34	72,3
Hiperplasia simples com atipias	2	4,3
Hiperplasia complexa com atipias	11	23,4
Total	47	100

Tabela 5 - Endométrio normal e atrófico, distribuição das amostras.

<i>Endométrio-fases</i>	<i>Número de amostras</i>	<i>Frequência (%)</i>
Atrófico	15	40,5
Fase proliferativa	10	27
Fase secretora	12	32,4
Total	37	100

Tabela 6 - Grau histológico dos carcinomas endometriais, distribuição das amostras.

<i>Grau histológico</i>	<i>Número de amostras</i>	<i>Frequência (%)</i>
Grau 1	56	29
Grau 2	77	39,9
Grau 3	60	31,1
Total	193	100

Tabela 7 - Distribuição dos casos de carcinoma segundo a presença de infiltração miometrial.

<i>Infiltração miometrial</i>	<i>Número de casos</i>	<i>Frequência (%)</i>
sim	154	80,3
não	18	9,3
ignorado	20	10,4
Total	192	100

Tabela 8 - Distribuição dos casos de carcinoma segundo a profundidade de infiltração miometrial.

<i>Profundidade de invasão no miométrio</i>	<i>Número de casos</i>	<i>Frequência (%)</i>
Restrito ao endométrio	18	10,5
<50%	79	45,9
>50%	75	43,6
Total	167	100

Tabela 9 - Distribuição dos casos de carcinoma segundo a presença de invasão neoplásica linfovascular.

<i>Invasão linfovascular</i>	<i>Número de casos</i>	<i>Frequência (%)</i>
Sim	33	20,9
Não	125	79,1
Total	192	100

Tabela 10 - Distribuição dos casos de carcinoma segundo o estatus de comprometimento linfonodal por carcinoma.

<i>Comprometimento linfonodal</i>	<i>Número de casos</i>	<i>Frequência (%)</i>
Nenhum	104	86,7
Linfonodos pélvicos	14	11,7
Linfonodos aórticos	1	0,8
Linfonodos à distância	1	0,8
Total	120	100

Tabela 11 - Distribuição das pacientes segundo o uso de Tamoxifeno.

<i>Uso de tamoxifeno</i>	<i>Número de casos</i>	<i>Frequência (%)</i>
Não	271	87,7
Sim	38	12,3
Total	309	100

Tabela 12 - Distribuição das pacientes segundo o intervalo de tempo de uso de Tamoxifeno.

<i>Uso de tamoxifeno</i>	<i>Número de casos</i>	<i>Frequência (%)</i>
< 24 meses	15	45,5
24 meses ou mais	18	54,5
Total	33	100

Tabela 13 - Distribuição das pacientes segundo o tipo de procedimento cirúrgico realizado para diagnóstico ou tratamento.

<i>Tipo de cirurgia</i>	<i>Número de casos</i>	<i>Frequência (%)</i>
HTA	7	2,1
HTA+SOB	98	30,1
HTA+SOB+linfadenectomia	118	36,2
Exanteração	1	0,3
Sem cirurgia	1	0,3
Curetagem	17	5,2
Histeroscopia	77	23,6
Laparotomia exploradora	1	0,3
HTA+SOB+ bx peritoniais múltiplas	6	1,8
Total	326	100

Tabela 14 - Distribuição das pacientes segundo a década do tratamento.

<i>Década do tratamento</i>	<i>Número de casos</i>	<i>Frequência (%)</i>
1980-1989	31	11
1990-1999	131	46,3
2000 em diante	121	42,8
Total	283	100

Tabela 15 - Distribuição das pacientes segundo o tratamento adjuvante ou neoadjuvante.

<i>Tratamento adjuvante</i>	<i>Número de casos</i>	<i>Frequência (%)</i>
Nenhum	50	29,4
Radioterapia	71	41,8
Quimioterapia	5	2,9
Quimio+Tele+Braqui	2	1,2
Radioterapia prévia a cirurgia	4	2,4
Tele + Braqui	22	12,9
Radio exclusiva	6	3,5
Radio e quimio	3	1,8
Quimioterapia prévia	1	0,6
Braquiterapia	6	3,5
Total	170	100

- **Claudina 1**

Para avaliação da Claudina 1, das 339 amostras do estudo foram avaliadas 331 sendo que 8 não puderam ser avaliadas pela ausência do core representativo do tecido nos cortes sequenciais do bloco de *tissue microarray*.

Na Figura 4 observamos a distribuição das amostras de endométrio normal em fases secretora e proliferativa, endométrio atrófico, hiperplasias, pólipos endometriais e câncer segundo a categorização da expressão da Claudina 1 em positivo e negativo. Verifica-se que a maioria dos casos é negativa para Claudina 1. A grande parte dos casos positivos é representada pelos carcinomas. Há diferença estatisticamente significativa para a expressão de Claudina 1 (positivo versus negativo) entre as categorias diagnósticas (endométrio normal, hiperplásico, pólipos e carcinomas) com $p < 0,001$ (Tabela 16 e Figura 4).

A maioria dos casos de adenocarcinoma endometriode e carcinosarcomas foram negativos para Claudina 1 ao contrário dos adenocarcinomas serosos, sendo que esta diferença de expressão entre os grupos é estatisticamente significativa ($p = 0,02$), ver Tabela 17 e Figura 5.

Com relação ao estadiamento, não houve diferença estatisticamente significativa entre os estadios I, II, III e IV e o padrão de expressão de Claudina 1 ($p = 0,098$), ver Tabela 17.

A Claudina 1 foi expressa diferencialmente entre os diferentes graus histológicos (1, 2, 3) e esta diferença foi estatisticamente significativa ($p = 0,017$), ver Tabela 17.

A presença ou ausência de infiltração neoplásica miometrial não se correlacionou de forma significativa com a imunoexpressão de CL1 ($p=0,396$) nem com a profundidade de invasão da parede miometrial menor ou maior que a metade da espessura parietal ($p=0,98$), ver Tabela 17.

A positividade da Claudina 1 correlacionou-se de forma estatisticamente significativa com a presença de metástases linfonodais ($p=0,032$) e invasão neoplásica linfovascular ($p=0,004$), ver Tabela 17.

Não houve diferença entre os grupos positivos ou negativos para Claudina 1 quando levamos em consideração o uso de tamoxifeno ($p=0.669$), ver Tabela 17.

Tabela 16 - Distribuição das amostras de endométrio normal, hiperplásico e neoplásico segundo a positividade para Claudina 1.

	Amostras		CL1
	n	n*	%*
Histologia			
Atrófico	15	0	0
Secretor	12	1	8,3
Proliferativo	10	0	0
HESA	34	0	0
HEA	13	0	0
Pólipo	61	0	0
Câncer	193	57	30,6
p<0,001			

n: número total de amostras, n*: número de amostras positivas, %*: porcentagem de amostras positivas

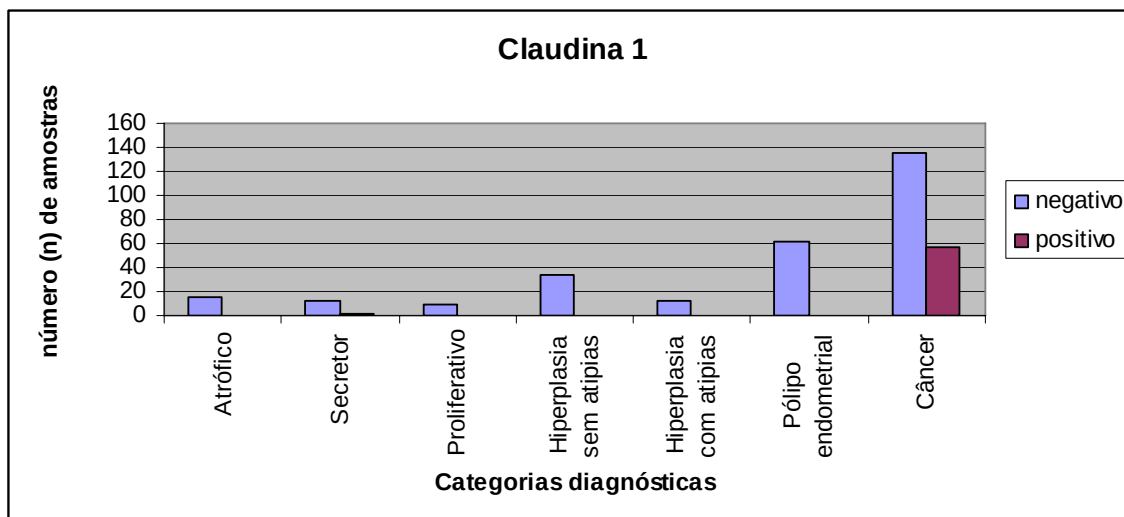


Figura 4 - Claudina 1. Distribuição das categorias diagnósticas de acordo com a expressão da Claudina 1 (positivo ou negativo). Abscissa indica as categorias diagnósticas e ordenada número de amostras.

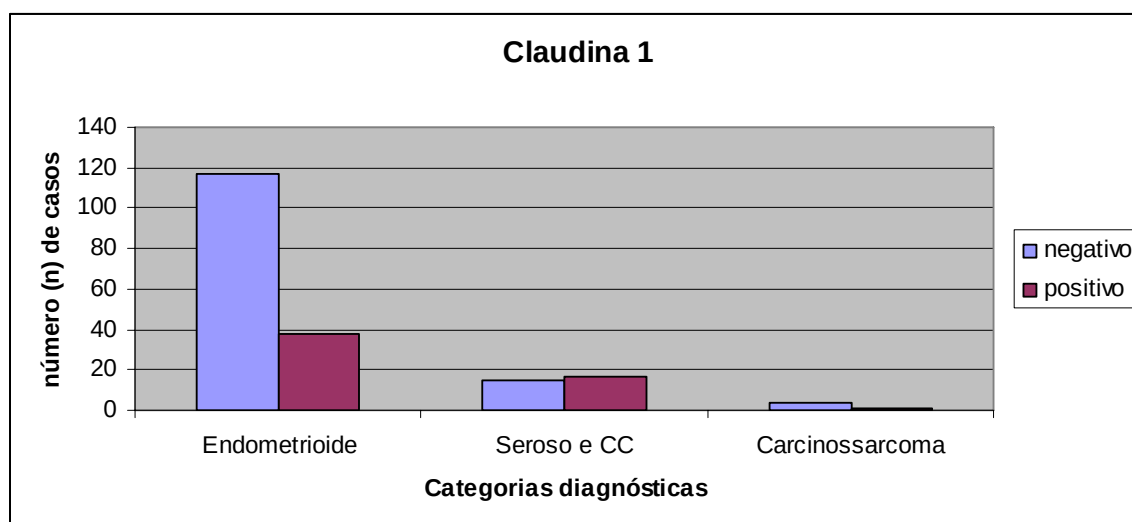


Figura 5 - Claudina 1. Distribuição das amostras dos carcinomas endometriais de acordo com a com a expressão da Claudina 1 (positivo ou negativo). Abscissa indica intensidade de coloração e ordenada número de amostras

Tabela 17 - Distribuição das amostras de carcinoma endometrial segundo a positividade para Claudina 1 e sua correlação com características histopatológicas e clínicas.

	Pacientes		Cl1	
	n	%	n*	%*
Histologia				
Endometrioide	155	80,7	38	25,2
Seroso e CC	32	16,7	17	56,7
Carcinossarcoma	5	2,6	1	25
			p=0,02	
Est FIGO				
I	118		30	25,4
II	9		3	33,3
III	35		16	45,7
IV	6		3	50
			p=0,098	
GRAU				
1	56		14	25,5
2	76		17	22,7
3	57		25	45,5
			p=0,017	
IM				
Não	18		4	22,2
Sim	153		48	32
			p=0,396	
<50%	94		26	27,7
>50%	74		26	35,1
			p=0,98	
IV				
Sim	32		16	51,6
Não	125		31	25,2
			p=0,04	
Linfonodo meta				
Sim	15		8	53,3
Não	100		25	24,8
			p=0,032	
Tamoxifeno				
Sim	6		1	16,7
Não	171		53	31
			p=0,669	

n: número total de amostras, n*: número de amostras positivas, %*: porcentagem de amostras positivas

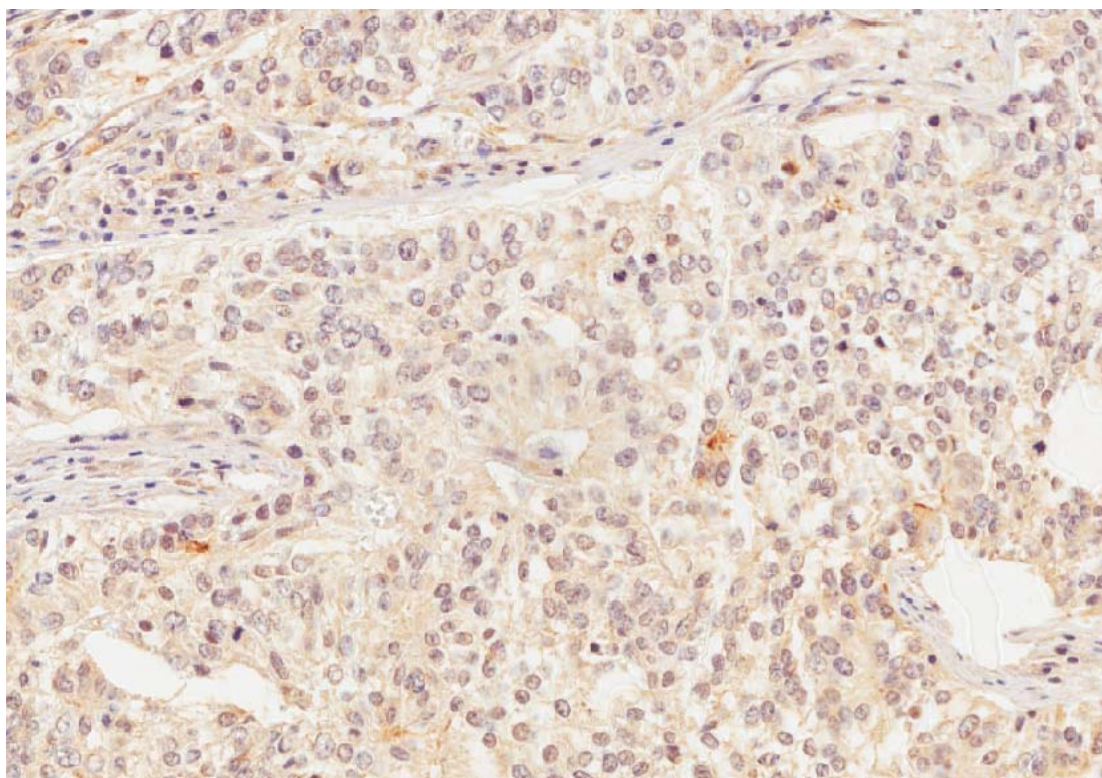


Figura 6 - Claudina 1, imunoexpressão negativa. Aumento de 200x.

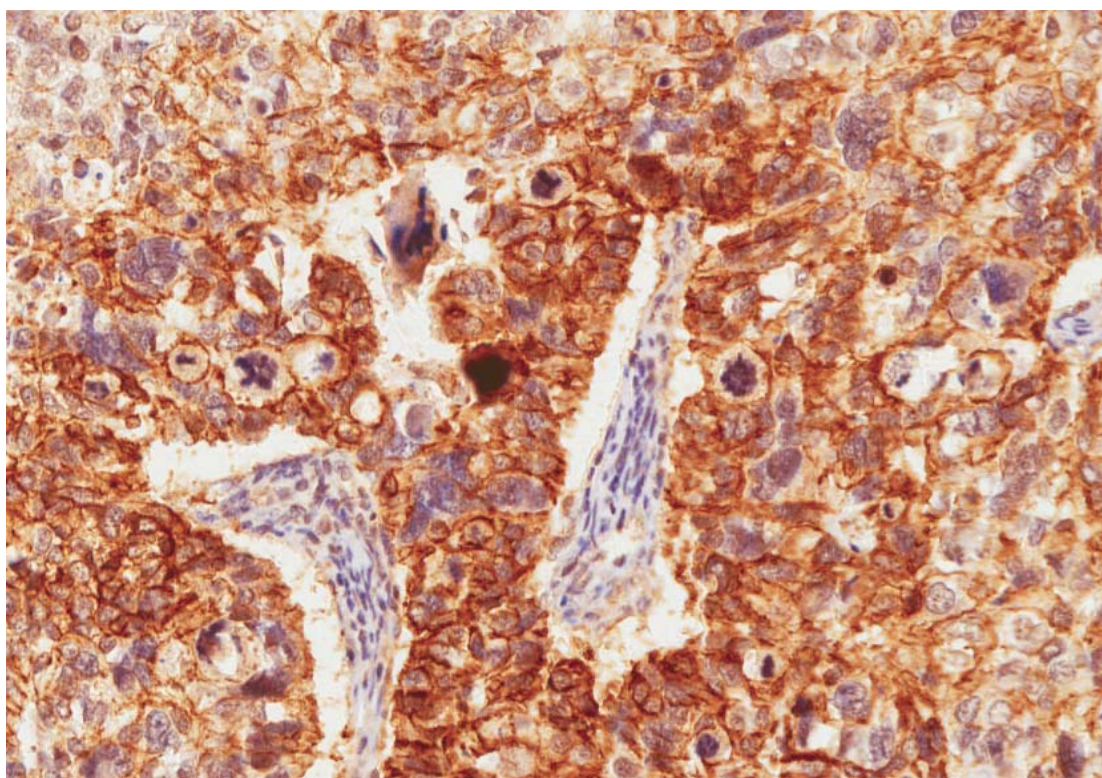


Figura 7 - Claudina 1, imunoexpressão positiva. Aumento de 200x.

- **Claudina 2**

A Claudina 2 foi negativa em todos os casos considerando a coloração de membrana e desta forma não foi avaliada segund os objetivos do estudo.

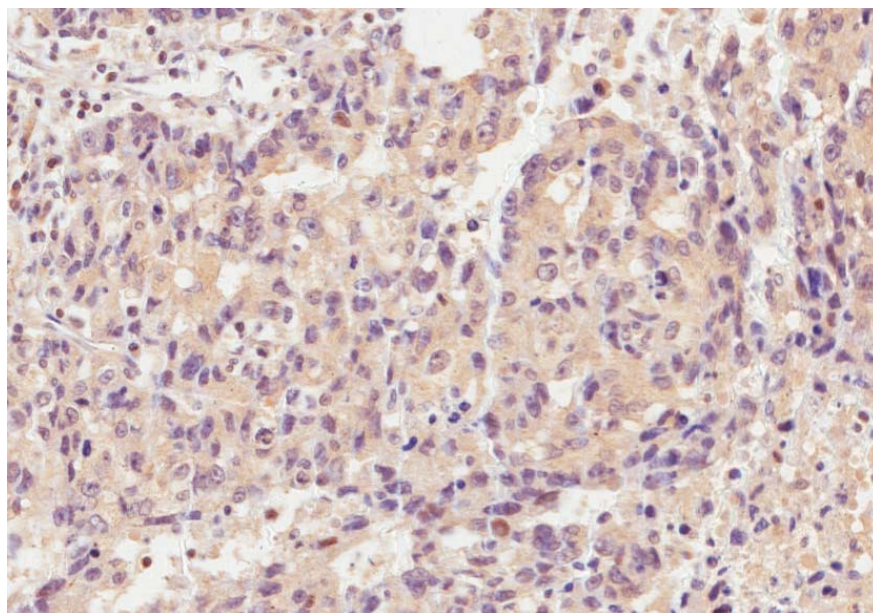


Figura 8 - Claudina 2, imunoexpressão negativa. Aumento de 200x.

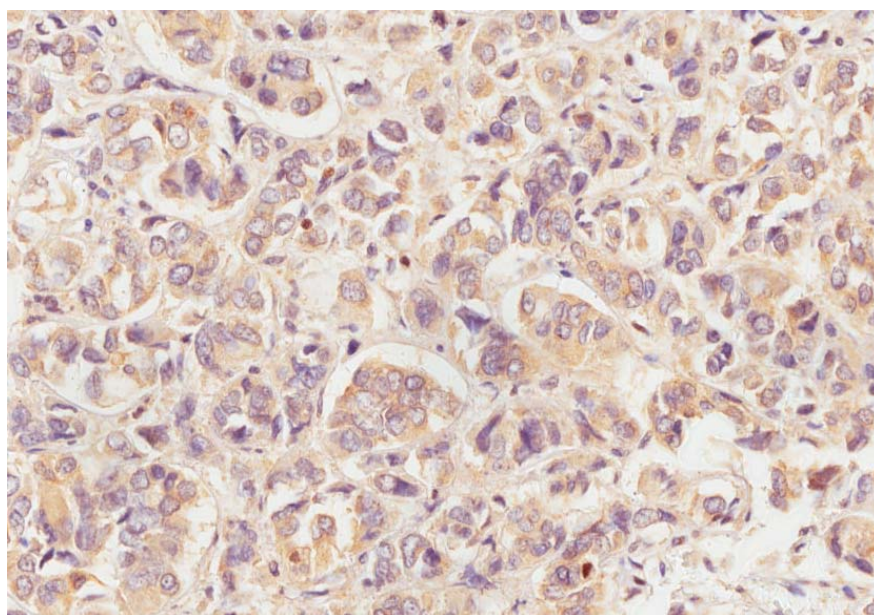


Figura 9- Claudina 2, imunoexpressão negativa. Aumento de 200x.

- **Claudina 3**

Para avaliação da Claudina 3, das 339 amostras foram avaliadas 321 e 18 não puderam ser avaliadas pela ausência do core representativo do tecido nos cortes sequenciais do bloco de *tissue microarray*.

Na Figura 10 observamos a distribuição das amostras de endométrio normal em fases secretora e proliferativa, endométrio atrófico, hiperplasias, pólipos endometriais e câncer segundo a categorização da expressão da Claudina 3 em positivo e negativo. Verifica-se que a maioria dos casos é positiva para Claudina 3, sendo representados principalmente pelas amostras de endométrio normal e carcinomas, sendo que a menor frequência de casos positivos está presente nas hiperplasias e pólipos endometriais. Há diferença estatisticamente significativa para a expressão de Claudina 3 (positivo versus negativo) entre as categorias diagnósticas (endométrio normal, hiperplásico, pólipos e carcinomas) com $p < 0,001$ (Tabela 18 e Figura 10).

A maioria dos casos de adenocarcinoma endometriode, adenocarcinomas serosos e carcinosarcomas foram positivos para Claudina 3 com intensidades moderada a intensa e não houve diferença entre estas categorias diagnósticas ($p = 0,908$), ver Tabela 19.

Com relação ao estadiamento, não houve diferença estatisticamente significativa entre os estadios I, II, III e IV e o padrão de expressão de Claudina 3 ($p = 0,775$), ver Tabela 19.

Não houve diferença de expressão de Claudina 3 entre os diferentes graus histológicos (1,2,3) ($p = 0,542$), ver Tabela 19.

A presença de infiltração neoplásica miometrial correlacionou-se de forma significativa com a imunoexpressão de CL3 ($p=0,007$), mas não com a profundidade de invasão da parede miometrial menor ou maior que a metade da espessura parietal ($p=0,451$), ver Tabela 19.

A positividade da Claudina 3 não se correlacionou de forma estatisticamente significativa com a presença de metástases linfonodais ($p=0,257$) e invasão neoplásica linfovascular ($p=0,475$), ver Tabela 19

Não houve diferença entre os grupos positivos ou negativos para Claudina 3 quando levamos em consideração o uso de tamoxifeno ($p=0,274$), ver Tabela 19.

Tabela 18 - Distribuição das amostras de endométrio normal, hiperplásico e neoplásico segundo a positividade para Claudina 3

	Pacientes	CL3	
	<i>n</i>	<i>n*</i>	<i>%*</i>
<i>Histologia</i>			
Atrófico	15	11	73,3
Secretor	12	12	100
Proliferativo	10	8	100
HESA	34	26	76,5
HEA	13	7	58,3
Pólipo	61	38	61,3
Câncer	193	184	95,3
		$p<0,001$	

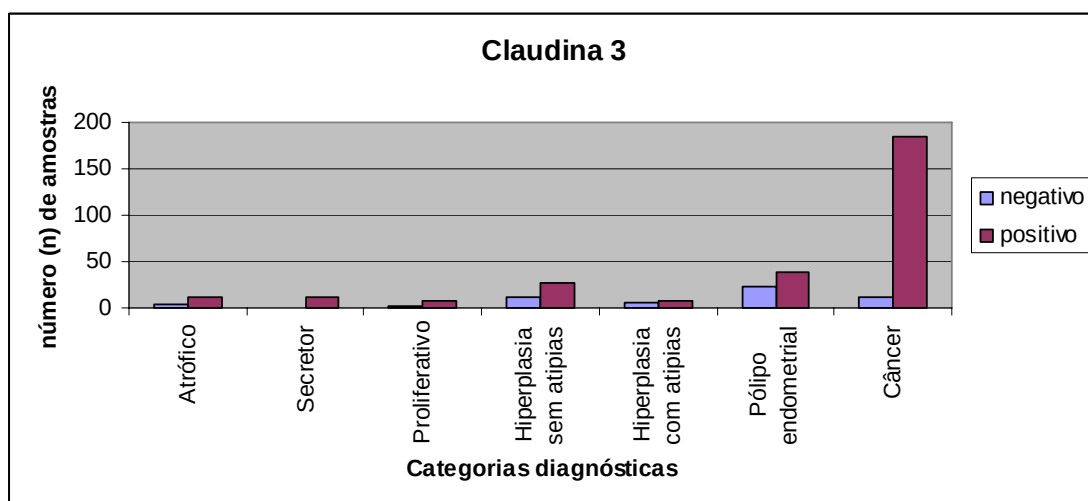


Figura 10 - Claudina 3. Distribuição das categorias diagnósticas de acordo com a expressão da Claudina 3 (positivo ou negativo). Abscissa indica as categorias diagnósticas e ordenada número de amostras

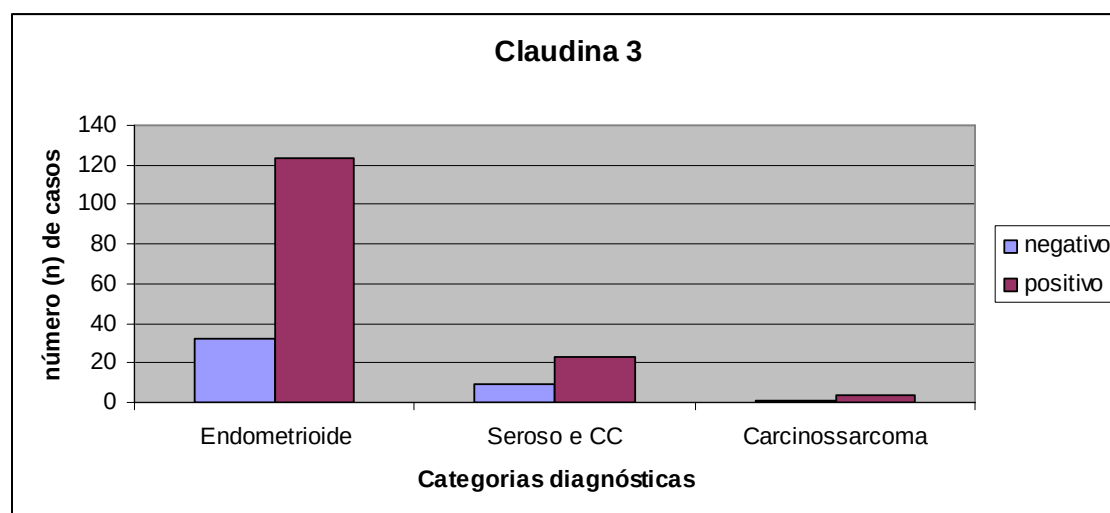


Figura 11 - Claudina 3. Distribuição das amostras dos carcinomas endometriais de acordo com a intensidade de coloração da membrana. Abscissa indica intensidade de coloração e ordenada número de amostras

Tabela 19 - Distribuição das amostras de carcinoma endometrial segundo a positividade para Claudina 3 e sua correlação com características histopatológicas e clínicas

	Pacientes		CI3	
	n	%	n*	%*
Histologia				
Endometrioide	155	80,7	123	82
Seroso e CC	32	16,7	23	79,3
Carcinossarcoma	5	2,6	4	100
			p=0,908	
Est FIGO				
I	118		93	80,9
II	9		8	88,9
III	35		31	88,6
IV	6		5	83,3
			p=0,775	
GRAU				
1	56		42	77,8
2	76		64	85,3
3	57		44	81,5
			p=0,542	
IM				
Não	18		10	58,8
Sim	153		126	85,1
			p=0,007	
<50%	94		74	80,4
>50%	74		62	84,9
			p=0,451	
IV				
Sim	32		27	87,1
Não	125		98	81,7
			p=0,475	
Linfonodo meta				
Sim	15		11	73,3
Não	100		85	85
			p=0,257	
Tamoxifeno				
Sim	6		4	66,7
Não	171		141	83,4
			p=0,274	

n: número total de amostras, n*: número de amostras positivas, %*: porcentagem de amostras positivas

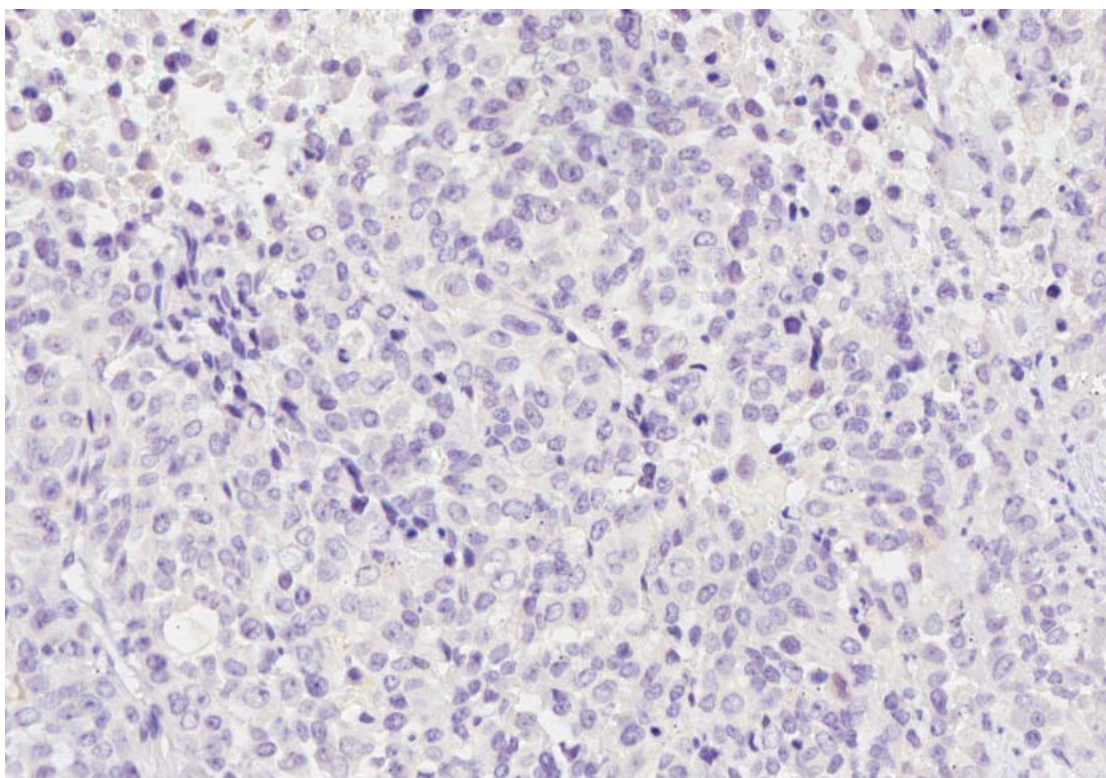


Figura 12 - Claudina 3, imunoexpressão negativa. Aumento de 200x.

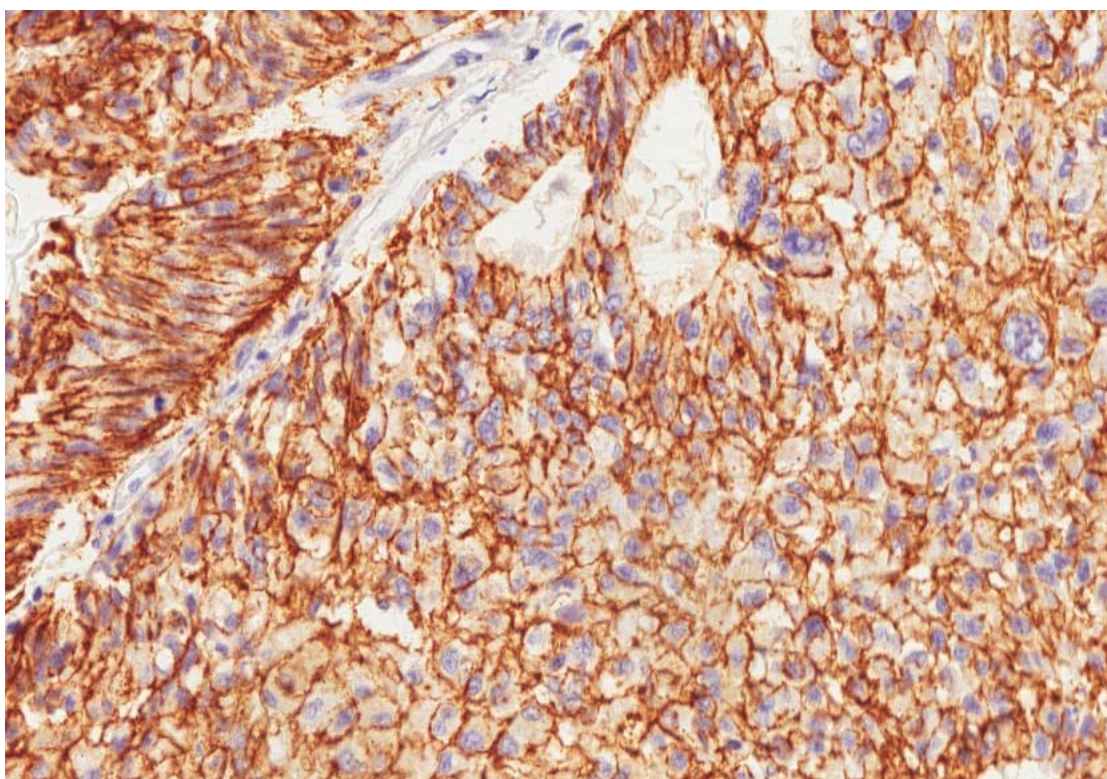


Figura 13 - Claudina 3, imunoexpressão positiva. Aumento de 200x.

- **Claudina 4**

Para avaliação da Claudina 4, das 339 amostras foram avaliadas 323 e 16 não puderam ser avaliadas pela ausência do core representativo do tecido nos cortes seqüenciais do bloco de *tissue microarray*.

Na Figura 14 observamos a distribuição das amostras de endométrio normal em fases secretora e proliferativa, endométrio atrófico, hiperplasias, pólipos endometriais e câncer segundo a categorização da expressão da Claudina 4 em positivo e negativo. Verifica-se que a maioria dos casos é positiva para Claudina 4, sendo representados principalmente pelas amostras de endométrio normal, hiperplasias sem atipias e carcinomas sendo que a menor frequência de casos positivos está presente nas hiperplasias atípicas e pólipos endometriais. Há diferença estatisticamente significativa para a expressão de Claudina 4 (positivo versus negativo) entre as categorias diagnósticas (endométrio normal, hiperplásico, pólipos e carcinomas) com $p=0,01$ (Figura 14 e Tabela 20).

A maioria dos casos de adenocarcinoma endometriode, adenocarcinomas serosos e carcinosarcomas foram positivos para Claudina 4 e não houve diferença entre os grupos ($p=0,46$), ver Tabela 21.

Com relação ao estadiamento, não houve diferença estatisticamente significativa entre os estádios I, II, III e IV e o padrão de expressão de Claudina 4 ($p=0,194$), ver Tabela 21.

A Claudina 4 não foi expressa diferencialmente entre os diferentes graus histológicos (1,2,3) ($p=0,609$), ver Tabela 21.

A presença ou ausência de infiltração neoplásica miometrial não se correlacionou de forma significativa com a imunoexpressão de CL4 ($p=0,236$) nem com a profundidade de invasão da parede miometrial menor ou maior que a metade da espessura parietal ($p=0,763$), ver Tabela 21.

A positividade da Claudina 4 não se correlacionou com a presença de metástases linfonodais ($p=1,000$) e invasão neoplásica linfovascular ($p=0,477$), ver Tabela 21.

Não houve diferença entre os grupos positivos ou negativos para Claudina 4 quando levamos em consideração o uso de tamoxifeno ($p=0.96$), ver Tabela 21.

Tabela 20 - Distribuição das amostras de endométrio normal, hiperplásico e neoplásico segundo a positividade para Claudina 4

	<i>Pacientes</i>	<i>CL4</i>	
	<i>n</i>	<i>n*</i>	<i>%*</i>
Histologia			
Atrófico	15	9	90
Secretor	12	12	100
Proliferativo	10	8	80
HESA	34	25	73,5
HEA	13	5	38,5
Pólipo	61	28	45,2
Câncer	193	127	68,3

$p=0,01$

n: número total de amostras, n*: número de amostras positivas, %*: porcentagem de amostras positivas

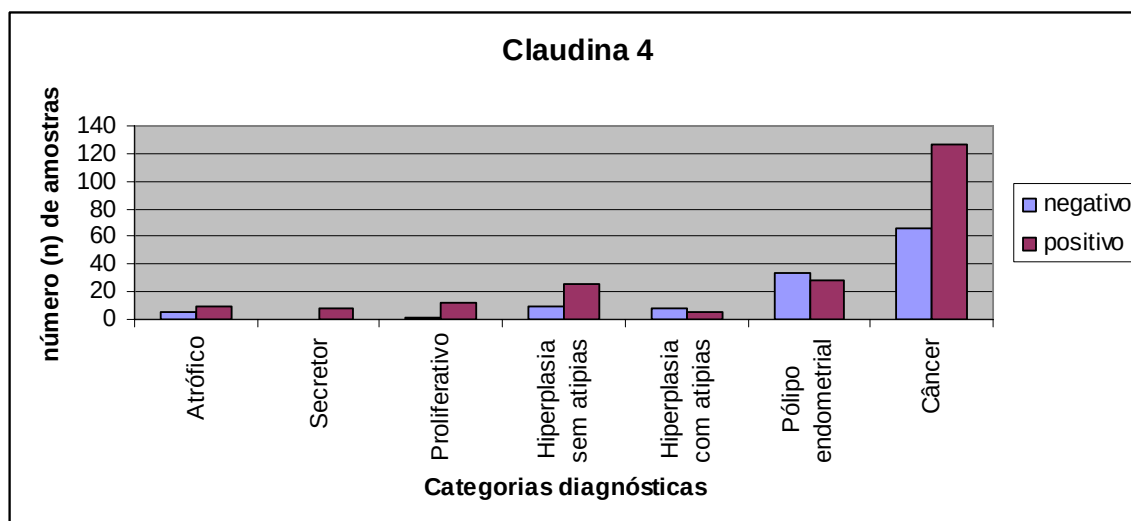


Figura 14 - Claudina 4. Distribuição das categorias diagnósticas de acordo com a expressão da Claudina 4 (positivo ou negativo). Abscissa indica as categorias diagnósticas e ordenada número de amostras.

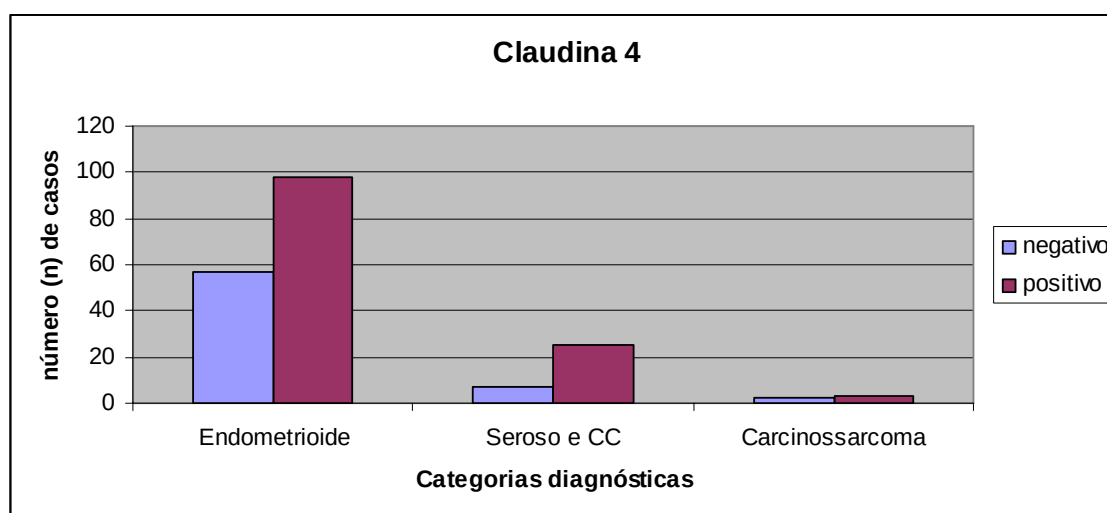


Figura 15 - Claudina 4. Distribuição das amostras dos carcinomas endometriais de acordo com a intensidade de coloração da membrana. Abscissa indica intensidade de coloração e ordenada número de amostras.

Tabela 21 - Distribuição das amostras de carcinoma endometrial segundo a positividade para Claudina 4 e sua correlação com características histopatológicas e clínicas

	<i>Pacientes</i>		<i>CI4</i>	
	<i>n</i>	<i>%</i>	<i>n*</i>	<i>%*</i>
<i>Histologia</i>				
Endometriode	155	80,7	98	63,2
Seroso e CC	32	16,7	25	86,2
Carcinossarcoma	5	2,6	3	75
			<i>p</i> =0,46	
<i>Est FIGO</i>				
I	118		77	65,3
II	9		4	44,4
III	35		27	71,1
IV	6		3	50
			<i>p</i> =0,194	
<i>GRAU</i>				
1	56		35	63,5
2	76		51	68
3	57		40	72,7
			<i>p</i> =0,609	
<i>IM</i>				
Não	18		9	52,9
Sim	153		101	67,3
			<i>p</i> =0,236	
<50%	94		61	64,9
>50%	74		49	67,1
			<i>p</i> =0,763	
<i>IV</i>				
Sim	32		19	61,3
Não	125		83	68
			<i>p</i> =0,447	
<i>Linfonodo</i>				
Sim	15		10	66,7
Não	100		68	67,3
			<i>p</i> =1,0	
<i>Tamoxifeno</i>				
Sim	6		2	33,3
Não	171		116	67,8
			<i>p</i> =0,96	

n: número total de amostras, n*: número de amostras positivas, %*: porcentagem de amostras positivas

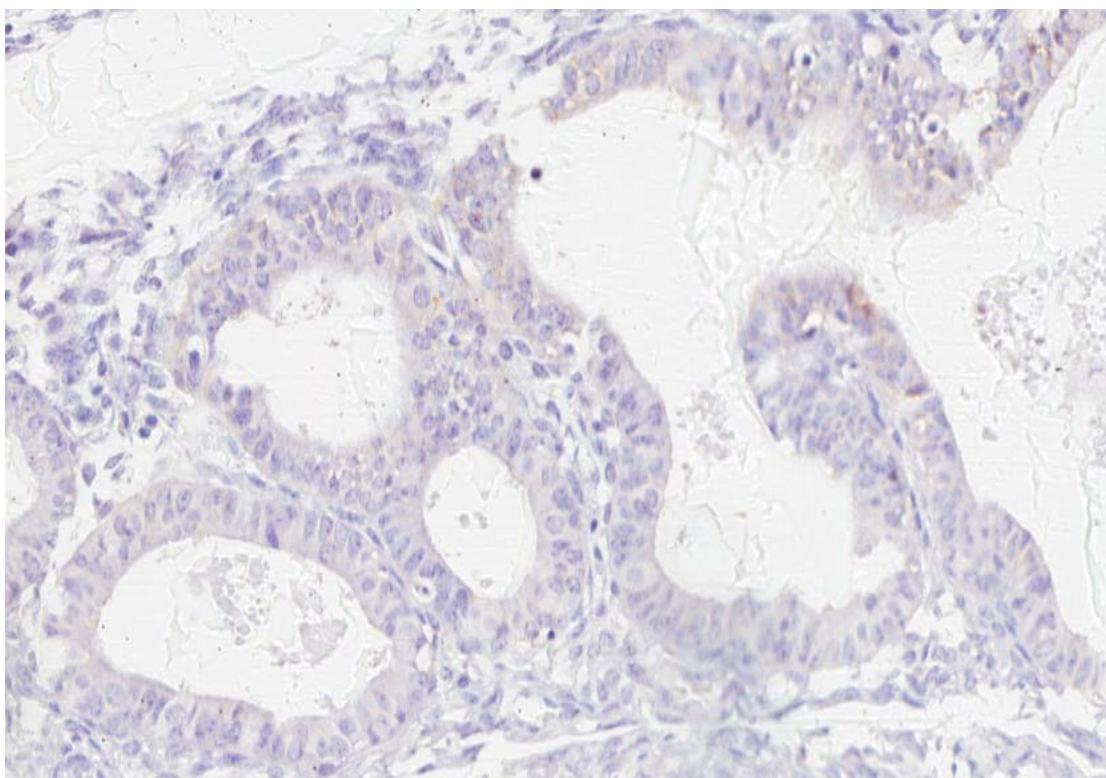


Figura 16 - Claudina 4, imunoexpressão negativa. Aumento de 200x.

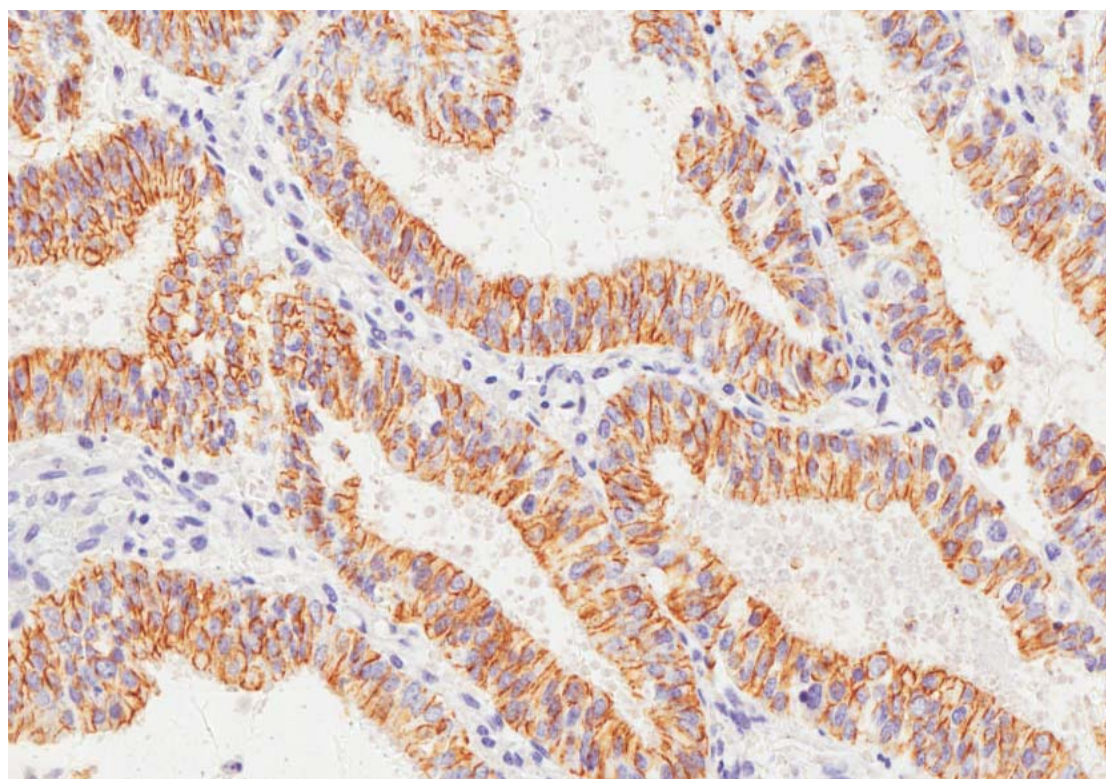


Figura 17 - Claudina 4, imunoexpressão positiva. Aumento de 200x.

- **Claudina 5**

Para avaliação da Claudina 5, das 339 amostras foram avaliadas 333 e 6 não puderam ser avaliadas pela ausência do core representativo do tecido nos cortes seqüenciais do bloco de *tissue microarray*.

Na Figura 18 observamos a distribuição das amostras de endométrio normal em fases secretora e proliferativa, endométrio atrófico, hiperplasias, pólipos endometriais e câncer segundo a categorização da expressão da Claudina 5 em positivo e negativo. Verifica-se que a maioria dos casos é negativa para Claudina 5. Os positivos são representados pelos carcinomas e endométrio secretor. Não há diferença estatisticamente significativa para a expressão de Claudina 5 (positivo versus negativo) entre as categorias diagnósticas (endométrio normal, hiperplásico, pólipos e carcinomas) com $p=0,197$ (Tabela 22 e Figura 18).

A maioria dos casos de adenocarcinoma endometriode e carcinosarcomas foram positivos para Claudina 5 ao contrario dos adenocarcinomas serosos. No entanto não houve diferença de expressão estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,908$), ver Tabela 23 e Figura 19.

Com relação ao estadiamento, não houve diferença estatisticamente significativa entre os estadios I, II, III e IV e o padrão de expressão de Claudina 5 ($p=0,106$), ver Tabela 23.

A Claudina 5 foi expressa diferencialmente entre os diferentes graus histológicos (1,2,3) e esta diferença foi estatisticamente significativa ($p=0,015$), ver Tabela 23.

A presença ou ausência de infiltração neoplásica miometrial não se correlacionou de forma significativa com a imunoexpressão de CL5 ($p=0,61$) nem com a profundidade de invasão da parede miometrial menor ou maior que a metade da espessura parietal ($p=0,590$), ver Tabela 23.

A positividade da Claudina 5 não se correlacionou de forma estatisticamente significativa com a presença de metástases linfonodais ($p=0,89$) e invasão neoplásica linfovascular ($p=0,215$). Não houve diferença entre os grupos positivos ou negativos para Claudina 5 quando levamos em consideração o uso de tamoxifeno ($p=0,257$), ver Tabela 23.

Tabela 22 - Distribuição das amostras de endométrio normal, hiperplásico e neoplásico segundo a positividade para Claudina 5

	<i>Pacientes</i>	<i>CL5</i>	
	<i>n</i>	<i>n*</i>	<i>%*</i>
<i>Histologia</i>			
Atrófico	15	8	57,1
Secretor	12	5	41,7
Proliferativo	10	3	33,3
HESA	34	8	23,5
HEA	13	8	23,5
Pólipo	61	4	30,8
Câncer	193	75	39,7
$p=0,197$			

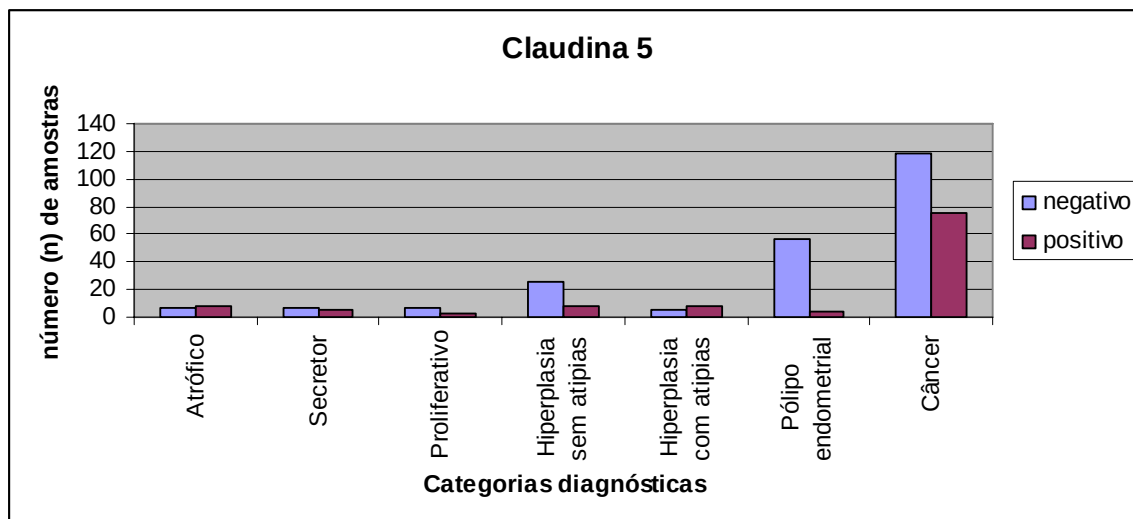


Figura 18 - Claudina 5. Distribuição das categorias diagnósticas de acordo com a expressão da Claudina 5 (positivo ou negativo). Abscissa indica as categorias diagnósticas e ordenada número de amostras

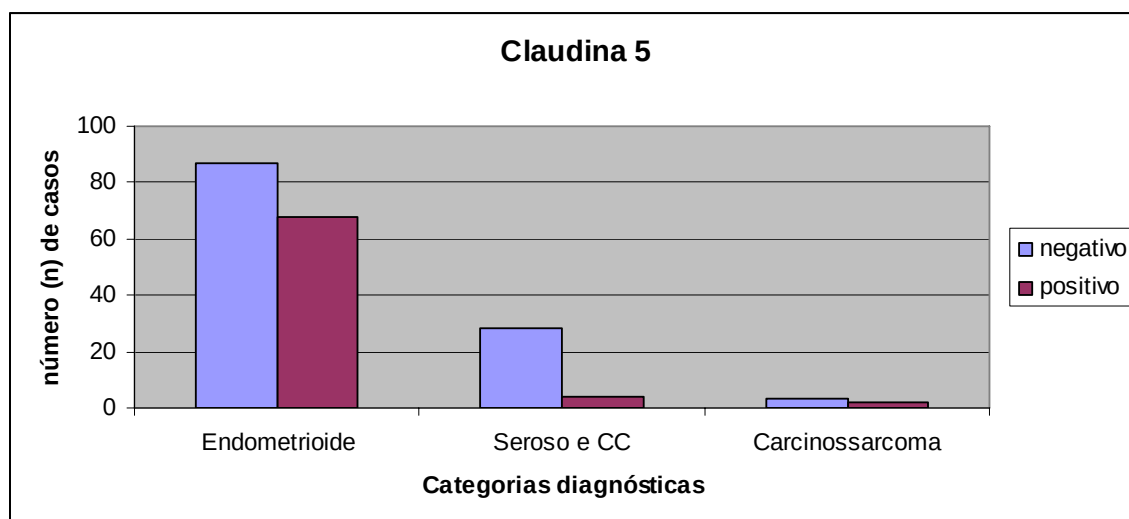


Figura 19 - Claudina 5. Distribuição das amostras dos carcinomas endometriais de acordo com a intensidade de coloração da membrana. Abscissa indica intensidade de coloração e ordenada número de amostras

Tabela 23 - Distribuição das amostras de carcinoma endometrial segundo a positividade para Claudina 5 e sua correlação com características histopatológicas e clínicas

	<i>Pacientes</i>		<i>CI5</i>	
	<i>n</i>	%	<i>n*</i>	%*
Histologia				
Endometrioide	155	80,7	68	43,9
Seroso e CC	32	16,7	4	12,5
Carcinossarcoma	5	2,6	2	50
			<i>p</i> =0,908	
Est FIGO				
I	118		57	47,9
II	9		3	33,3
III	35		10	28,6
IV	6		1	16,7
			<i>p</i> =0,106	
GRAU				
1	56		24	42,9
2	76		37	48,1
3	57		13	23,6
			<i>p</i>=0,015	
IM				
Não	18		4	22,2
Sim	153		68	45,3
			<i>p</i> =0,61	
<50%	94		39	41,1
>50%	74		33	45,2
			<i>p</i> =0,590	
IV				
Sim	32		9	30
Não	125		55	44,4
			<i>p</i> =0,215	
Linfonodo meta				
Sim	15		3	23,1
Não	100		49	48
			<i>p</i> =0,89	
Tamoxifeno				
Sim	6		2	33,3
Não	171		71	40,8
			<i>p</i> =0,257	

n: número total de amostras, n*: número de amostras positivas, %*: porcentagem de amostras positivas

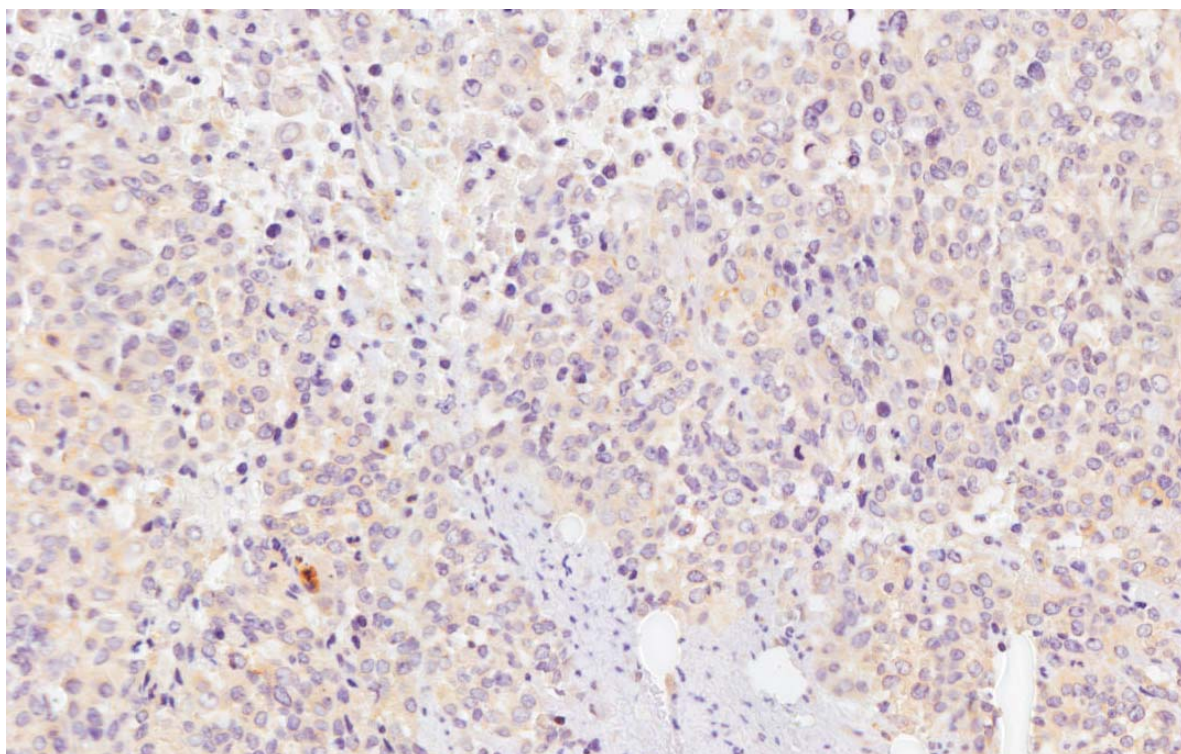


Figura 20 - Claudina 5, imunoexpressão negativa. Aumento de 200x.

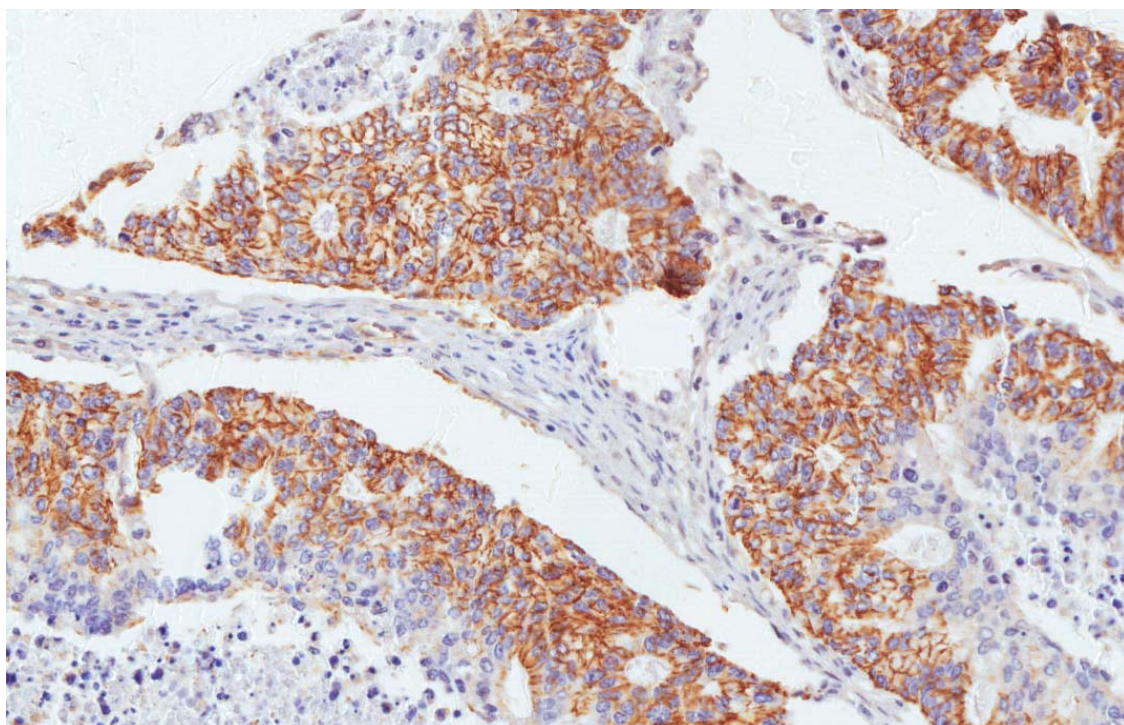


Figura 21 - Claudina 5, imunoexpressão positiva. Aumento de 200x.

- **Claudina 7**

Para avaliação da Claudina 7, das 339 amostras foram avaliadas 333 e 6 não puderam ser avaliadas pela ausência do core representativo do tecido nos cortes seqüenciais do bloco de *tissue microarray*.

Na Figura 22 observamos a distribuição das amostras de endométrio normal em fases secretora e proliferativa, endométrio atrófico, hiperplasias, pólipos endometriais e câncer segundo a categorização da expressão da Claudina 7 em positivo e negativo. Verifica-se que a maioria dos casos é negativa para Claudina 7. Os positivos são representados pelas hiperplasias atípicas e endométrio secretor. Não há diferença estatisticamente significativa para a expressão de Claudina 7 (positivo versus negativo) entre as categorias diagnósticas (endométrio normal, hiperplásico, pólipos e carcinomas) com $p=0,940$ (Tabela 24 e Figura 22).

A maioria dos casos de adenocarcinoma endometriode, adenocarcinoma seroso e carcinosarcomas foram negativos para Claudina 7 e não houve diferença de expressão entre os grupos ($p=0,908$) (Tabela 25 e Figura 23).

Com relação ao estadiamento, não houve diferença estatisticamente significativa entre os estadios I, II, III e IV e o padrão de expressão de Claudina 7 ($p=0,410$), ver Tabela 25.

A Claudina 7 foi expressa diferencialmente entre os diferentes graus histológicos (1, 2, 3) e esta diferença foi estatisticamente significativa ($p=0,009$), ver Tabela 25.

A presença ou ausência de infiltração neoplásica miometrial não se correlacionou de forma significativa com a imunoexpressão de CL7 ($p=0,474$) nem com a profundidade de invasão da parede miometrial menor ou maior que a metade da espessura parietal ($p=0,822$), ver Tabela 25.

Não foi observada diferença entre os grupos positivos ou negativos quanto a presença de metástases linfonodais ($p=0,219$) e invasão neoplásica linfovascular ($p=0,126$), ver Tabela 25.

Não houve diferença entre os grupos positivos ou negativos para Claudina 7 quando levamos em consideração o uso de tamoxifeno ($p=0,546$), ver Tabela 25.

Tabela 24 - Distribuição das amostras de endométrio normal, hiperplásico e neoplásico segundo a positividade para Claudina 7.

	Pacientes		CL7
	<i>n</i>	<i>n</i>*	%*
<i>Histologia</i>			
Atrófico	15	1	7,1
Secretor	12	2	16,7
Proliferativo	10	0	0
HESA	34	2	6,1
HEA	13	3	25
Pólipo	61	1	1,6
Câncer	193	22	11,6

$p=0,940$

n: número total de amostras, n*: número de amostras positivas, %*: porcentagem de amostras positivas

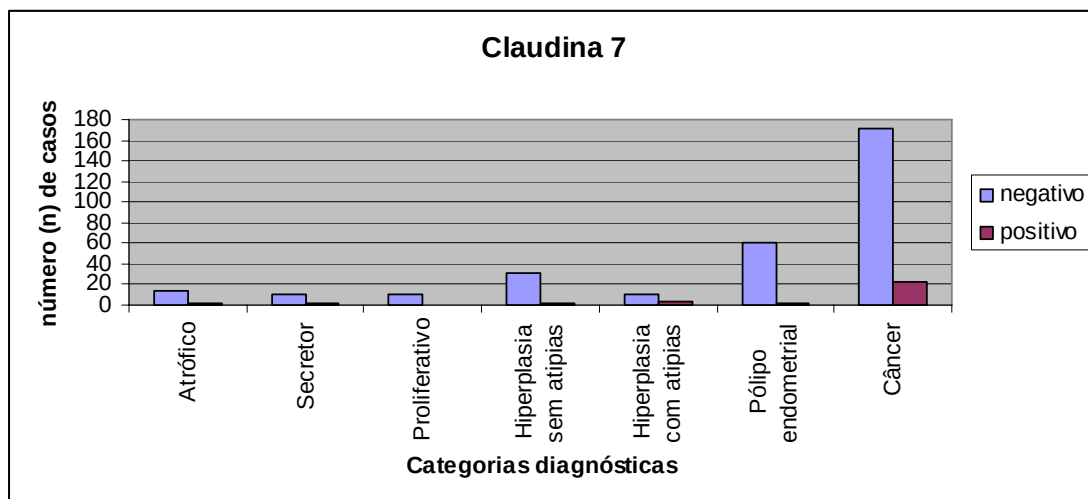


Figura 22 - Claudina 7. Distribuição das categorias diagnósticas de acordo com a expressão da Claudina 7 (positivo ou negativo). Abscissa indica as categorias diagnósticas e ordenada número de amostras

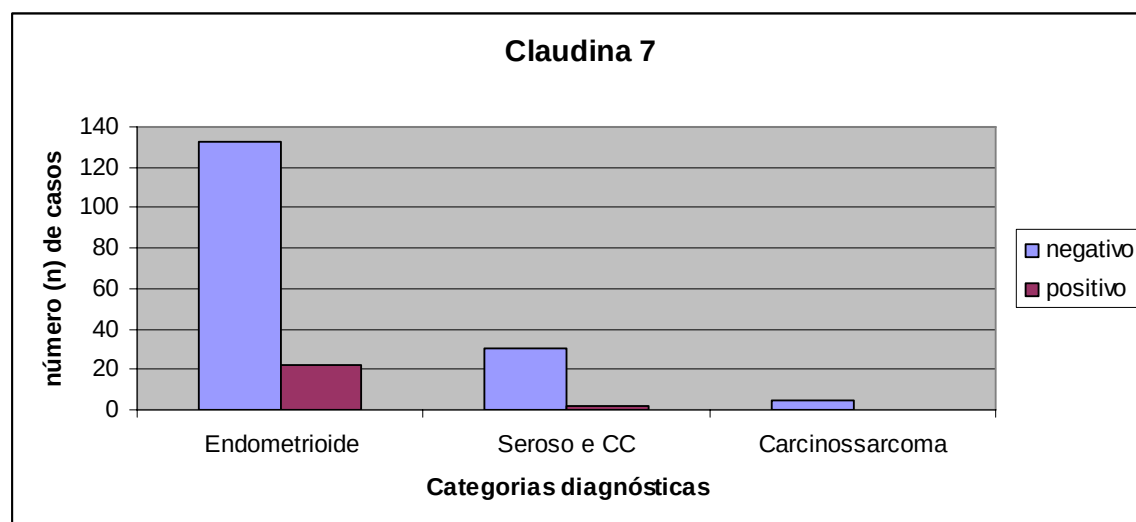


Figura 23 - Claudina 7. Distribuição das amostras dos carcinomas endometriais de acordo com a intensidade de coloração da membrana. Abscissa indica intensidade de coloração e ordenada número de amostras.

Tabela 25 - Distribuição das amostras de carcinoma endometrial segundo a positividade para Claudina 7 e sua correlação com características histopatológicas e clínicas

	Pacientes		Cl7	
	n	%	n*	%*
Histologia				
Endometrioide	155	80,7	22	33,8
Seroso e CC	32	16,7	2	14,2
Carcinossarcoma	5	2,6	0	0
			p=0,908	
Est FIGO				
I	118		19	16
II	9		0	0
III	35		3	8,3
IV	6		22	12,9
			p=0,410	
GRAU				
1	56		9	16,1
2	76		12	15,8
3	57		1	1,8
			p=0,009	
IM				
Não	18		1	5,6
Sim	153		21	13,8
			p=0,474	
<50%	94		13	13,5
>50%	74		9	12,2
			p=0,822	
IV				
Sim	32		1	3,1
Não	125		18	14,5
			p=0,126	
Linfonodo meta				
Sim	15		0	0
Não	100		16	15,7
			p=0,219	
Tamoxifeno				
Sim	6		1	16,7
Não	171		21	12
			p=0,546	

n: número total de amostras, n*: número de amostras positivas, %*: porcentagem de amostras positivas

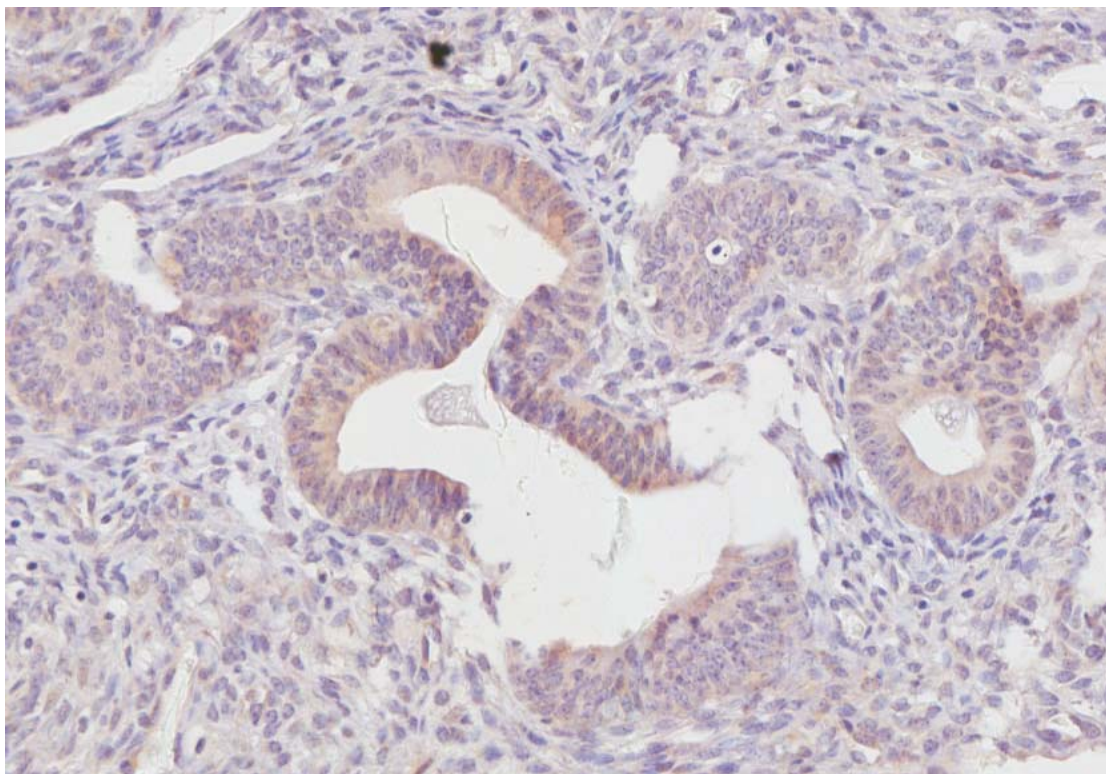


Figura 24 - Claudina 7, imunoexpressão negativa. Aumento de 200x.

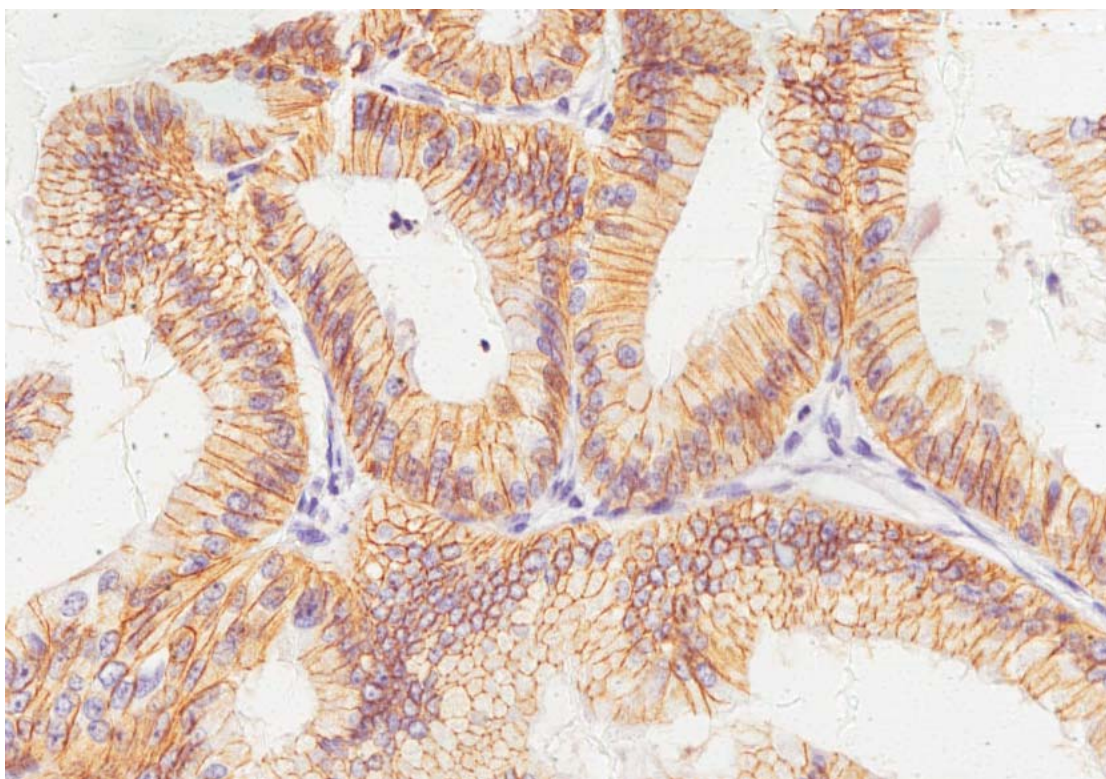


Figura 25 - Claudina 7, imunoexpressão positiva. Aumento de 200x.

A maioria dos adenocarcinomas serosos, células claras e carcinosarcomas apresentaram-se sob forma de doença avançada, distribuindo-se entre os estadios III e IV. A maioria dos adenocarcinomas endometrióides apresentaram-se em estadio clínico I. A diferença de apresentação ao diagnóstico não foi estatisticamente significativa entre as categorias diagnósticas.

Não observamos diferenças entre os Adenocarcinoma endometrióides grau 3 e Adenocarcinomas serosos com relação a presença e profundidade de infiltração neoplásica miometrial, invasão linfovascular, metástases linfonodais e estadiamento.

Não observamos diferenças entre os escores de intensidade de expressão de Claudinas 3, 4, 5 e 7 comparando-se as categorias diagnósticas de endométrio normal, hiperplásico e adenocarcinoma endometrióide. No entanto, a Cl1 foi expressa de forma diferente entre os grupos, observando-se maior positividade nos casos de Adenocarcinoma endometrióide.

A análise das curvas de sobrevida global e sobrevida livre de doença não mostrou relação da sobrevida com escores de intensidade da Claudinas, com a intensidade isoladamente ou com a porcentagem de células positivas.

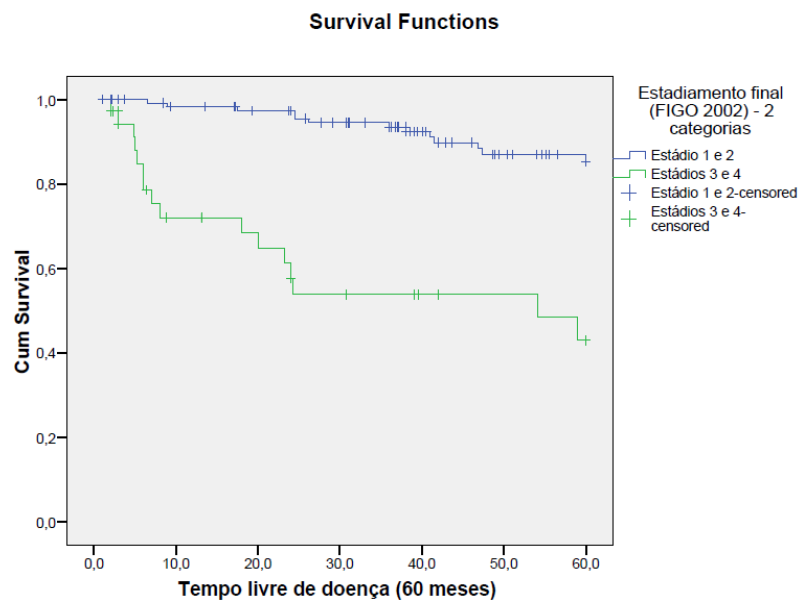
Nenhuma das Claudinas esteve associada com a recorrência na análise multivariada. O único fator associado foi o estadiamento (Tabela 26 e Figuras 26 a 29). A análise multivariada para risco de óbito mostrou que a negatividade para Claudina 4 é um fator prognóstico, ou seja, a negatividade

para Claudina 4 relaciona-se a uma pior sobrevida global (ver Tabela 27 e Figuras 30 a 33).

Tabela 26 - Fatores de risco para recorrência em 5 anos de acordo com o modelo de riscos proporcionais de Cox. Variáveis de ajuste consideradas na análise: estadiamento, tipo histológico, grau histológico e década de tratamento (excluíram-se da análise as mulheres no estágio IVB).

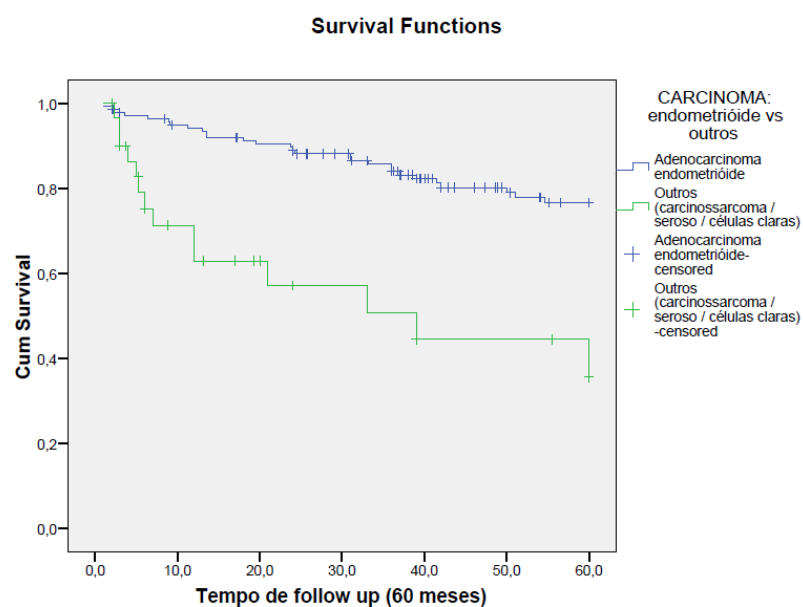
VARIÁVEL	CATEGORIAS	N	HR (*)	IC95% (HR)	P
Estadiamento	I ou II	121	1,0	Referência 2,3 – 15,6	< 0,001
	III ou IVA	33	5,9		
Tipo histológico	Endometrióide	134	1,0	Referência 0,2 – 3,1	0,664
	Seroso papilífero / Células claras	20	0,7		
Grau histológico	Graus 1 e 2	115	1,0	Referência 0,9 – 9,5	0,063
	Grau 3	39	3,0		
Década do tratamento	1980 – 1989	11	1,0	Referência 0,1 – 1,9	0,261
	1990 em diante	143	0,4		

(*) Total de casos considerados na análise = 154. Número de eventos = 27.



Log rank $p < 0,001$

Figura 26 - Análise do tempo de sobrevida livre de recorrência de acordo com o estadiamento (análise univariada)



Log rank $p < 0,001$

Figura 27 - Análise do tempo de sobrevida livre de recorrência de acordo com o tipo histológico (análise univariada)

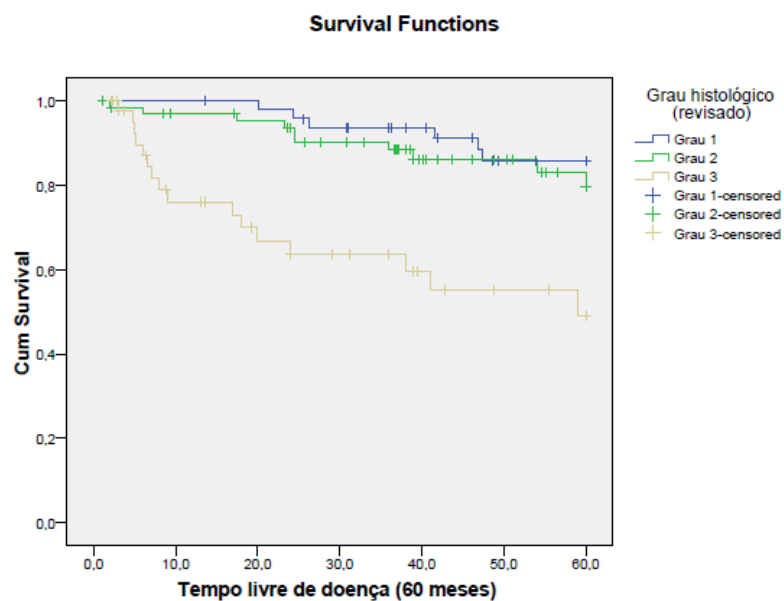


Figura 28 - Análise do tempo de sobrevida livre de recorrência de acordo com o grau histológico (análise univariada).

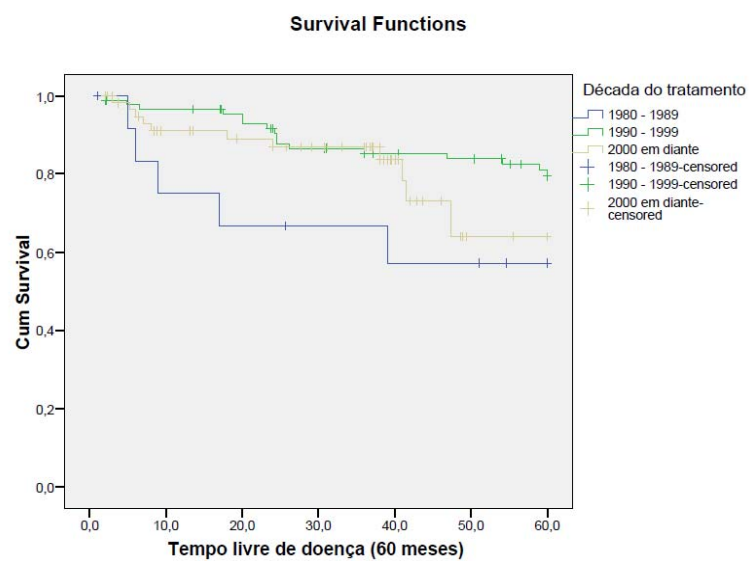


Figura 29 - Análise de sobrevida livre de recorrência de acordo com a década de tratamento (análise univariada)

Tabela 27 - Fatores de risco para óbito em 5 anos de acordo com o modelo de riscos proporcionais de Cox. Variáveis de ajuste consideradas na análise: estadiamento, tipo histológico, grau histológico, idade e década de tratamento.

VARIÁVEL	CATEGORIAS	N	HR (*)	IC95% (HR)	P
Claudina 4	Negativa (0 ou 1)	56	3,4	1,3 – 8,8	0,010
	Positiva fraca (2 ou 4)	40	2,5	0,9 – 7,1	0,086
	Positiva forte (6 ou 9)	60	1,0	Referência	
Estadiamento	I ou II	119	1,0	Referência	< 0,001
	III ou IV	37	14,4	5,8 – 36,2	
Tipo histológico	Endometrióide	134	1,0	Referência	0,463
	Seroso papilífero / Células claras	22	0,7	0,3 – 2,0	
Grau histológico	Graus 1 e 2	114	1,0	Referência	0,092
	Grau 3	42	2,3	0,9 – 5,8	
Idade	< 70 anos	105	1,0	Referência	< 0,001
	70 anos ou mais	51	5,2	2,2 – 12,0	
Década do tratamento	1980 – 1989	13	1,0	Referência	
	1990 – 1999	83	0,1	0,04 – 0,3	< 0,001
	2000 em diante	60	0,1	0,05 – 0,3	< 0,001

(*) Total de casos considerados na análise = 156. Número de eventos = 36.

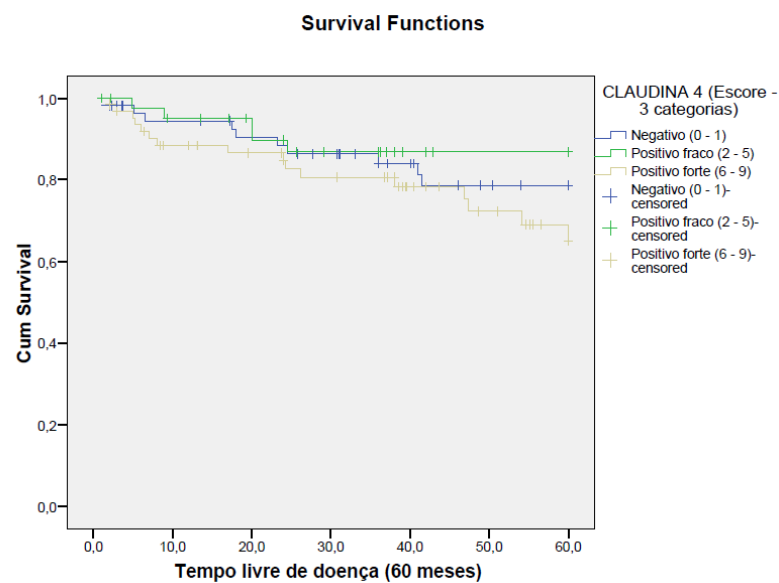


Figura 30 - Análise de sobrevida global de acordo com a expressão de Claudina 4 (análise univariada)

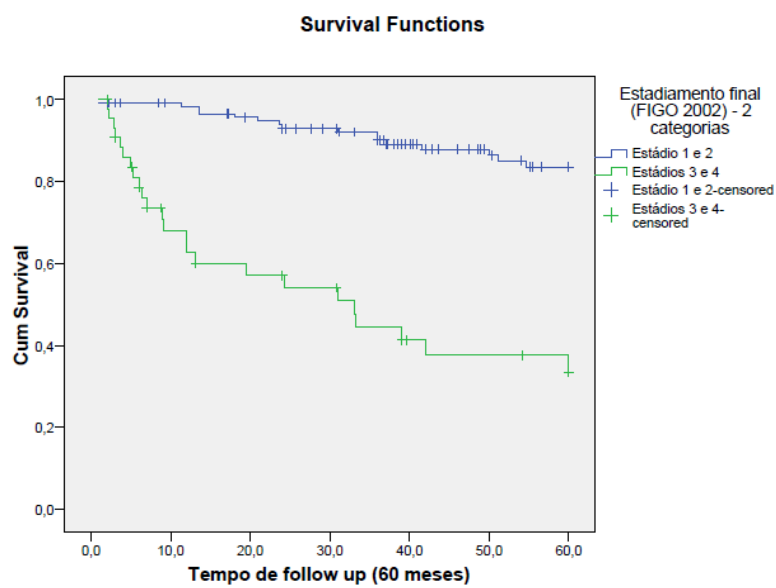
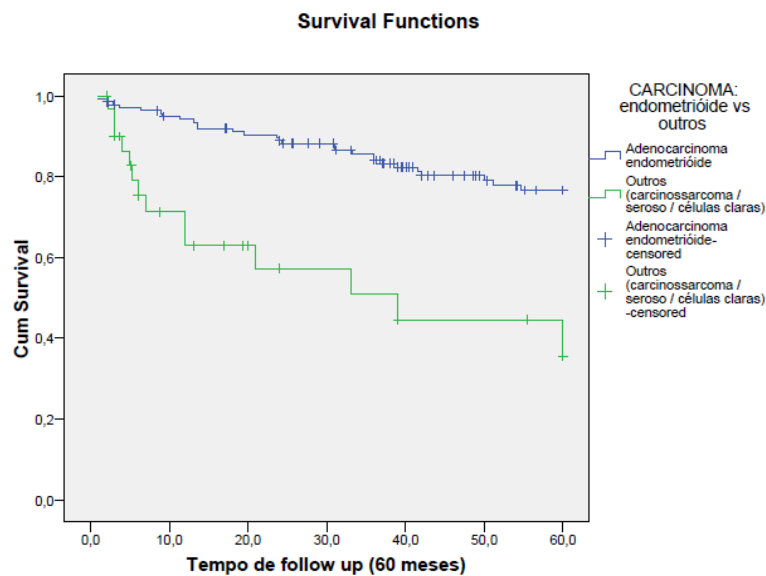
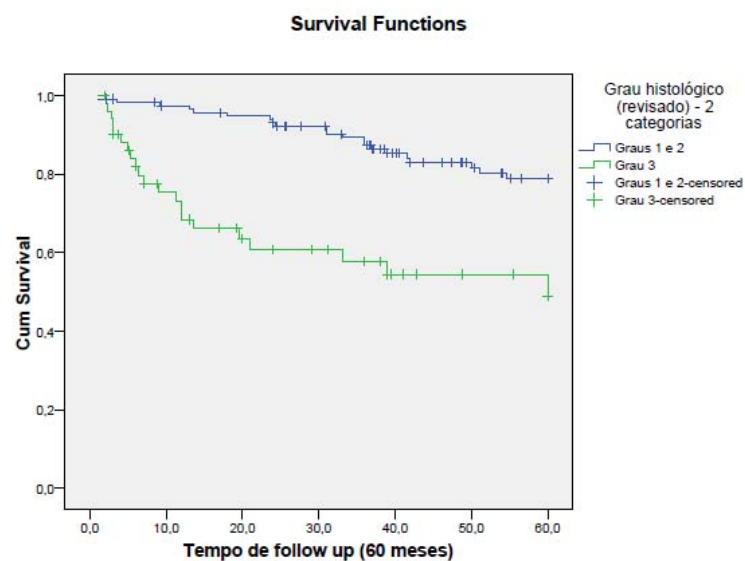


Figura 31- Análise de sobrevida global de acordo com o estadiamento (análise univariada)



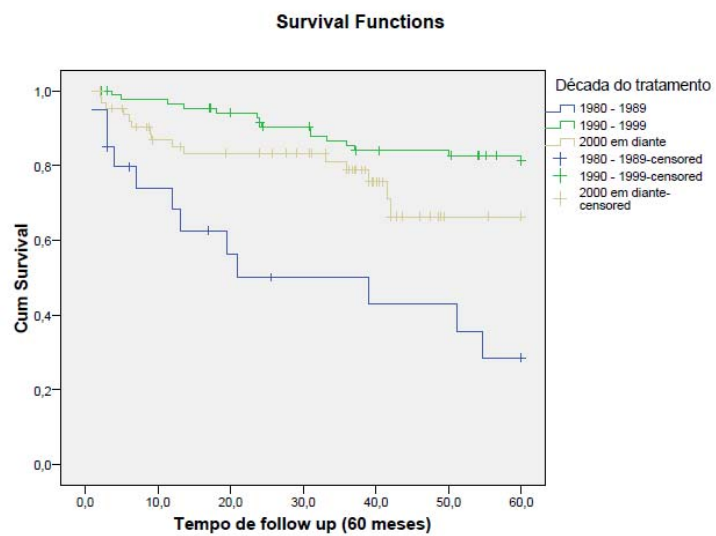
Log rank $p < 0,001$

Figura 32 - Análise de sobrevida global de acordo com o tipo histológico (análise univariada)



Log rank $p < 0,001$

Figura 33 - Análise de sobrevida global de acordo com o grau histológico (análise univariada)



Log rank $p < 0,001$

Figura 34 - Análise de sobrevida global de acordo com a década do tratamento (análise univariada)

6 DISCUSSÃO

O estudo de SOBEL et al. (2006) conclui que há diferença nos padrões de expressão das Cl1 e Cl2 na dependência do tipo histológico, podendo ser marcadores importantes para diagnóstico diferencial entre os carcinomas tipo I e tipo II. O autor demonstra que em geral a Cl1 é expressa em maior frequência e intensidade que a Cl2 nos adenocarcinomas serosos. O contrário ocorre nos adenocarcinomas endometrioides. Em concordância com a literatura, no nosso estudo observamos maior expressão de Cl1 nos adenocarcinomas serosos e células claras (carcinomas tipo II) comparados aos adenocarcinomas endometrioides e a diferença entre os grupos foi estatisticamente significativa.

Por outro lado, o padrão de expressão de Claudina 2 não foi semelhante aos relatados na literatura pois observamos apenas a coloração citoplasmática. Neste trabalho levamos em consideração apenas a positividade das Claudinas na membrana plasmática.

Outra conclusão importante relacionada a Cl1 é que ela apresenta maior frequência de positividade nos casos com metástases linfonodais e correlaciona-se com a presença de invasão linfovascular de forma estatisticamente significativa. Além disso, há diferença significativa na expressão da Cl1 entre os 3 graus histológicos, sendo mais expressa nos graus histológicos 2 e 3. Até o momento não há relatos na literatura que corroborem com estes achados.

A explicação para a correlação entre a positividade da Cl1 e a presença de metástases linfonodais e invasão vascular poderia também estar relacionada ao fato desta Claudina ser mais frequentemente expressa nos carcinomas tipo II e nos tumores com maior grau histológico.

A Cl1 também é diferencialmente expressa entre as categorias diagnósticas de endométrio normal, hiperplásico e adenocarcinomas endometrióides, sendo mais frequentemente expressa de forma moderada a intensa no último grupo. Este achado pode denotar a participação da Cl1 na via da carcinogênese dos carcinomas tipo I.

Deste modo, a positividade para Cl1 pode estar relacionada ao tipo histológico de comportamento mais agressivo (carcinomas tipo II) assim como associada a via de progressão endométrio normal – hiperplasia endometrial - adenocarcinoma endometrióide. Como não há estudos corroborando com estas observações, estudos futuros podem ser realizados na tentativa de comprovar funcionalmente as ações da Cl1 na via de carcinogênese.

A Claudina 3 é expressa diferentemente entre as categorias diagnósticas de endométrio normal, hiperplasias e câncer, apresentando maior expressão nos carcinomas e endométrio normal e menor nas hiperplasias e pólipos. Diferente do que é relatado na literatura, não houve diferença de expressão entre os carcinomas tipo I, tipo II e carcinossarcomas. Segundo Pan et al e Santin et al há superexpressão de Claudina 3 nos carcinomas tipo II e carcinossarcomas, assim como nos adenocarcinomas endometrióides de mais alto grau ou com estadiamento

clínico avançado. Além disso, nestes estudos observou-se negatividade para Claudina 3 nas amostras de endométrio normal. No nosso estudo, tanto o endométrio normal como nos carcinomas houve expressão de Claudina 3, sendo que a diferença significativa entre as categorias diagnósticas se deve provavelmente ao fato de as hiperplasias e pólipos serem mais frequentemente negativas.

Também não observamos correlação entre a positividade da Cl3 e o estadiamento, grau histológico, metástases ou invasão vascular, diferentemente do que foi relatado por SANTIN et al e PAN et al.

No entanto, em concordância com estudos recentes de Pan et al, houve correlação estatisticamente significativa entre a expressão moderada a intensa de Claudina 3 e a presença de infiltração neoplásica miometrial. Não observamos diferença entre a expressão da Claudina 3 e a profundidade de invasão neoplásica na parede miometrial.

Com relação a Cl4 nosso estudo não apresenta os mesmos resultados da literatura. A maioria dos trabalhos de PAN et al e SANTIN et al mostram aspectos semelhantes de expressão e associação a características anátomo-clínicas entre Claudinas 3 e 4, em que se relata maior expressão destas Claudinas nos carcinomas se comparados ao endométrio normal. Além disso, há associação entre a superexpressão com a presença de infiltração miometrial e metástases. Não observamos expressão diferencial desta Claudina com relação aos tipos de carcinoma, estadiamento, infiltração miometrial ou presença de metástases e invasão linfovascular. Da mesma forma, em discordância com os achados da literatura, observamos

expressão diferencial da Cl4 em comparação com endométrio normal, pólipos, hiperplasias e carcinomas, sendo que as amostras de endométrio normal e carcinomas apresentam frequência semelhante de positividade e a diferença estatisticamente significativa entre as categorias diagnósticas se deve provavelmente ao fato da maioria das hiperplasias e pólipos serem negativos para este marcador. Em síntese, não observamos diferenças de expressão da Claudina 4 entre as amostras de endométrio normal e neoplásico, nem correlação da positividade desta proteína com características anátomo-clínicas. Por outro lado, a negatividade para Claudina 4 representa um fator de pior sobrevida global na análise multivariada, dado também não relatado na literatura.

As Cl5 e Cl7 não apresentam diferenças estatisticamente significativas com relação ao padrão de expressão entre as categorias diagnósticas e não há relatos consistentes na literatura sobre o padrão de expressão destas proteínas no endométrio nem da sua correlação com características anátomo-clínicas. A positividade moderada a intensa das Claudina 5 e 7 correlaciona-se com menor grau histológico nos carcinomas (tumores bem diferenciados), podendo deste modo estar relacionada a tumores com características histológicas de menor agressividade.

7 CONCLUSÕES

Objetivando verificar a expressão diferencial das Claudinas 1, 2, 3, 4, 5 e 7, entre as categorias diagnósticas de endométrio normal em suas diversas fases, pólipos endometriais, hiperplasias e carcinomas endometriais, nosso estudo mostra que há diferença estatisticamente significativa entre o padrão de expressão da Claudina 1 nos carcinomas e o endométrio normal, sendo que a maioria das amostras de endométrio normal, além das hiperplasias e pólipos, são negativas para este marcador. Quando positiva, a Claudina 1 é mais frequentemente expressa nos casos de carcinoma. A Claudina 2 não apresentou expressão na membrana citoplasmática, apenas no citoplasma em todas as amostras estudadas, podendo ser alvo de estudos futuros que justifiquem este padrão de expressão, como estudos funcionais da proteína. As Claudina 3 e 4 apresentaram expressão semelhante no endométrio normal e nos carcinomas, sendo positiva na maioria dos casos. Houve menor expressão desta proteína nos casos de hiperplasias atípicas e pólipos. Com relação às demais Claudinas, Cl5 e Cl7, não observamos diferença significativa no padrão de expressão entre as categorias diagnósticas supracitadas.

No nosso estudo, as principais conclusões relacionadas a correlação entre a expressão de Claudinas e características anátomo-clínicas relacionam-se às Claudinas 1 e 3. A expressão da Claudina 1 associa-se aos tipos histológicos mais agressivos clinicamente (carcinomas tipo II e carcinossarcomas), assim como maior grau histológico, presença de

metástases linfonodais e invasão linfovascular. Além disso, a diferença de expressão entre o endométrio normal, hiperplásico e adenocarcinomas endometrióides pode sugerir um possível papel desta molécula da via de carcinogênese dos carcinomas tipo I. A expressão da Claudina 3 associa-se com a presença de infiltração miometrial, podendo ser um preditor de comportamento mais agressivo dos diversos tipos de carcinomas. Além disso, há outra importância clínico-epidemiológica desta constatação. Estudos utilizando a CPE mostram que há afinidade entre esta e o domínio externo das Claudinas 3 e 4, podendo assim tornar-se uma opção terapêutica nos casos que expressam de forma moderada a intensa a Claudina 3. Observamos também, maior expressão de Claudinas 5 e 7 associada a graus histológicos menores (graus 1 e 2) e, deste modo, a positividade destas Claudinas pode associar-se a tumores mais bem diferenciados.

Com relação ao prognóstico, observamos que a negatividade da Claudina 4 é um fator de pior prognóstico para sobrevida global na análise multivariada. O único fator associado a menor tempo de sobrevida livre de recorrência foi o estadiamento clínico.

As perspectivas deste estudo abrangem principalmente a realização de pesquisas que foquem as características funcionais das Claudinas buscando melhor compreensão da participação das mesmas nas vias da carcinogênese endometrial. Além disso, ensaios clínicos que tenham as Claudinas como alvo podem ser importantes como alternativa de terapêutica alvo-induzida.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. **Molecular biology of the cell**. 4th ed. New York: Garland Science; 2002. Cell junction, cell adhesion, and the extracellular matrix; p.1065-126.

Clement PB, Young RH. Endometrioid carcinoma of the uterine corpus: a review of its pathology with emphasis on recent advances and problematic aspects. **Adv Anat Pathol** 2002; 9:145-84.

Choi YL, Kim J, Kwon MJ, Choi JS, Kim TJ, Bae DS, Koh SS, In YH, Park YW, Kim SH, Ahn G, Shin YK. Expression profile of tight junction protein claudin 3 and claudin 4 in ovarian serous adenocarcinoma with prognostic correlation. **Histol Histopathol** 2007; 22:1185-95.

Facchetti F, Lonardi S, Gentili F, et al. Claudin 4 identifies a wide spectrum of epithelial neoplasms and represents a very useful marker for carcinoma versus mesothelioma diagnosis in pleural and peritoneal biopsies and effusions. **Virchows Arch** 2007; 451:669-80.

Hecht JL, Mutter GL. Molecular and pathologic aspects of endometrial carcinogenesis. **J Clin Oncol** 2006; 24:4783-91.

Hewitt KJ, Agarwal R, Morin PJ. The claudin gene family: expression in normal and neoplastic tissues. **BMC Cancer** 2006; 6:186.

Kallioniemi OP, Sukumar S. Loss of the *tight junction* protein claudin-7 correlates with histological grade in both ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of the breast. **Oncogene** 2003; 22:2021-33.

Kominsky SL, Argani P, Korz D, et al. Loss of the *tight junction* protein claudin-7 correlates with histological grade in both ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of the breast. **Oncogene** 2003; 22:2021-33.

Kominsky SL. Claudins: emerging targets for cancer therapy. **Expert Rev Mol Med** 2006; 8:1-11.

Konecny GE, Agarwal R, Keeney GA, et al. Claudin-3 and claudin-4 expression in serous papillary, clear-cell, and endometrioid endometrial cancer. **Gynecol Oncol** 2008; 109:263-9.

Koul A, Willén R, Bendahl PO, Nilbert M, Borg A. Distinct sets of gene alterations in endometrial carcinoma implicate alternate modes of tumorigenesis. **Cancer** 2002; 94:2369-79.

Lax SF. Molecular genetic pathways in various types of endometrial carcinoma: from a phenotypical to a molecular-based classification. **Virchows Arch** 2004; 444:213-23.

Lee JW, Lee SJ, Seo J, et al. Increased expressions of claudin-1 and claudin-7 during the progression of cervical neoplasia. **Gynecol Oncol** 2005; 97:53-9.

Morin PJ. Claudin proteins in human cancer: promising new targets for diagnosis and therapy. **Cancer Res** 2005; 65:9603-6.

Nübel T, Preobraschenski J, Tuncay H, Weiss T, Kuhn S, Ladwein M, Langbein L, Zöller M. Claudin-7 regulates EpCAM-mediated functions in tumor progression. **Mol Cancer Res** 2009; 7:285-99.

Oliveira SS, Morgado-Díaz JA. Claudins: multifunctional players in epithelial *tight junctions* and their role in cancer. **Cell Mol Life Sci** 2007; 64:17-28.

Pan XY, Wang B, Che YC, Weng ZP, Dai HY, Peng W. Expression of claudin-3 and claudin-4 in normal, hyperplastic, and malignant endometrial tissue. **Int J Gynecol Cancer** 2007; 17:233-41.

Rangel LB, Agarwal R, D'Souza T, et al. *Tight junction* proteins claudin-3 and claudin-4 are frequently overexpressed in ovarian cancer but not in ovarian cystadenomas. **Clin Cancer Res** 2003; 9:2567-75.

Santin AD, Bellone S, Marizzoni M, et al. Overexpression of claudin-3 and claudin-4 receptors in uterine serous papillary carcinoma: novel targets for a type-specific therapy using *Clostridium perfringens* enterotoxin (CPE). **Cancer** 2007a; 109:1312-22.

Santin AD, Bellone S, Siegel ER, et al. Overexpression of *Clostridium perfringens* enterotoxin receptors claudin-3 and claudin-4 in uterine carcinosarcomas. **Clin Cancer Res** 2007b; 13:3339-46.

Sawada N, Murata M, Kikuchi K, et al. *Tight junctions* and human diseases. **Med Electron Microsc** 2003; 36:147-56.

Silverberg SG, Kurman RJ, Nogales F, Mutter GL, Kubik-Huch RA, Tavassoli FA. Epithelial tumours and related lesions. In: Tavassoli FA, Deville P, editors. **Pathology and genetics of tumors of the breast and female genital organs**. Lyon: IARC Press; 2003. p.221-57. (IARC WHO Classification of Tumours, n° 4).

Sobel G, Németh J, Kiss A, Lotz G, Szabó I, Udvarhelyi N, Schaff Z, Páska C. Claudin 1 differentiates endometrioid and serous papillary endometrial adenocarcinoma. **Gynecol Oncol** 2006; 103:591-8.

Sobin LH, Wittekind CH. **TNM classification of malignant tumors**. 6th ed. Trad. de ALA Eisenberg. Rio de Janeiro: INCA; 2004. Tumores ginecológicos; p.149-84.

Soini Y, Talvensaaari-Mattila A. Expression of claudins 1, 4, 5, and 7 in ovarian tumors of diverse types. **Int J Gynecol Pathol** 2006; 25:330-5.

Soini Y. Expression of claudins 1, 2, 3, 4, 5 and 7 in various types of tumours. **Histopathology** 2005; 46:551-60.

Swisshelm K, Macek R, Kubbies M. Role of claudins in tumorigenesis. **Adv Drug Deliv Rev** 2005; 57:919-28.

Szabó I, Kiss A, Schaff Z, Sobel G. Claudins as diagnostic and prognostic markers in gynecological cancer. **Histol Histopathol** 2009; 24:1607-15.

Takehara M, Nishimura T, Mima S, Hoshino T, Mizushima T. Effect of claudin expression on paracellular permeability, migration and invasion of colonic cancer cells. **Biol Pharm Bull** 2009; 32:825-31.

Tsukita S, Yamazaki Y, Katsuno T, Tamura A, Tsukita S. *Tight junction*-based epithelial microenvironment and cell proliferation. **Oncogene** 2008; 27:6930-8.

Zaino RJ, Kurman RJ, Diana KL, Morrow CP. The utility of the revised International Federation of Gynecology and Obstetrics histologic grading of endometrial adenocarcinoma using a defined nuclear grading system. A Gynecologic Oncology Group study. **Cancer** 1995; 75:81-6.

Zaino RJ. FIGO staging of endometrial adenocarcinoma: a critical review and proposal. **Int J Gynecol Pathol** 2009; 28:1-9.

Zorn KK, Bonome T, Gangi L, et al. Gene expression profiles of serous, endometrioid, and clear cell subtypes of ovarian and endometrial cancer. **Clin Cancer Res** 2005; 11:6422-30.