

**ESTUDO DE MARCADORES IMUNOISTOQUÍMICOS
RELACIONADOS A ORIGEM DOS
ADENOCARCINOMAS DO COLO UTERINO: ANÁLISE
DO VALOR PROGNÓSTICO DA DIFERENCIAÇÃO
ENTRE TUMORES DE ORIGEM ENDOCERVICAL E
ENDOMETRIAL.**

MARCEL DAVI LOUREIRO DE MELO

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

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dr. João Victor Salvajoli

São Paulo

2011

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Melo, Marcel Davi Loureiro de
Estudo de marcadores imunoistoquímicos relacionados a origem dos adenocarcinomas do colo uterino: análise do valor prognóstico da diferenciação entre tumores de origem endocervical e endometrial.

/Marcel Davi Loureiro de Melo. São Paulo, 2011.

69p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: João Victor Salvajoli.

Descritores: 1. NEOPLASIAS UTERINAS 2. COLO DE ÚTERO 3.
4. PROGNÓSTICO. 5. IMUNOISTOQUÍMICA.

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação a quem me faz ser feliz todos os dias, quem faz a minha vida melhor do que eu nunca poderia imaginar, o grande amor da minha vida...

É tudo por você, Pessoas.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos aqueles que contribuíram, de alguma forma, para que eu superasse mais esse desafio. Entre eles, gostaria de citar alguns nomes que, se não participaram diretamente, moldaram o caminho para que eu atingisse mais essa grande conquista.

Minha mãe Ivanelza e meu pai Marcos Davi, que me construíram.
Meu professor, Dr. Claudio Eduardo Cavalcanti, que me iniciou na pesquisa.
Meus colegas da época de residência, Alexandre Jacinto, Gustavo Vianni e Marcus Castilho, que me inspiraram a ser como eles.

E, por fim, gostaria de agradecer as pessoas que, junto comigo, colocaram a mão na massa e fizeram este trabalho acontecer: os colegas da ginecologia Carlos Faloppa e Lillian Kumagai, minha co-orientadora Dra. Maria Dirlei Begnami, e quem acreditou em mim e me deu a oportunidade de mostrar o meu potencial, meu orientador Dr. João Victor Salvajoli.

RESUMO

De Melo MDL. **Estudo de marcadores imunoistoquímicos relacionados a origem dos adenocarcinomas do colo uterino: análise do valor prognóstico da diferenciação entre tumores de origem endocervical e endometrial.** São Paulo; 2011. [Dissertação de Mestrado - Fundação Antônio Prudente]

A incidência dos carcinomas espinocelulares (CEC) do colo do útero vem diminuindo com a adoção universal de exames preventivos no Brasil e no mundo. Ao mesmo tempo, o adenocarcinoma (AC) vem aumentando relativamente sua proporção, chegando a representar até 20% dos casos de câncer cervical, nas casuísticas mais recentes. Com esse aumento relativo, cada vez mais estudos vêm trazendo resultados que apontam para uma diferença importante entre o AC e o CEC cervical seja na relação destes com os fatores prognósticos seja nos resultados terapêuticos. Fizemos então um estudo para analisar se um painel imunoistoquímico que já é rotineiramente utilizado para diagnosticar se um AC cervical é de origem endocervical ou endometrial poderia trazer informações prognósticas relevantes. A casuística contou com 91 pacientes com AC do colo uterino, tratadas cirurgicamente de 1980 a 2008, sendo 24 com cirurgia exclusiva e 67 com algum tipo de tratamento adjuvante (principalmente radioterapia). Foram analisadas as expressões de quatro marcadores: Antígeno Carcino-Embrionário (CEA), Vimentina, Receptor de estrógeno (RE) e P16. Foram formados três grupos de acordo com a combinação dos marcadores: grupo Indeterminado, grupo Origem Endocervical e grupo Origem Endometrial. Não houve diferença significativa de sobrevida ou controle da doença entre os grupos. Na análise individual, a Vimentina mostrou relação com pior sobrevida livre de doença ($p=0,045$). Quando analisados apenas os casos com EC IB e IIA, sem linfonodos acometidos, a Vimentina também se mostrou associada a pior controle local ($p=0,018$) e pior sobrevida câncer

específica ($p=0,013$). O nosso estudo não mostrou relação entre a origem dos AC cervicais e a sobrevida ou controle da doença, mas mostrou relação entre a expressão de Vimentina e o prognóstico desses tumores.

SUMMARY

de Melo MDL. **[Study of immunohistochemical markers related to the origin of the cervical adenocarcinomas: analysis of the prognostic value in differentiating between tumors of endocervical and endometrial origin.]**. São Paulo; 2011. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente]

The incidence of squamous cell carcinomas (SCC) of the cervix has decreased in Brazil and worldwide after the universal adoption of preventive programs. At the same time, adenocarcinoma (AC) has increased its proportion and now represents 20% of the cervical cancers in some series. Due to this relative increase, more and more studies have brought results that point to an important difference between AC and SCC either in their relationship with the prognostic factors as for therapeutic results. We design a study to evaluate if an immunohistochemical panel that is already routinely used to diagnose whether cervical AC has an endocervical or endometrial origin could provide relevant prognostic information. The series had 91 patients with AC of uterine cervix treated surgically from 1980 to 2008, 24 with surgery alone and 67 with some kind of adjuvant treatment (mainly radiotherapy). We analyzed the expression of four markers: Carcino-Embryonic Antigen (CEA), Vimentin, estrogen receptor (ER) and P16. Three groups were defined according to the combination of the markers: Undetermined group, Endocervical Origin group and Endometrial Origin group. There was no significant difference in survival or disease control between the groups. In individual analysis, Vimentin was related to worse disease-free survival ($p = 0.045$). When analyzed only cases with clinical stage IB and IIA without lymph nodes metastases Vimentin was also associated with worse local control ($p = 0.018$) and lower cancer-specific survival ($p = 0.013$). Our study showed no relationship between the origin of

cervical AC and survival or disease control and showed a relationship between the expression of Vimentin and prognosis of these tumors.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Dificuldades no diagnóstico diferencial por imagem e macroscopia.....	4
Figura 2	Participação do P16 na infecção por HPV de alto risco.....	9
Figura 3	Casos positivos e negativos da expressão de cada marcador.....	31
Figura 4	Comparação dos grupos com várias curvas de sobrevida.....	35
Figura 5	Curvas de sobrevida global para cada marcador.....	37
Figura 6	Curva de sobrevida livre de doença para a Vimentina.....	38
Figura 7	Curvas de sobrevida global por acometimento e EC.....	39
Figura 8	Curvas de sobrevida no grupo IB/IIA-LND.....	41
Figura 9	Controle local no grupo IB/IIA-LND por marcador.....	44
Figura 10	Sobrevida livre de doença no grupo IB/IIA-LND por marcador.....	45
Figura 11	Sobrevida global no grupo IB/IIA-LND por marcador.....	46
Figura 12	Sobrevida câncer específica no grupo IB/IIA-LND por marcador.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS

16PO7	Clone do marcador imunoistoquímico P16
AC	Adenocarcinoma
AS	Adenoescamoso
CEA	Antígeno cárcino-embrionário
CEC	Carcinoma espinocelular
Cdk 4	Proteína relacionada ao ciclo celular
Cdk 6	Proteína relacionada ao ciclo celular
CD66e	Família de proteínas de filamento intermediário
CDKN2	Proteína relacionada ao gene supressor de tumor
CK7	Marcador imunoistoquímico (citoqueratina sete)
CK20	Marcador imunoistoquímico (citoqueratina vinte)
CK34beta	Marcador imunoistoquímico (citoqueratina 34beta)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E2F	Fator que provoca expressão de proteínas do ciclo celular
E7	Proteína relacionada a um gene de leitura precoce
EC	Estadiamento clínico
EUA	Estados Unidos da América
Gy	Unidade de dose de radiação (<i>Gray</i>)
HPV	Papiloma vírus humano
IL7	Clone do marcador imunoistoquímico CEA
IPN	Invasão peri-neural
IVL	Invasão vascular linfática
MCM	Proteína relacionada ao ciclo celular
MST1	Proteína relacionada ao gene supressor de tumor
NIC	Neoplasia intra-epitelial cervical
NS	não significativo
P	significância estatística
P16	Proteína relacionada ao ciclo celular
p53	Gene supressor tumoral

PCNA	Proteína relacionada ao ciclo celular
PCR	Reação de cadeia da polimerase (do inglês <i>polimerase chain reaction</i>)
pRB	Gene do retinoblastoma (supressor de tumor)
RE	Receptor de estrógeno
SLD	Sobrevida livre de doença
SLM	Sobrevida livre de metástases
SP1	Clone do marcador imunoistoquímico RE
T2	Ponderação de imagem em ressonância magnética
TMA	<i>Tissue microarray</i>
TTF1	Marcador imunoistoquímico
V9	Clone do marcador imunoistoquímico Vimentina

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Diagnóstico diferencial	3
1.2	Painel de Marcadores imunoistoquímicos	6
1.3	Fatores prognósticos e tratamento	11
2	OBJETIVOS	21
3	CASUÍSTICA E MÉTODOS	22
3.1	Construção e interpretação do TMA	23
3.2	Formação dos grupos através dos marcadores imunoistoquímicos	25
3.3	Definição das sobrevidas	26
3.4	Análise estatística.....	26
4	RESULTADOS	28
4.1	Características da população	28
4.2	Expressão dos marcadores e formação dos grupos	30
4.3	Análises de sobrevida	34
4.4	Análises de sobrevida para um subgrupo específico	40
5	DISCUSSÃO	48
6	CONCLUSÕES	57
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

ANEXOS

Anexo 1 Aprovação do Comitê de Ética do Hospital A C. Camargo

Anexo 2 Figuras ampliadas das curvas com p significativo

1 INTRODUÇÃO

O câncer do colo do útero é o segundo tipo de câncer mais frequente entre as mulheres no Brasil. São esperados aproximadamente 500 mil novos casos por ano no mundo. No país, a estimativa para 2010 é de mais de 18 mil casos, com um risco estimado de 18 casos a cada 100 mil mulheres. A maior incidência da doença se dá na quarta década de vida (40-49 anos). Conjuntamente com o câncer de pele, o câncer de colo uterino é o que apresenta maior potencial de prevenção e cura quando diagnosticado precocemente, sendo que uma redução de cerca de 80% da mortalidade pode ser atingida com o rastreamento de mulheres na faixa etária de 25 a 65 anos, por meio do teste de Papanicolau e do tratamento das lesões. Apesar disso, a sobrevida média estimada em 5 anos é apenas de 49% (Ministério da Saúde 2009).

A histologia mais comum do câncer de colo uterino é o carcinoma espinocelular (CEC). Classicamente, ele correspondia a cerca de 90% desses tumores. Nesse contexto clássico, o adenocarcinoma (AC) do colo uterino correspondia a, no máximo, 12% dos casos (HARMON e COOPER 2009). Nos últimos 40 anos, porém, com a implementação das estratégias de rastreamento e tratamento precoce, a incidência dos tumores de colo uterino vem caindo, principalmente nos países e regiões mais desenvolvidas. Como exemplo, a incidência na região Norte do Brasil é de 23 casos para 100 mil habitantes, enquanto, na região Sudeste, é 16 por 100

mil habitantes (Ministério da Saúde 2009). Como essa redução acontece principalmente no tipo histológico mais comum que é o carcinoma espinocelular (CEC), está acontecendo um aumento relativo da incidência dos outros tipos histológicos, sendo o adenocarcinoma (AC) o tipo histológico que mais aumentou sua incidência relativa (SMITH et al. 2000; SASIENI e ADAMS 2001; BRAY et al. 2005). Em estudos mais recentes, a incidência relativa do AC pode representar mais de 20% dos casos de tumores de colo uterino nos EUA (WANG et al. 2004). No Brasil, MARTINS et al. em estudo de 2009, mostraram aumento da incidência relativa dos AC cervicais no estado de Goiás.

A etiologia do AC e do CEC do colo uterino não é a mesma. Apesar de compartilharem alguns fatores de risco comuns como idade e uso de contraceptivos orais (SMITH et al. 2003), quase sempre, os fatores relacionados a cada tipo são distintos, sendo que, muitas vezes os fatores relacionados ao AC são semelhantes aos de tumores endometriais. Enquanto paridade é um fator de risco importante para o CEC e não para o AC, a obesidade é um fator de risco para o último, mas não para o primeiro (CASTELLSAGUÉ et al. 2006). APPLEBY et al. em um grande estudo de 2006 que incluiu mais de 13 mil casos (dos quais 15% eram de AC), mostraram que exposição ao cigarro (idade de início e número de cigarros fumados) é um fator de risco associado à CEC de colo uterino, mas não está associado ao AC.

O fator etiológico mais importante para os tumores de colo uterino é o Papiloma Vírus Humano (HPV), e a relação desse fator com cada tipo

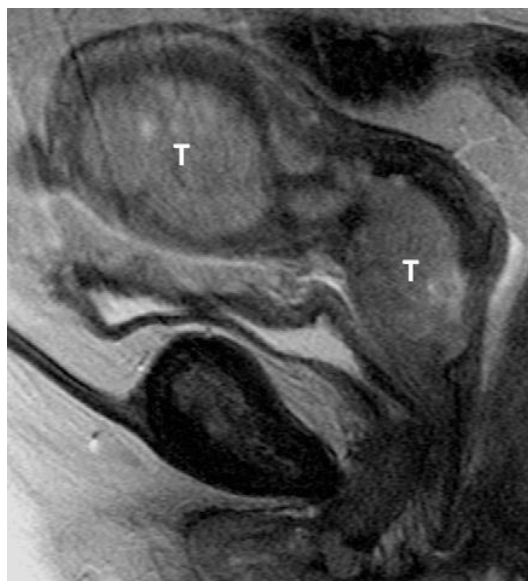
histológico é diferente. Em geral, os subtipos 16 e 18 são os mais comumente associados aos tumores invasivos do colo uterino, sendo ainda mais frequentes nos ACs (82%). Nos CECs, essa participação é menor, uma vez que eles estão associados a um espectro maior de subtipos. Além disso, enquanto no AC o HPV 18 corresponde a 50% dos casos, ele corresponde a apenas 15% dos casos no CEC, onde o tipo 16 é o mais comum (CASTELLSAGUÉ et al. 2006).

1.1 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

O diagnóstico preciso do AC do colo uterino pode ser dificultado por fatores anatômicos e histológicos.

Em tumores iniciais menores, onde muitas vezes, o diagnóstico é feito por curetagem sem o auxílio de uma histeroscopia, é impossível determinar de que região exatamente veio o material. Em tumores maiores e mais avançados, a dificuldade é ainda maior, pois o tumor invade tanto o colo uterino como o corpo do útero. Nesses casos, frequentemente não é possível ao exame físico, radiológico ou até mesmo ao exame da peça cirúrgica determinar se é um tumor de colo uterino infiltrando o útero ou um tumor de útero infiltrando o colo uterino (Figura 1).

(A)



(B)



Legenda: (A) Imagem sagital de ressonância em T2 de paciente com 67 anos e biópsia cervical mostrando tumor indiferenciado. A imagem mostra um tumor que ocupa tanto a cavidade uterina como a região do colo. Não foi possível determinar a origem do tumor pela imagem ou pela macroscopia. Como a histologia final foi de um tumor seropapilífero, a lesão foi considerada de corpo. (B) Peça de exenteração pévica mostrando um tumor invadindo o colo e a maior parte do corpo do útero. Esse caso foi classificado como de origem cervical, baseado nas características histológicas.

Fonte: (A) VARGAS et al. (2011); (B) ROSAI (2004).

Figura 1 - Dificuldades no diagnóstico diferencial por imagem e macroscopia.

Uma vez que a origem da neoplasia não possa ser determinada apenas pela topografia, essa diferenciação deve ser feita pela análise histológica, o que, no caso do CEC do colo, é relativamente simples, pois esse tipo de carcinoma é raríssimo no corpo do útero, correspondendo a menos de 0,5% dos casos. Já quando se trata de diferenciar um tumor uterino de um AC do colo uterino, essa interpretação é muito mais difícil, porque o AC cervical compartilha muitas características histológicas semelhantes ao AC do endométrio (HARMON e COOPER 2009).

O adenocarcinoma endometrióide é o tipo histológico mais comum nas neoplasias do corpo do útero e corresponde a cerca de 80% dos casos. Na verdade, o adenocarcinoma endometrióide uterino é uma denominação que compreende uma gama de neoplasias com diferentes tipos e graus de diferenciação. Dentro desse espectro, estão os adenocarcinomas endometrióides com diferenciação escamóide. Essa diferenciação pode estar presente, em algum grau, em até 50% dos casos. Esses tumores são chamados em geral de carcinomas adenoescamosos (AS). Esse tipo de diferenciação pode dar ao tumor do corpo do útero aspectos histológicos que o assemelham mais a tumores cervicais, como a formação de áreas de queratinização, por exemplo. Por outro lado, os ACs do colo do útero também podem apresentar diferenciações histológicas que o tornam mais parecidos com tumores do corpo do útero. Apesar de o tipo mucinoso ser o mais comum (60%), até 30% dos ACs cervicais têm diferenciação do tipo endometrióide (MATIAS-GUIU 2009).

Existem algumas características histológicas que podem ser usadas para diferenciar um AC cervical de um AC do endométrio. A presença de hiperplasia endometrial atípica na lesão é uma característica que favorece o diagnóstico de um tumor de origem endometrial, enquanto a presença de neoplasia intra-epitelial cervical (NIC) na lesão favorece a origem cervical da neoplasia (ALFSEN et al. 2000; ZAINO 2006). Em geral, essas características se mostram heterogêneas nas duas neoplasias e não são suficientes para estabelecer um diagnóstico diferencial preciso.

Para tentar ajudar no diagnóstico diferencial entre essas duas neoplasias estudos recentes têm utilizado marcadores imunoistoquímicos na tentativa de formar um painel que possa aumentar a acurácia nessa diferenciação.

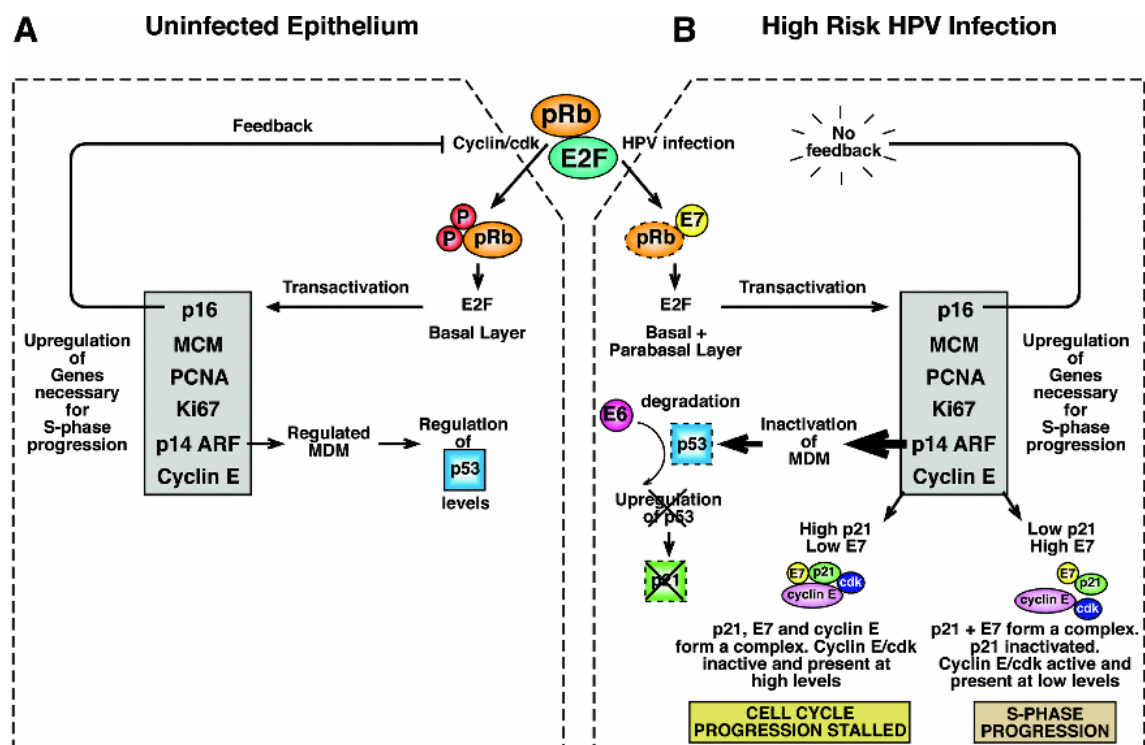
1.2 PAINEL DE MARCADORES IMUNOISTOQUÍMICOS

Quatro marcadores imunoistoquímicos têm sido utilizados pela maioria dos estudos para compor um painel ideal para a caracterização da origem dos ACs cervicais. Os primeiros estudos nessa área mostraram o valor do Antígeno Cárcino-Embrionário (CEA) e da Vimentina nesse cenário (DABBS et al. 1996), enquanto os estudos mais recentes mostraram também o valor do Receptor de Estrógeno (RE) e da proteína P16 (McCLUGGAGE et al. 2002; KAMOI et al. 2002; STAEBLER et al. 2002; ALKUSHI et al. 2003; ANSARI-LARI et al. 2004; YEMELYANOVA et al. 2009).

A Vimentina é o mais importante filamento intermediário das células mesenquimais e do tecido hematológico. Apesar disso, é muito expressa também em algumas células epiteliais de alguns tecidos como: renal, tireoideano, glandular salivar e endometrial. O CEA é parte da família de proteínas CD66e, estando presente nas células epiteliais, enquanto as outras proteínas da família estão presentes no tecido hematopoiético. Os marcadores imunoistoquímicos de CEA mais antigos eram pouco específicos e de pouca utilidade. Com o desenvolvimento de marcadores monoclonais mais modernos, esse marcador passou a ser utilizado principalmente para tumores gastrointestinais, de pulmão e medulares da tireoide. Apesar de menos reativo, é utilizado também em tumores de mama, de células transicionais e de colo uterino. Rotineiramente, o RE é um marcador utilizado para tumores de mama, a fim de diferenciar os tumores com crescimento relacionado ao hormônio e, dessa forma, selecionar as pacientes candidatas a tratamento com bloqueio hormonal. Mas esse marcador pode ser utilizado também para investigar a origem de certas neoplasias (principalmente metastáticas), uma vez que tumores mamários e endometriais podem expressar o marcador, enquanto tumores gastrointestinais, pulmonares e hepáticos não expressam (LAWRENCE e CHANG 2001).

A procura de DNA do HPV nos tumores de colo uterino pode ser feita de forma direta e específica por hibridização “in situ” ou reação de cadeia de polimerase (PCR). Mas esses métodos são, em geral, tecnicamente mais complicados e mais caros, de forma que um marcador imunoistoquímico que

possa mostrar indiretamente a presença de HPV é de grande valia. Recentemente a proteína P16 se mostrou válida para esse propósito, pois demonstrou relação significativa com a presença de DNA do HPV em diversos estudos (MILDE-LANGOSCH et al. 2001; SANO et al. 1998, 2002). O P16 é um produto do gene supressor de tumor CDKN2 (ou MST1) e está localizado no cromossomo 21. A P16 é uma inibidora de kinases ciclino-dependentes e desempenha um papel regulador do ciclo celular modulando o gene do retinoblastoma (pRB). A proteína E7, que está presente no HPV de alto risco, liga-se ao pRB inativando-o, o que resulta em um acúmulo de p16 e a sua super-expressão nesses casos (DYSON et al. 1989; KOH et al. 1995) (Figura 2).



Legenda: (A) No epitélio não infectado, a expressão das proteínas necessárias para o ciclo celular é controlada por pRB. Na presença de fatores de crescimento, Ciclina D/Cdk4/6 é ativada, o que leva à fosforilação do pRB e a liberação do fator E2F, o que causa a expressão das proteínas envolvidas na fase S do ciclo. P16 regula os níveis de Ciclina D/Cdk ativa na célula, promovendo um mecanismo de feedback que regula os níveis de MCM, PCNA e Ciclina E. (B) No epitélio infectado pelo HPV de alto risco, a divisão celular não necessita de estímulos externos e passa a ser induzida pela proteína E7, que se liga e degrada pRB e facilita a expressão de proteínas da fase S mediadas por E2F. Isso induz à expressão aumentada de P16 que tenta bloquear o ciclo, mas o feedback não funciona, pois a proliferação das células infectadas não depende da Ciclina D/Cdk4/6, causando então acúmulo de P16 na célula.

Fonte: DOORBAR (2006)

Figura 2 - Participação do P16 na infecção por HPV de alto risco.

A forma de avaliar a expressão do p16 pode influenciar significativamente a capacidade que o marcador tem de diferenciar os dois tipos de tumores. Trabalhos que comparam várias formas de interpretação do marcador mostraram que a melhor forma de avaliar esse marcador é a

1.3 FATORES PROGNÓSTICOS E TRATAMENTO

A grande controvérsia a respeito do AC do colo uterino é se ele tem comportamento clínico semelhante ao do CEC ou não. Em caso positivo, eles compartilhariam os mesmos fatores prognósticos e dividiriam as mesmas indicações terapêuticas, seja de tratamento primário ou adjuvante. Apesar de alguns estudos mostrarem que o tipo histológico não é um fator prognóstico relevante, nos tumores do colo do útero, muitos outros mostram o contrário. Uma análise mais aprofundada revela que a relação de cada tipo histológico com esses fatores é diferente, e que um diferente padrão de disseminação e recidiva torna o AC do colo uterino uma doença única. Considerando que os estudos relevantes que moldaram a terapêutica do câncer cervical contêm pouquíssimos pacientes com AC, a procura por fatores prognósticos específicos para estes é de suma importância.

A presença de metástases linfonodais é um dos fatores prognósticos mais importantes no CEC do colo uterino (TAKEDA et al. 2002), assim como no AC (TINGA et al. 1991). No AC, a sobrevida que chega a ser de 91% nos tumores com linfonodos negativos cai para 31% com linfonodos positivos (BAALBERGEN et al. 2004). IRIE et al. (2000), em um trabalho com dois grupos bem balanceados, mostraram que a prevalência de metástases linfonodais pode ser maior no AC. Nesse estudo, que incluiu apenas pacientes IB-IIB, a incidência de metástases no AC foi de 32% contra 15% no CEC. E não só a prevalência, mas também o prognóstico das pacientes com linfonodos positivos parece ser diferente entre os tipos histológicos. Nos

dois maiores estudos a esse respeito, IRIE et al. (2000) e NAKANISHI et al. (2000), mostraram que para pacientes com linfonodos acometidos a sobrevida no AC chega a ser de 20 a 30% pior.

Outro fator prognóstico de maior importância é o estadiamento clínico (EC). Assim como no CEC, no AC, conforme piora o EC, diminuem tanto a chance de controle da doença como a sobrevida global (EIFEL et al. 1990; BAALBERGEN et al. 2004). A diferença de sobrevida entre os tipos histológicos se torna nítida quando pareados por EC, principalmente nos ECs mais avançados (EIFEL et al. 1990; IRIE et al. 2000). No maior desses estudos, CHEN et al. avaliaram, em 1999, mais de 3 mil pacientes (sendo 300 AC) e mostraram que, apesar de significativa, a diferença de sobrevida entre os tipos foi de apenas 5% no ECI enquanto no ECII foi de 8% e no ECIII, de 13%.

Tamanho do tumor também é um fator importante. Em tumores menores que quatro centímetros, aparentemente não há diferença de prognóstico entre os dois tipos (MARCHIOLE et al. 2007). Já para os tumores maiores, os resultados são diferentes. EIFEL et al. (1995) compararam quase 2 mil pacientes (sendo 230 AC) tratados com radioterapia e demonstraram que nas pacientes com tumores maiores de 4 cm a sobrevida global foi de 73% para o CEC e 59% no AC.

O padrão de disseminação e recidiva do AC também pode variar muito do CEC em diversos estudos. Em um grande estudo de 2006, com mais de três mil casos de tumores de colo uterino IB-IIB tratados cirurgicamente, SHIMADA et al. (2006), mostraram que o envolvimento do

ovário pela doença é bem maior no AC. O CEC apresenta ovário comprometido em apenas 0,5% dos casos, enquanto no AC os ovários estão comprometidos em 5% dos casos. Essa diferença foi estatisticamente significativa e se manteve quando os casos foram agrupados por EC. É interessante notar ainda que a sobrevida desses dois grupos de pacientes foi bem diferente, talvez indicando que o mecanismo de envolvimento da doença possa ser diferente. Uma vez que a sobrevida nos casos de AC foi muito pior, é possível pensar que talvez, enquanto no CEC o acometimento do ovário foi por contiguidade, no AC foi por via hematológica.

O maior número de metástases hematogênicas é justamente a maior diferença no padrão de recorrências do AC. Alguns trabalhos mostram que a recorrência acontece primordialmente a distância, chegando a 92% do total (BEREK et al. 1985), enquanto outros trabalhos mostram um índice considerável de recidivas locais (e mais parecido com os do CEC), mas, mesmo assim, com um aumento significativo das falhas a distância. Em 1995, EIFEL et al. examinaram o padrão de 119 recidivas de tumores IB e mostraram que para tumores IB2, enquanto o número de recidivas pélvicas era similar (17% AC e 13% CEC; $p=0,16$), o número de recidivas a distância era bem maior no AC (37% AC e 21% CEC; $p<0,01$). Além da incidência de metástases a distância ser maior no AC, a mortalidade por doença metastática também é consideravelmente superior (GALLUP et al. 1985).

Apesar das diferenças nas relações com os fatores de risco e padrões de recidiva, nem todos os trabalhos na literatura mostram diferenças nos resultados do tratamento dos dois grupos. HOPKINS e MORLEY (1991),

EIFEL et al. (1995), CHEN et al. (1999) e IRIE et al. (2000) mostraram pior prognóstico para as pacientes com AC, enquanto GRIGSBY et al. (1988), KILGORE et al. (1998), GRISARU et al. (2001) e DAVY et al. (2003) não mostraram diferença significativa. E, em alguns estudos, como já foi demonstrado, essa diferença depende de alguns fatores com EC em SHINGLETON et al. (1995) e metástase linfonodal em NAKANISHI et al. (2000). A Tabela 2 resume os resultados desses principais estudos.

Tabela 2 - Estudos comparando o prognóstico de carcinomas espinocelulares e adenocarcinomas.

Estudo	Pacientes	Desfecho	CEC	AC	p
Grigsby et al. 1988	925 CEC 79 AC	SG 5 anos	68%	64,9%	0,34
Hopkins et al. 1991	756 CEC 203 AC	SG 5 anos	ECI: 90% ECII: 62% ECIII: 36%	60% 47% 8%	<0,001 0,01 0,002
Shingleton et al. 1995	9351 CE 1405 AC	SG 5 anos	ECI: 84,1% ECII: 67,4% ECIII: 39,8% ECIV: 13,1%	83,7% 56,8% 29,5% 5,3%	NS 0,03 NS NS
Eifel et al. 1995	1538 CEC 229 AC	SG 5 anos	81%	72%	0,01
Kilgore et al. 1998	162 CEC 162 AC	RR morte	1	0,58	0,08
Chen et al. 1999	3376 CEC 302 AC	SG 5 anos	74%	66,5%	0,0009
Nakanishi et al. 2000	405 CEC 104 AC	SG 5 anos	LND +: 83,6% LND -: 97,9	63,2% 93,2%	<0,001 0,067
Irie et al. 2000	198 CEC 57 AC	SG 5 anos	91,7%	77,9%	0,0034
Grisaru et al. 2001	544 CEC 254 AC	SG 5 anos	90%	90%	NS
Davy et al. 2003	544 CEC 136 AC	SG 5 anos	73,9%	73,8%	NS

SG = sobrevida global; CEC = carcinoma espinocelular; AC = adenocarcinoma; NS = valor de p referido no estudo com não significativo.

Outra grande controvérsia quanto ao AC cervical é se ele pode ser tratado como uma entidade única ou se os seus subtipos têm comportamentos clínicos diferentes, e então deveriam ser analisados separadamente. Existem muitas variantes histológicas do AC cervical, entre elas: mucinoso (60%); endometrióide (30%); seroso; mesonéfrico; viloglandular bem diferenciado; células claras e adenoescamoso (MATIAS-GUIU 2009).

Como visto anteriormente, existe, em algumas situações, uma grande dificuldade de se diferenciar um tumor de endométrio de um de colo uterino. Isso acontece essencialmente com os tipos mais comuns do AC cervical que são o mucinoso e o endometrióide (principalmente este). Os outros subtipos mencionados, como o adenoescamoso (AS) e o células claras, têm características mais específicas. O AC cervical de células claras apresenta um arranjo histológico com áreas sólidas, tubulocísticas e papilares entremeadas a células com citoplasma abundante e claro com núcleos hipercromáticos atípicos. Esse tipo de variante costuma acometer pacientes jovens e está associado à exposição ao Dietilestilbestrol intra-útero. O carcinoma adenoescamoso (AS) é um subtipo bastante particular que apresenta componente glandular e também componente escamoso presentes na mesma lesão, claramente identificados. Essa variante tem importância especial, pois vários estudos mostraram que ela pode ter prognóstico diferente dos demais tipos de AC (MATIAS-GUIU 2009).

Como podemos ver na Tabela 3, a maioria dos trabalhos mostra um pior prognóstico para o tumor AS quando comparado ao AC em geral.

FARLEY et al. (2003), compararam 185 pacientes com AC clássico com 88 pacientes com AS. Apesar de os grupos não serem bem balanceados e as pacientes com AS terem recebido mais radioterapia e quimioterapia, a sobrevida global foi de 65% nos AS contra 85% nos ACs. Quando analisados por estágio da doença, essa diferença foi significativa apenas nos estágios mais avançados, no ECI não houve diferença entre os grupos (89% x 86% $p=0,64$). GRISARU et al. (2001), em uma análise semelhante com 255 AC e 81 AS mostraram sobrevida global de 90% x 81% respectivamente ($p = 0,03$). Mas, novamente, os grupos não foram homogêneos, tendo as pacientes com tumores AS: maior profundidade de invasão (5,5mm x 3,7mm), mais invasão vascular linfática (57% x 24%), grau mais avançado (78% G2-3 x 40% G2-3) e mais metástases linfonodais (8% x 4%). KILGORE et al. (1988) e DAVY et al. (2003), mostraram também uma pior sobrevida para os tumores ASs quando comparados aos ACs. Interessantemente esses trabalhos não mostraram diferença significativa entre a sobrevida de CEC e AC quando se excluíram dessa comparação os AS. ALFSEN et al. (2001), em um grande estudo com 505 casos, compararam 417 tumores com variantes clássicas de AC (principalmente endocervical e endometrióide) com 88 de histologias com padrão de diferenciação distinto (principalmente AS, células claras e indiferenciado). Não houve diferença de sobrevida entre os ACs clássicos e o grupo de tumores de outras histologias (incluindo os 36 ASs), com exceção do tipo células claras.

Tabela 3 - Estudos comparando o prognóstico de adenocarcinomas clássicos e suas variantes.

Estudo	Pacientes	Desfecho	Resultado
Alfsen et al.	417 AC 88 outros	SG 5 anos	EC I: AC 71% x 55-93% outros tipos (p=NS) ECII-IV: AC 27% x 9-50% outros tipos* (p=NS)
Kilgore et al.	NR	RR morte	1 CEC x 0,58 AC x 1,6 AS (p=0,06)
Grisaru et al.	255 AC 81 AS	SG 5 anos	AC 90% x 81% AS (p=0,03)
Davy et al.	136 AC 48 AS	SG 5 anos	AC 73,8% x 64,8% AS (p=0,001)
Farley et al.	185 AC 88 AS	SG 5 anos	EC I: AC 89% x 86 AS (p=0,64) EC II-IV: AC 80% x 38% AS (p=0,01)

*Exceto células claras

Analizados em conjunto, esses dados indicam que talvez os estudos que investigam o prognóstico dos AC cervicais tenham resultados conflitantes porque estudam um conjunto de neoplasias diferentes. Esses estudos podem conter quantidades diferentes de tumores endometriais que foram confundidos com tumores cervicais e quantidades diferentes de alguns subtipos histológicos que podem ter agressividades e padrões de disseminação diferentes. Uma conclusão definitiva fica ainda mais difícil quando consideramos que o AC de colo uterino tem seu tratamento baseado, principalmente, em estudos com maioria de tumores CEC e pouca quantidade de estudos randomizados para decidir qual o melhor tratamento para esses tumores.

Existem apenas três trabalhos randomizados sobre o tratamento dos tumores de colo uterino que analisaram separadamente o resultado no AC. Desses, apenas um se refere ao tratamento inicial, tendo os outros dois

analisado indicações de tratamento adjuvante. LANDONI et al. (1997), randomizaram 469 mulheres com tumores de colo uterino IB-IIA para tratamento cirúrgico ou radioterapia exclusiva. Não houve diferença significativa na distribuição dos fatores prognósticos entre os dois grupos e as indicações de radioterapia complementar para as pacientes operadas foram: EC T2B ou maior; menos de 3mm de estroma cervical sem doença; rompimento do tumor durante a cirurgia ou linfonodos comprometidos. A sobrevida livre de doença e a sobrevida global nos dois grupos foram exatamente iguais (74% e 83% em 5 anos, respectivamente). Já quando analisados quanto ao tipo histológico, os ACs submetidos a tratamento cirúrgico tiveram melhor sobrevida global (70% x 59%, $p = 0,05$) e melhor sobrevida livre de doença (66% x 47%, $p = 0,02$) quando comparados com os ACs tratados com radioterapia. O estudo não informa quantas pacientes com AC se submeteram a radioterapia adjuvante, por isso não é possível identificar se o tratamento ideal dos ACs cervicais é apenas cirúrgico ou deve consistir de cirurgia mais radioterapia adjuvante, e esse estudo também não demonstra em que casos a radioterapia deve ser indicada.

Outro estudo randomizado analisou justamente a indicação de radioterapia adjuvante nos ACs cervicais. ROTMAN et al. em uma atualização publicada em 2006, apresenta um estudo com 277 pacientes com tumores cervicais EC IB sem linfonodos envolvidos randomizados para tratamento cirúrgico e observação ou tratamento cirúrgico mais radioterapia adjuvante. Para participar desse estudo, as pacientes precisavam apresentar ao menos 2 de 3 desses fatores de risco: mais de um terço de invasão do

estroma cervical; tumor maior que 4 cm; ou invasão vascular linfática. Os grupos foram homogêneos quanto às variáveis prognósticas, inclusive a distribuição de AC (24,8% x 19,7%, $p = \text{NS}$). Na análise geral, o tratamento com radioterapia adjuvante diminuiu, em quase 50%, o índice de recidivas. Na análise por tipo histológico, tanto os ACs quanto os ASs tiveram menor índice de recidiva quando submetidos a tratamento com radioterapia adjuvante. A recorrência nos ACs foi de 0% para os tratados com radioterapia adjuvante contra 36,4% para os que não receberam tratamento adjuvante. Da mesma forma, para os ASs a recorrência foi de 16,7% x 50% (em nenhum dos dois casos o estudo fornece o valor de p). Essa diferença foi maior que a diferença encontrada para o CEC. O Hazard-ratio do efeito da radioterapia nos ACs e ASs comparados ao do CEC foi de 0,29 com $p = 0,019$.

PETERS et al. (2000), avaliaram também a indicação de quimioterapia adjuvante em pacientes com tumores de colo uterino operadas e com padrão de doença mais avançada. Nesse estudo, 268 mulheres com EC IA2, IB e IIA e com resultado patológico, mostrando linfonodos acometidos, margem positiva ou envolvimento microscópico dos paramétrios foram randomizadas entre tratamento adjuvante apenas com radioterapia ou com radioterapia mais quimioterapia adjuvante. Quando analisados apenas os casos tratados com radioterapia adjuvante, a curva de sobrevida global das pacientes com AC é sensivelmente inferior à das pacientes com CEC (apesar de o estudo não fornecer o valor de p). Essa diferença desaparece quando analisamos as curvas das pacientes com AC e CEC que foram

submetidas ao tratamento combinado com rádio e quimioterapia. Apesar disso, quando aplicados ao modelo de Cox, a influência do tratamento adjuvante combinado não atingiu diferença significativa de sobrevida global nos ACs ($p = 0,19$).

Como visto, o tratamento ideal para o AC cervical ainda é pouco estudado e carece de mais trabalhos com maior nível de evidência. Apesar de, ao menos, uma evidência nível I apontar para um tratamento preferencial com cirurgia nos casos iniciais, não existe nenhum estudo randomizado avaliando o tratamento inicial de tumores mais avançados. Quanto ao tratamento adjuvante, apesar de um estudo demonstrar o valor significativo da radioterapia adjuvante, temos de considerar que o índice de recidiva observado nas pacientes com AC foi consideravelmente maior que nas com CEC, o que nos faz pensar que a indicação de radioterapia adjuvante nos ACs possa ser ainda mais abrangente que a utilizada nesse estudo. E, por fim, o único trabalho randomizado avaliando o papel da quimioterapia adjuvante não atingiu nível de significância.

Finalmente, considerando que não há concordância entre os estudos sobre se o AC cervical tem ou não prognóstico diferente do CEC e, não existindo dados suficientes na literatura para orientar de forma definitiva o melhor caminho terapêutico para essa neoplasia, realizamos o presente estudo para investigar se um painel de marcadores imunoistoquímicos utilizados rotineiramente para análise dos casos duvidosos pode também fornecer informações úteis sobre o prognóstico dessas neoplasias.

2 OBJETIVOS

O objetivo principal do estudo é investigar se o painel imunoistoquímico com 4 marcadores utilizado rotineiramente para diagnóstico diferencial em casos de adenocarcinoma de origem duvidosa pode ser utilizado também para análise prognóstica em termos de sobrevida global, sobrevida livre de doença e controle local.

Os objetivos secundários do estudo são analisar se a expressão individual de cada um dos quatro marcadores tem alguma relevância prognóstica.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

O estudo incluiu casos de adenocarcinoma de colo uterino tratados no Hospital A.C. Camargo de 1980 até 2008. Os casos foram buscados em registro de pacientes tratados no departamento de radioterapia e no departamento de cirurgia ginecológica. Foram levantados 106 casos junto ao departamento de radioterapia. Desses, 51 casos eram de pacientes encaminhadas de outros hospitais para o A. C. Camargo para realizar apenas a radioterapia. Após a radioterapia, essas pacientes continuam o tratamento e acompanhamento fora e, por isso, não têm nenhum registro de seguimento disponível. Além dessas, outras 12 pacientes tratadas integralmente no A.C. Camargo foram excluídas por falta de dados essenciais disponíveis nos prontuários. Das pacientes levantados junto à radioterapia, 43 foram selecionadas, das quais apenas 10 fizeram radioterapia exclusiva, tendo as outras 33 realizado radioterapia adjuvante.

Pelo departamento de cirurgia ginecológica foram identificados mais 117 casos. Essa lista de pacientes incluía todas as 33 pacientes que fizeram cirurgia e radioterapia adjuvante previamente identificadas junto à lista de pacientes da radioterapia. Portanto, a lista final de pacientes contou com os 117 casos de pacientes operadas, mais os 10 casos de pacientes que realizaram radioterapia exclusiva, totalizando 127 casos.

Foi realizada então uma busca por material armazenado no departamento de anatomia patológica e, dos 127 casos, 33 foram excluídos

do trabalho por falta de material disponível. Foram, então, realizados os testes imunoistoquímicos por meio do TMA em 94 casos.

A intenção do trabalho era analisar a influência dos marcadores e grupos de imunoistoquímica no prognóstico das pacientes em geral. Infelizmente, apenas 3 pacientes que realizaram radioterapia exclusiva tinham material para realizar o TMA. Decidimos, assim, fazer uma análise apenas da influência dos marcadores nas pacientes tratadas com cirurgia, com ou sem radioterapia adjuvante. Logo, o grupo final de estudo foi de 91 casos.

Esse estudo foi aprovado em 06/10/2009 pelo Comitê de Ética e pesquisa do Hospital AC Camargo / Fundação Antônio Prudente, com número 1311/09.

3.1 CONSTRUÇÃO E INTERPRETAÇÃO DO TMA

Foram obtidos cilindros de 1,0 mm de área dos blocos de parafina contendo o tumor, cuja área foi identificada pela análise das lâminas realizadas para a rotina dos casos. Os cilindros foram montados em duplicata em um novo bloco de parafina com posições bidimensionais separados por espaços de 0,2 mm. Esses espaços são previamente determinados e marcados no bloco pelo próprio equipamento. Esses novos blocos de parafina do TMA são submetidos a cortes histológicos em diferentes níveis, separados entre si por 125 μ m de distância. Os cortes são realizados por meio de um micrótomo manual e são transferidos em fita

adesiva para lâminas especiais que também são adesivas. É possível retirar a fita adesiva sem retirar o material da lâmina com a técnica de exposição do conjunto à luz ultravioleta. Por fim, as lâminas são cobertas por parafina, embaladas a vácuo e congeladas a -20°C. As reações foram realizadas em duas lâminas dos blocos de TMA com níveis de profundidades diferentes de, pelo menos, 20 cortes de diferença. Essa estratégia garante a observação de áreas distintas da neoplasia.

As reações foram acompanhadas de controles positivos, em tecidos sabidamente positivos para os anticorpos testados, e controles negativos nos quais o anticorpo primário foi substituído por imunoglobulina de mesma origem. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico comum. Os anticorpos pesquisados, clones, origens, diluições e os respectivos padrões de marcação considerados podem ser vistos na Tabela 4.

As lâminas de imunoistoquímica foram interpretadas de acordo com critérios previamente descritos em literatura (ALKUSHI et al. 2003), sendo considerados positivos os casos exibindo marcação marrom no núcleo ou citoplasma das células tumorais em mais de 5%.

Tabela 4 - Características dos anticorpos utilizados.

Anticorpos	Clone	Origem	Diluição	Controle	Padrão de Expressão
RE	SP1	Dako	Pronto para uso	Tumor de mama	Nuclear
CEA	IL7	Dako	1:250	Tumor de mama	Citoplasmático
Vimentina	V9	Dako	1:1500	Leiomioma	Citoplasmático
P16	16PO7	Neomarkers	1:400	Carcinoma de colo uterino	Nuclear

3.2 FORMAÇÃO DOS GRUPOS ATRAVÉS DOS MARCADORES IMUNOISTOQUÍMICOS

Foram classificadas, no grupo chamado “Origem Endocervical”, todas as pacientes que obtiveram como resultado dos marcadores CEA e P16 positivo, Vimentina e RE negativo. Inversamente, foram classificadas, no grupo chamado “Origem Endometrial”, as pacientes que obtiveram como resultados Vimentina e RE positivos, CEA e P16 negativos. Todos os outros casos, que obtiveram qualquer das outras combinações possíveis, foram classificados como pertencentes a um grupo chamado “Indeterminado”. As combinações mais frequentes que levaram os casos a serem classificados no grupo Indeterminado foram casos com tanto P16 quanto RE positivos e casos em que todos os marcadores foram negativos.

3.3 DEFINIÇÃO DAS SOBREVIDAS

A sobrevida global foi caracterizada como o tempo decorrido do início do tratamento (cirurgia ou radioterapia) até o óbito (evento) ou a data da última informação (censura). A sobrevida câncer específica foi caracterizada como o tempo até o óbito classificado como morte pelo câncer (evento) ou a data da última informação (censura). O controle local foi caracterizado como o tempo até a recaída local (evento) ou a data da última informação (censura). Nesse caso, a recidiva local foi caracterizada como qualquer recorrência de doença dentro do campo de tratamento pélvico convencional da radioterapia. A sobrevida livre de metástases foi o tempo até a ocorrência de doença fora do campo clássico de radioterapia pélvica (evento) ou até a última informação (censura). A sobrevida livre de doença foi o tempo até o aparecimento de doença em qualquer localização (evento) ou até a última informação (censura). Nesse estudo, nenhuma paciente deixou de obter resposta completa ao tratamento, por isso, não temos nenhum caso de doença persistente.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a comparação da distribuição das variáveis clínicas entre os três grupos do estudo, foi utilizada uma combinação de testes estatísticos. Para analisar a diferença entre médias foi utilizado o teste de ANOVA, quando os dados obtiveram distribuição normal e respeitaram a

homogeneidade de variância. As médias que não respeitaram esses pré-requisitos foram analisadas pelos testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. A comparação entre percentuais foi analisada com o teste do Qui-Quadrado sempre que seus pré-requisitos foram atingidos. Nos casos em que não foi possível utilizar o teste do Qui-Quadrado foi utilizado o teste exato de Fisher. Foi utilizado também o teste de McNemar-Bowker, nas tabelas três por três. Para as curvas de sobrevida, foi utilizado o método de Kaplan-Meier e para comparação das sobrevidas entre os diferentes grupos foi utilizado o método de Log-Rank. O critério de determinação de significância foi o nível de 5%. O software utilizado foi o SPSS 14.0.

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO

O grupo final de estudo foi de 91 casos. A idade mediana foi de 52 anos, com média de 54,3 (variando de 18 a 91 anos). Quanto às características descritivas da população, temos: 51,7% tinham doença acometendo também o corpo do útero; 13,2% tinham doença acometendo o paramétrio; 46,7% tinham tumor maior que 4cm (Bulky); 14,4% tinham acometimento da vagina pela doença; 35,6% tinham invasão vascular linfática ou invasão peri-neural. Em relação ao estadiamento clínico, 72,5% eram do estágio IB, 15,4% do estágio IIA e 12,1% do estágio IIB. Das 84 pacientes submetidas a esvaziamento linfonodal, 16 (19%) tinham linfonodos acometidos. A mediana de linfonodos dissecados foi de 20 (1-91), a média e mediana de linfonodos acometidos foi de 3,7 e 2 respectivamente (1-12).

Quanto ao tratamento realizado, setenta e nove pacientes foram submetidas a histerectomia grau 3 (Wertheim-Meigs), nove a histerectomia grau 2 e três pacientes a histerectomia grau 1. Vinte e quatro pacientes foram submetidas a tratamento com cirurgia exclusiva, 64 pacientes a cirurgia mais tratamento adjuvante e 3 pacientes com radioterapia neoadjuvante, seguida de cirurgia. Das pacientes que realizaram tratamento adjuvante, 57 fizeram teleterapia e braquiterapia e 7 apenas com

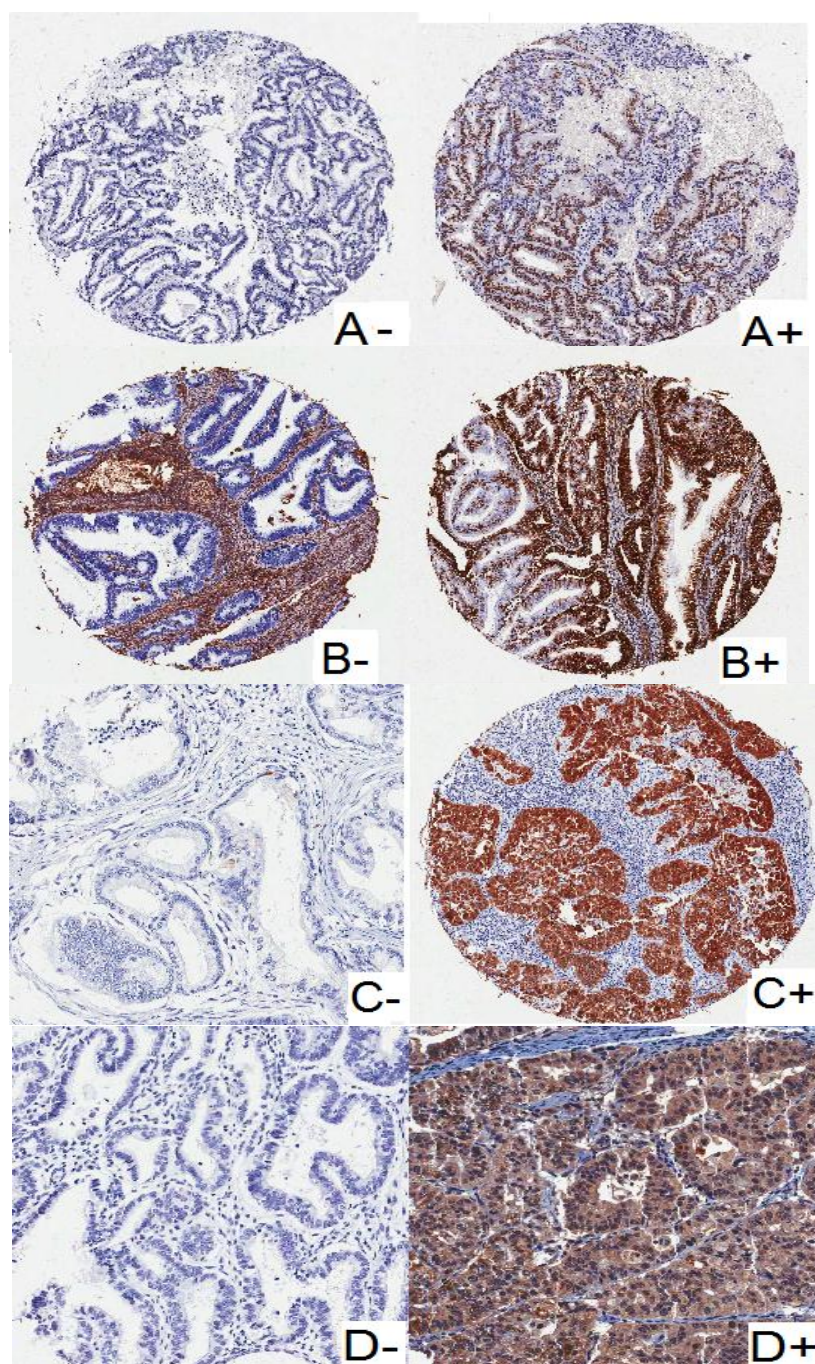
braquiterapia. Cinco pacientes fizeram tratamento também com quimioterapia.

A dose média e mediana de teleterapia foi de 45 Gy (29 Gy-54 Gy). A dose média de braquiterapia foi de 22 Gy, com mediana de 24 Gy (10 Gy-30 Gy). O tempo de duração do tratamento com teleterapia teve média de 45,8 dias e mediana de 43 dias (11-96 dias). O tempo de duração da braquiterapia teve média de 21,8 dias e mediana de 21 dias (7-70). O tempo total de duração do tratamento adjuvante teve média de 58,6 dias e mediana de 63 dias (7-124 dias). Todas as 5 pacientes que realizaram quimioterapia o fizeram de forma concomitante com a teleterapia. A droga utilizada em todos os casos foi a cisplatina.

Seis pacientes desenvolveram recidiva local isolada, treze desenvolveram metástase a distância isolada e duas tiveram tanto recidiva local como a distância. Aconteceram 15 óbitos pela doença e 7 óbitos por outras causas. Duas pacientes estavam vivas com doença ao final do seguimento. O seguimento médio foi de 83,6 meses e o mediano de 62 meses. O seguimento variou de um mínimo de 2 meses a um máximo de 267 meses. A sobrevida global em 2 anos foi de 86% e em 5 anos 79%. O controle local em 2 anos foi de 92% e em 5 anos, de 89%. A sobrevida livre de metástases em 2 anos foi de 88% e em 5 anos de 80%. Para a sobrevida livre de doença, a sobrevida em 2 e 5 anos foi de 83% e 75% respectivamente.

4.2 EXPRESSÃO DOS MARCADORES E FORMAÇÃO DOS GRUPOS

A análise dos dados referentes aos marcadores imunoistoquímicos mostrou que 38,5% dos casos foram positivos para CEA; 48,4% foram positivos para Vimentina; 29,6% foram positivos para RE e 62,6% foram positivos para P16. Na figura 3, vemos imagens selecionadas do resultado do TMA para cada marcador, quando negativo e quando positivo.



Legenda: As fotos à esquerda são dos casos negativos (-) e as fotos a direita são dos casos positivos (+): (A) = RE; (B) = Vimentina; (C) = P16; (D) = CEA.

Figura 3 - Casos positivos e negativos da expressão de cada marcador.

Na combinação dos marcadores para a formação dos grupos, 30,8% dos casos foram classificados no grupo Indeterminado; 45,1% dos casos no grupo Origem Endocervical e 24,2% classificados como pertencentes ao grupo Origem Endometrial.

Houve uma diferença estatisticamente significativa na distribuição de algumas variáveis entre os três grupos. A idade das pacientes do grupo Origem Endometrial foi maior (62 anos x 54 e 50 anos, $p = 0,013$). O grupo Origem Endocervical teve menos casos com IVL ou IPN (19% x 50% e 47%, $p = 0,014$). Quanto ao grau histológico, 5% das pacientes do grupo Origem Endometrial ; 9,4% das pacientes do grupo Origem Endocervical e 18,5% das pacientes do grupo Indeterminado eram grau 3 ($p = 0,026$). O grupo Origem Endometrial mostrou uma maior proporção de pacientes com estadiamento mais avançado; 18,2% destas pacientes eram do EC IIB contra 9,8% e 10,7% do grupo Origem Endocervical e Indeterminado respectivamente ($p=0,016$). Outras características como: Infiltração de útero ($p = 0,178$); infiltração de vagina ($p=0,085$); tumor Bulky ($p = 0,118$); número de linfonodos dissecados ($p = 0,467$); número de linfonodos acometidos ($p = 0,101$); número de casos com linfonodos acometidos ($p = 0,069$); casos que fizeram teleterapia ($p = 0,853$); casos que fizeram braquiterapia ($p = 0,99$); casos que fizeram quimioterapia ($p = 0,252$); dose de teleterapia ($p = 0,866$); dose de braquiterapia ($p = 0,137$); e tempo total da radioterapia ($p = 0,767$) não obtiveram diferença estatisticamente significativa. As características de cada um dos três grupos está demonstrada na Tabela 4.

Tabela 4 - Características dos grupos

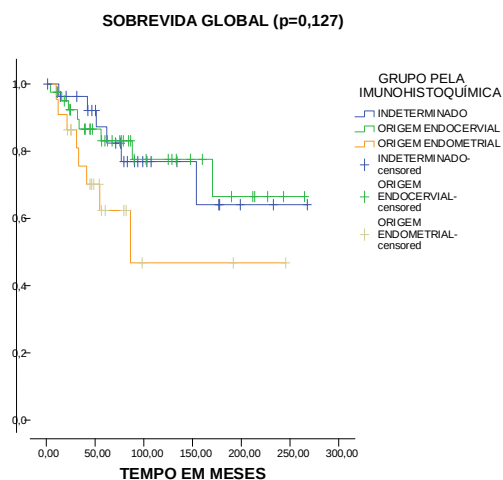
	Indeterminado	Endocervical	Endometrial	p
Casos	30,8%	45,1%	24,2%	
Idade (anos)	54,7	50,4	62,5	0,013
Infiltração do útero	50%	43,6%	68,2%	0,178
Infiltração da vagina	3,6%	22,9%	13,6%	0,085
Tumor Bulky	65,2%	38,7%	38,1%	0,118
IVL ou IPN	50%	19,5%	47,6%	0,014
Grau Histológico				
I	37%	68,8%	35%	0,026
II	44,4%	21,9%	60%	
III	18,5%	9,4%	5%	
Estadiamento				
IB	89,3%	63,4%	68,2%	0,016
IIA	0%	26,8%	13,6%	
IIB	10,7%	9,8%	18,2%	
Nº de LND dissecados	19,1	25,87	29,15	0,467
Nº de LND acometidos	1	4,4	3,8	0,101
Casos com LND acometidos	7,7%	18,4%	35%	0,069
Teleterapia	60,7%	61%	68,2%	0,853
Dose de Teleterapia (Gy)	45,3	44,9	45	0,866
Braquiterapia	71,4%	73,2%	72,7%	1
Dose de Braquiterapia (Gy)	23,7	22,5	24	0,137
Quimioterapia	0%	7,3%	9,1%	0,252
Tempo total da radioterapia (dias)	54	58	69	0,767

IVL = invasão vascular linfática; IPN = invasão peri-neural; Gy = Gray. Todos os dados com números absolutos correspondem a médias.

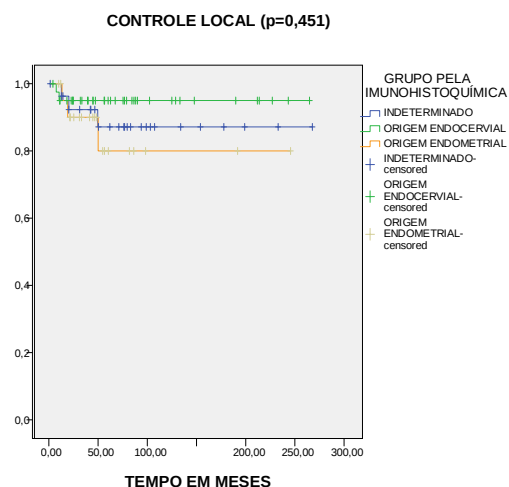
4.3 ANÁLISES DE SOBREVIDA

A Figura 4A mostra o gráfico de sobrevida global dos três grupos. A sobrevida global em 5 anos foi de 87% no grupo Indeterminado; 83% no grupo Origem Endocervical e 62% no grupo Origem Endometrial, mas essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p = 0,127$). O controle local em 5 anos foi de 87% no grupo Indeterminado; 95% no grupo Origem Endocervical e 80% no grupo Origem Endometrial, cujos dados estão na curva da figura 4B ($p = 0,451$). Na sobrevida livre de metástases em 5 anos, o grupo Indeterminado obteve 87%; o grupo Origem Endocervical 88% e o grupo Origem Endometrial 77%. A sobrevida livre de doença em 5 anos foi: 74% no grupo Indeterminado; 85% no grupo Origem Endocervical e 60% no grupo Origem Endometrial. Os dados de sobrevida livre de metástases e livre de doença estão expostos nas figuras 4C e 4D. Nos dois casos, não houve diferença estatisticamente significativa (SLM $p = 0,397$ e SLD $p = 0,159$).

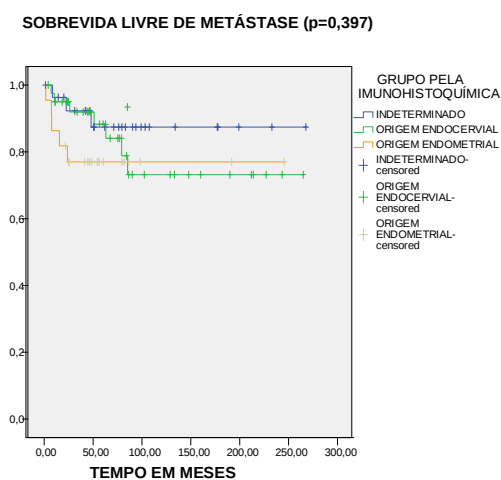
(A)



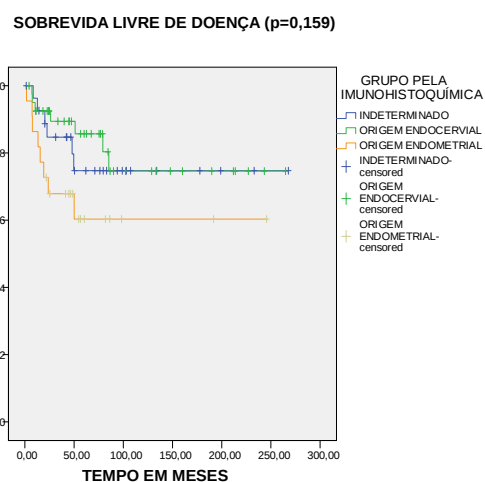
(B)



(C)



(D)

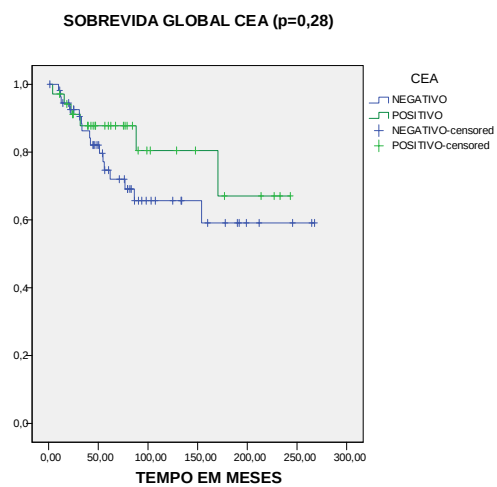


Legenda: (A) Sobrevida Global; (B) Controle local; (C) Sobrevida livre de metástases; (D) sobrevida livre de Doença.

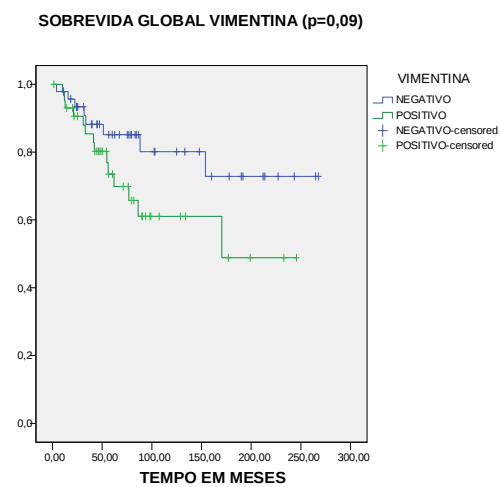
Figura 4 - Comparação dos grupos com várias curvas de sobrevida.

Foram realizadas também análises de sobrevida para cada um dos marcadores. A sobrevida global das pacientes com CEA positivo, comparada com a das pacientes com CEA negativo, foi de: 87% x 74% em 5 anos ($p = 0,28$). Comparando Vimentina positiva com negativa temos: 73% x 85% em 5 anos ($p = 0,09$). Comparando RE positivo com negativo temos: 92 x 77% em 5 anos ($p = 0,497$). E, finalmente, comparando a sobrevida das pacientes com P16 positiva à das pacientes com o marcador negativo, temos: 82% x 74% em 5 anos ($p = 0,559$). Essas curvas são mostradas na Figura 5.

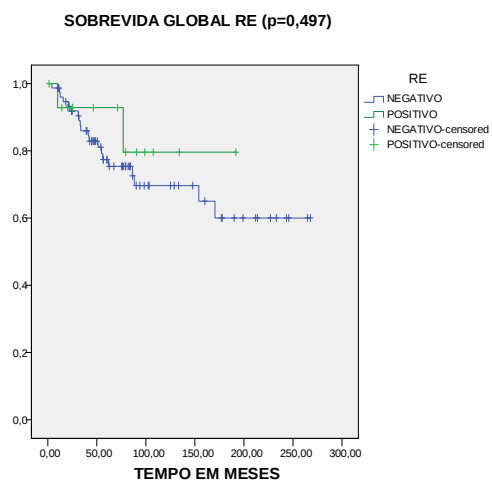
(A)



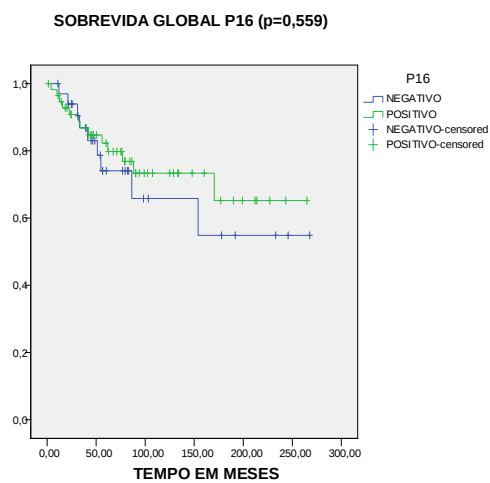
(B)



(C)



(D)



Legenda: (A) CEA; (B) Vimentina; (C) RE; (D) p16.

Figura 5 - Curvas de sobrevida global para cada marcador.

Também não houve relação significativa dos marcadores quanto ao controle local ou quanto à sobrevida livre de metástases, mas foi demonstrada uma relação estatisticamente significativa entre a Vimentina e a sobrevida livre de doença (Figura 6). Os casos negativos para o marcador tiveram sobrevida livre de doença em 5 anos de 87%, enquanto os casos com o marcador positivo tiveram sobrevida livre de doença em 5 anos de 63% ($p = 0,045$).

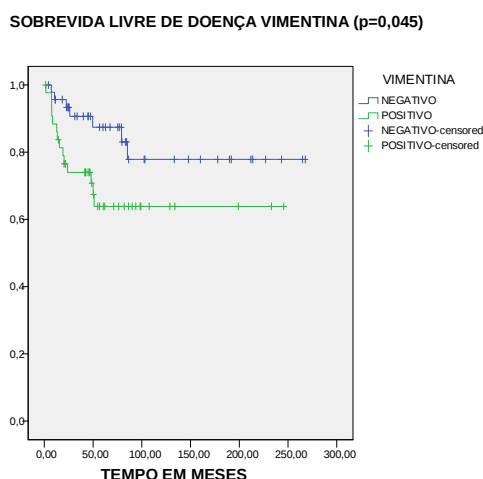
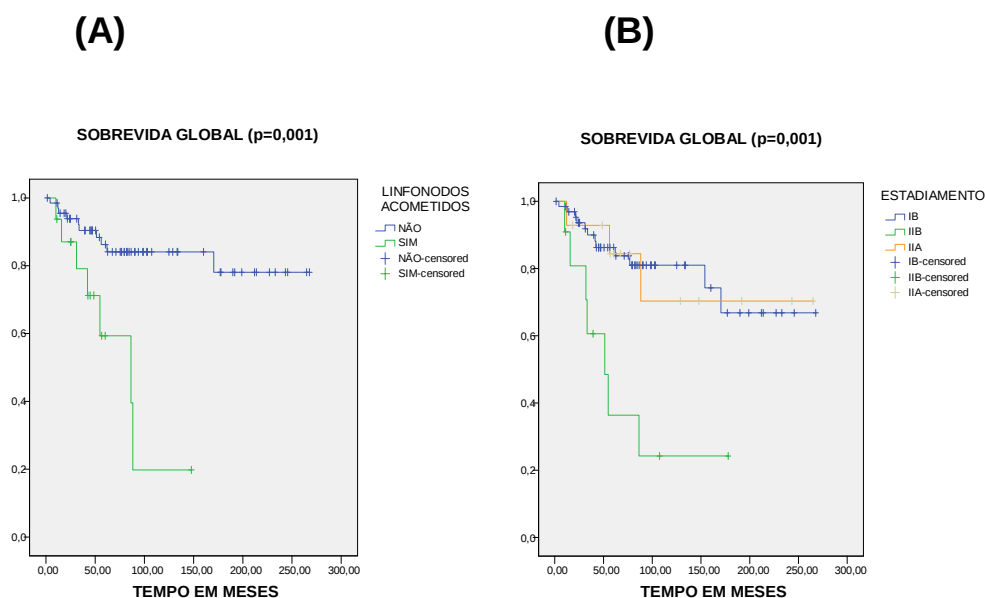


Figura 6 - Curva de sobrevida livre de doença para a Vimentina.

A investigação de como as características clínicas influenciaram a sobrevida global mostrou que tamanho do tumor ($p = 0,908$), infiltração de útero ($p = 0,107$), acometimento de vagina ($p = 0,268$), grau histológico ($p = 0,490$), IPN ou IVL ($p = 0,648$) e quimioterapia ($p=0,79$) não tiveram influência no resultado. Já pacientes submetidas à teleterapia ($p = 0,004$) e braquiterapia ($p = 0,008$) tiveram pior sobrevida global, o que geralmente é esperado, uma vez que as pacientes que têm indicação de tratamento adjuvante tendem a ter doença mais avançada.

As Figuras 7A e 7B mostram que a sobrevida global variou significativamente de acordo com o estadiamento e o acometimento linfonodal. A sobrevida global em 5 anos foi de 86% para os casos sem acometimento linfonodal, contra 59% para as pacientes com linfonodos acometidos ($p = 0,001$). A sobrevida global em 5 anos para as pacientes do EC IIB foi de 36%, já a das pacientes com EC mais iniciais foi de, no mínimo, 84% em 5 anos ($p = 0,001$).



Legenda: (A) Linfonodos acometidos; (B) Estadiamento clínico

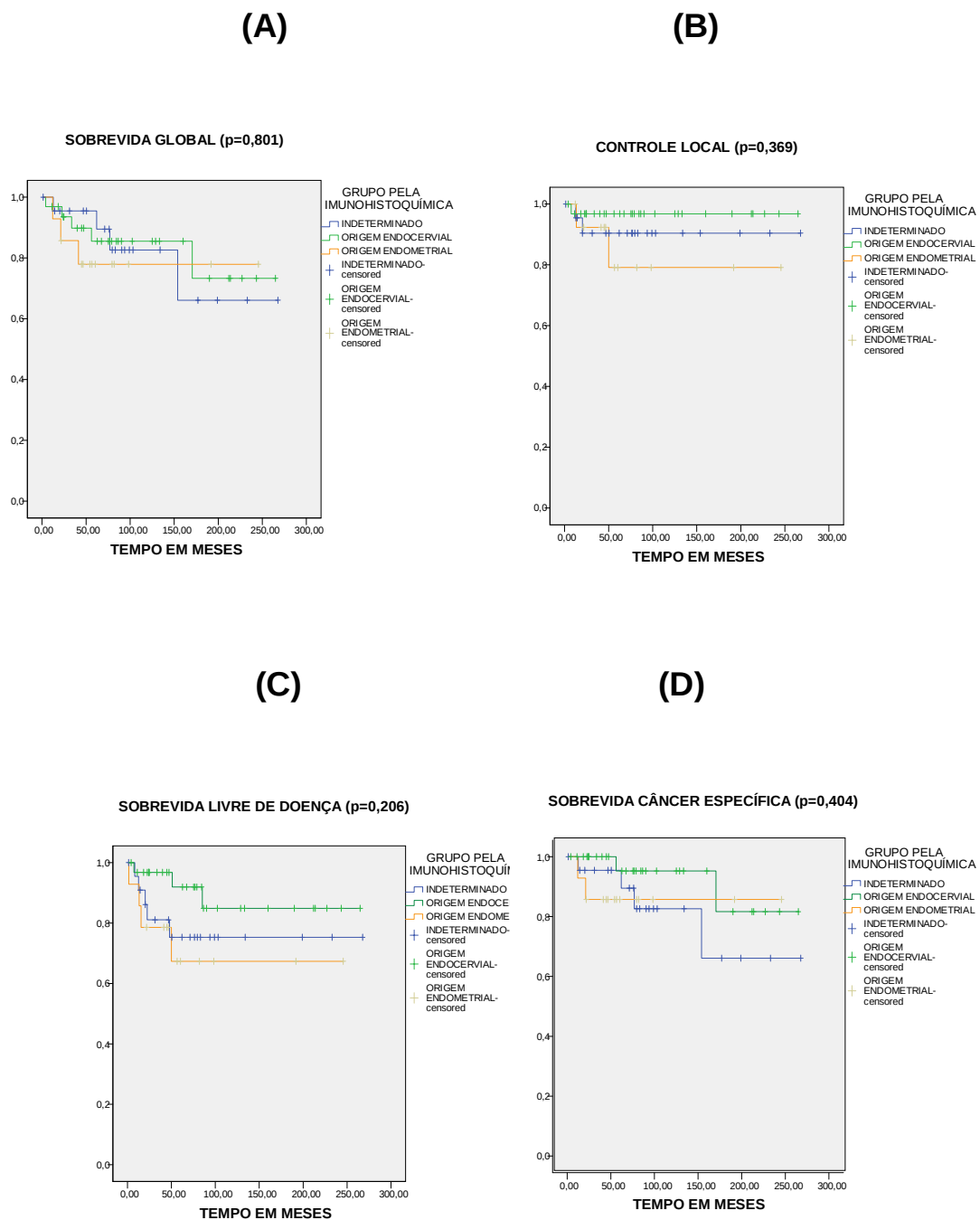
Figura 7 - Curvas de sobrevida global por acometimento linfonodal e EC

Considerando que o EC e o acometimento linfonodal tiveram grande influência na sobrevida e que houve uma heterogeneidade de distribuição desses fatores entre os grupos de imunoistoquímica, decidimos fazer uma análise parcial dos dados, excluindo as pacientes com acometimento linfonodal e EC IIB.

4.4 ANÁLISES DE SOBREVIDA PARA UM SUBGRUPO ESPECÍFICO

Excluindo então as pacientes com linfonodos acometidos e os com EC IIB, obtivemos um novo grupo de 69 pacientes. Esse novo grupo foi bastante homogêneo e continham apenas pacientes com EC IB e IIA sem linfonodos acometidos. Chamamos esse grupo de IB/IIA-LND. Uma nova análise da distribuição dos dados clínicos entre os grupos nessa nova população demonstrou que não houve heterogeneidade na distribuição dos dados entre os grupos, com exceção da IPN ou ILV, que foi mais comum no grupo Indeterminado (55%) do que nos outros grupos (20% e 25%) ($p = 0,013$).

As novas análises de sobrevida, considerando essa população menor e mais homogênea, também não mostraram diferença significativa de sobrevida global ($p = 0,801$), controle local ($p = 0,369$), sobrevida livre de doença ($p = 0,206$) ou sobrevida câncer específica ($p = 0,404$) entre os grupos de imunoistoquímica. Esses dados são mostrados na Figura 8.



Legenda: (A) Sobrevida global; (B) Controle Local; (C) Sobrevida livre de doença; (D) Sobrevida câncer específica.

Figura 8 - Curvas de sobrevida no grupo IB/IIA-LND

Dessa vez, considerando apenas o subgrupo IB/IIA-LND, a Vimentina se mostrou significativamente relacionada com o prognóstico em diversos desfechos. Foi realizada então uma análise da distribuição das características clínicas entre o grupo IB/IIA-LND com Vimentina positiva e negativa. Houve significância estatística apenas na idade média, tendo as paciente do grupo com o marcador positivo 65 contra 53 anos. ($p = 0,021$). Os dados estão na tabela 5.

Tabela 5 - Características dos grupos Vimentina - e Vimentina +
(no subgrupo IB/IIA-LND)

Vimentina	Negativo	Positivo	p
Casos	50,6%	49,3%	
Idade (anos)	53,3	65	0,021
Infiltração do útero	30,3%	52,8%	0,06
Infiltração da vagina	11,8%	5,9%	0,673
Tumor Bulky	37,5%	41,1%	0,568
IVL ou IPN	22,9%	36,4%	0,222
Grau Histológico			
I	63,3%	40%	0,69
II	33,3%	40%	
III	3,3%	20%	
Estadiamento			
IB	82,9%	91,2%	0,477
IIA	17,1%	8,8%	
Teleterapia	45,7%	58,8%	0,276
Dose de Teleterapia (Gy)	45	45	1
Braquiterapia	60%	67,6%	0,618
Dose de Braquiterapia (Gy)	23,2	23,7	0,536
Quimioterapia	0	2,9%	0,493
Tempo total da radioterapia (dias)	52	40	0,407

Em relação ao controle local, 85% das pacientes com o marcador positivo tiveram controle local em 5 anos, contra 100% das que tiveram marcador negativo ($p = 0,018$). CEA ($p = 0,848$), RE ($p = 0,08$) e P16 ($p = 0,517$) não obtiveram relação significativa. Os dados estão na Figura 9.

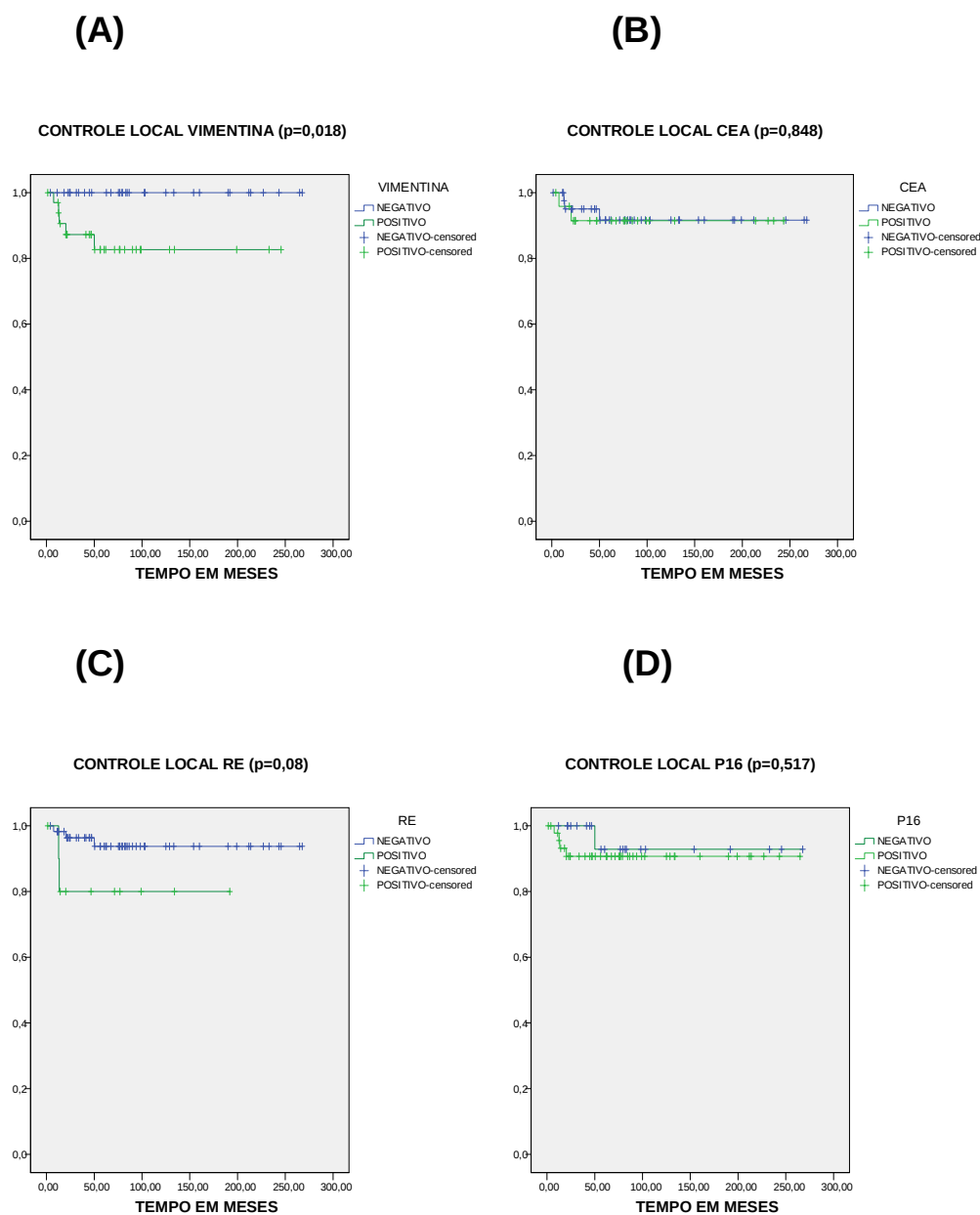
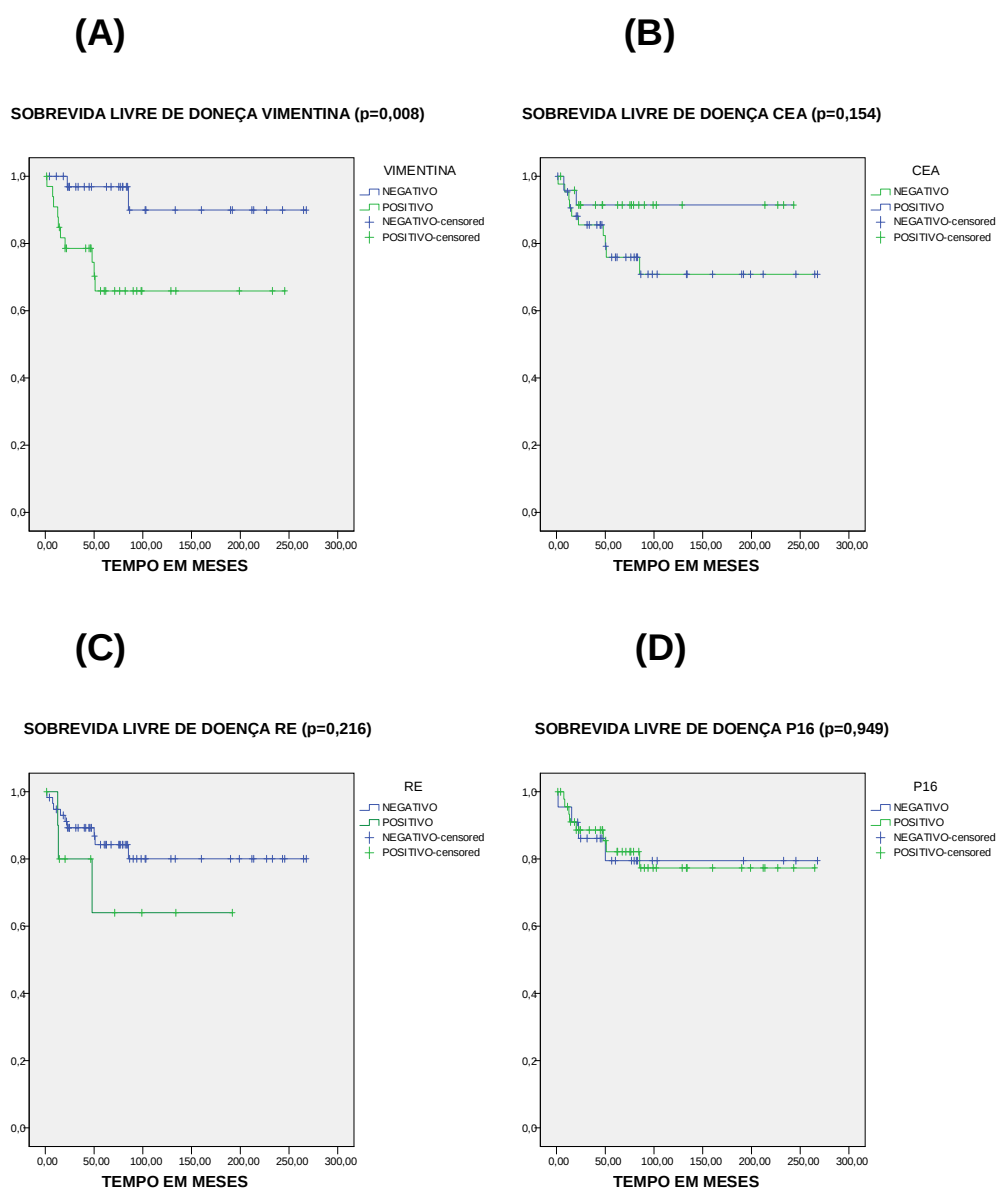


Figura 9 - Controle local no grupo IB/IIA-LND por marcador.

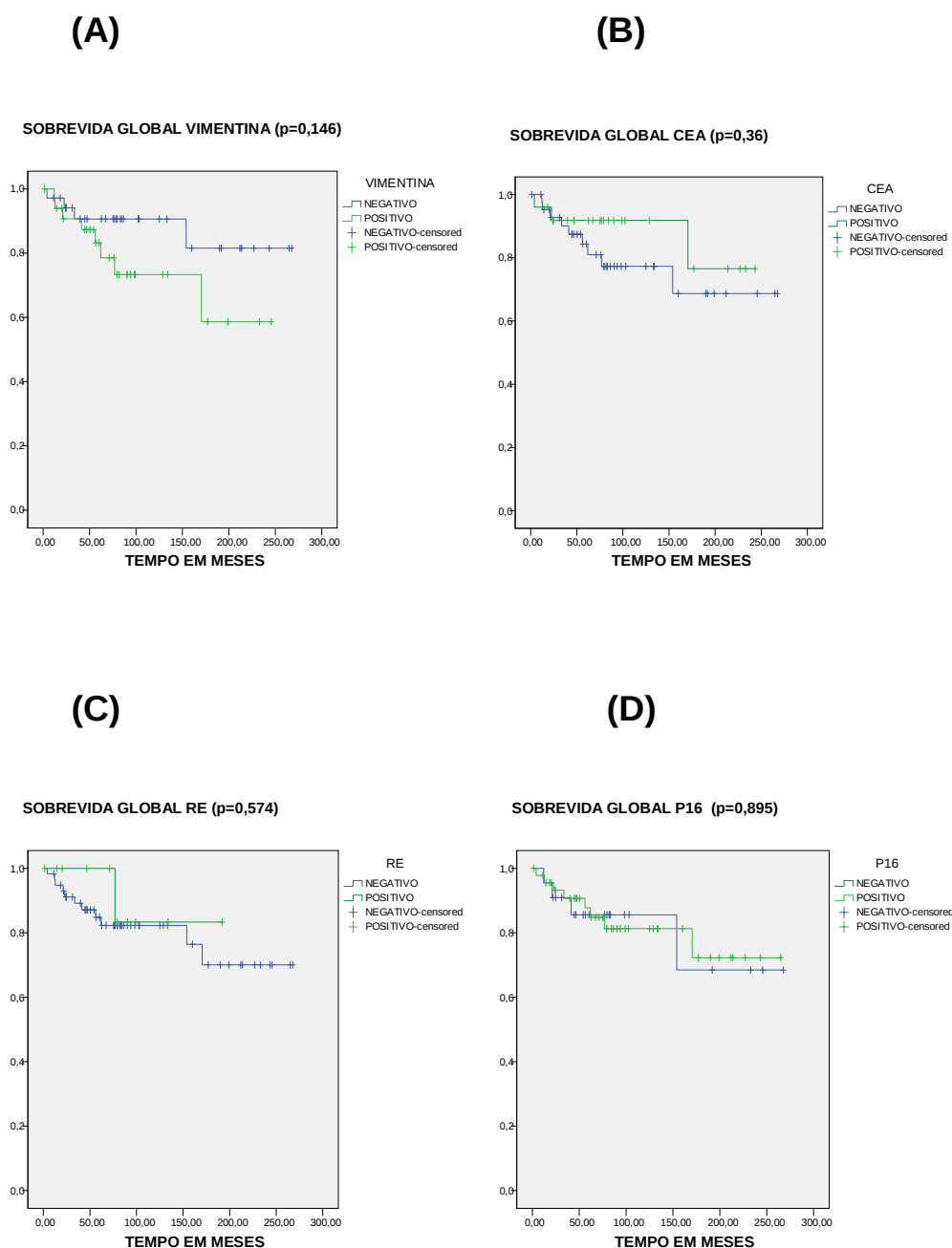
A Vimentina também se mostrou associada a uma menor sobrevida livre de doença em 5 anos. Ela foi de 96% para as pacientes com o marcador negativo e caiu nos casos com o marcador positivo para 65% ($p = 0,008$). Os outros marcadores não mostraram essa relação: CEA ($p = 0,154$); RE ($p = 0,216$); e P16 ($p = 0,949$). Esses dados são mostrados na Figura 10.



Legenda: (A) = Vimentina; (B) = CEA; (C) = RE; (D) = P16.

Figura 10 - Sobrevida livre de doença no grupo IB/IIA-LND por marcador.

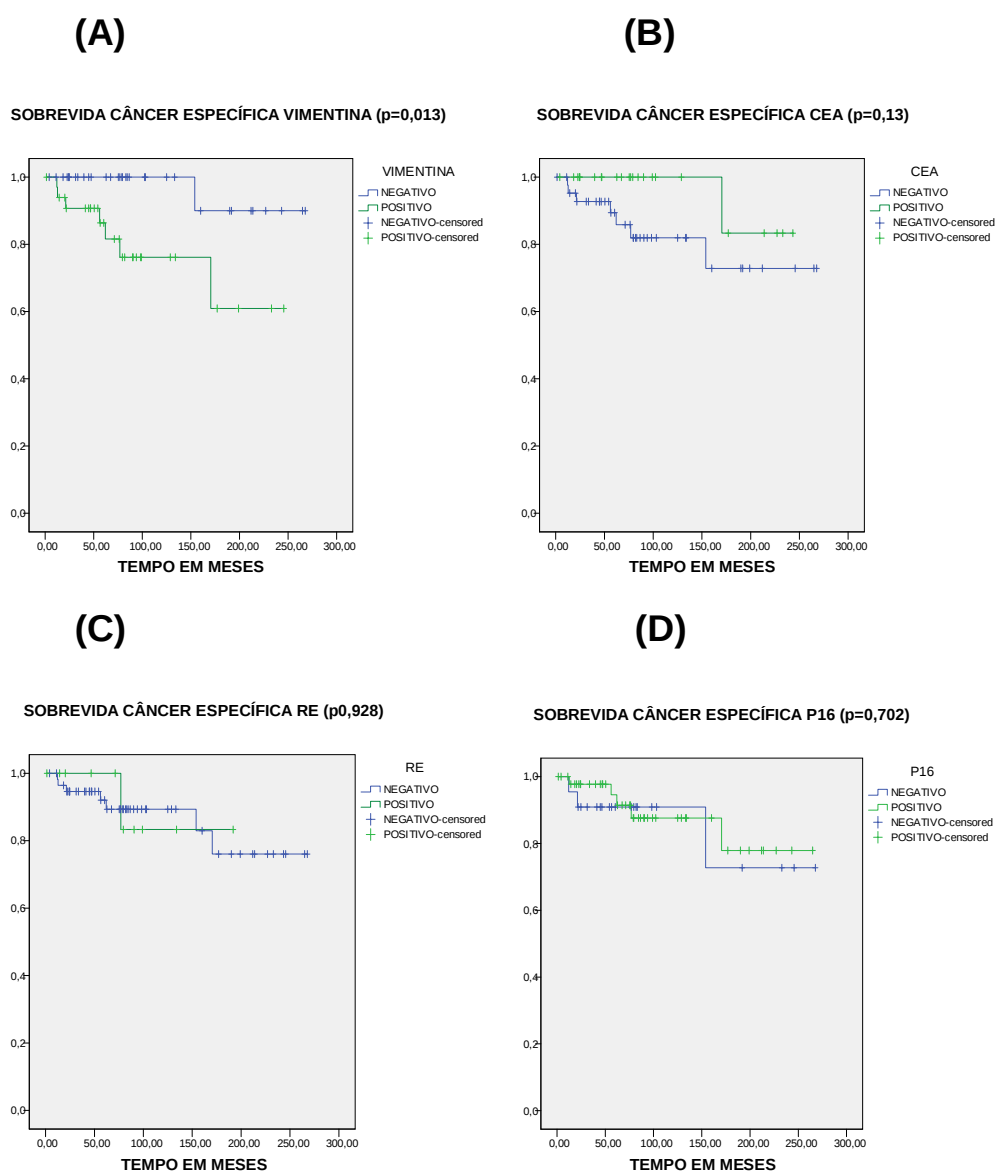
Nenhum dos marcadores, Vimentina ($p = 0,146$), CEA ($p = 0,36$), RE ($p = 0,574$), ou P16 ($p = 0,895$), mostrou relação com a sobrevida global, como mostra a Figura 11.



Legenda: (A) = Vimentina; (B) = CEA; (C) = RE; (D) = P16.

Figura 11 - Sobrevida global no grupo IB/IIA-LND por marcador.

Já quando analisamos a sobrevida câncer específica, a Vimentina mostrou associação com pior resultado. Os casos com o marcador negativo obtiveram sobrevida câncer específica de 100% em 5 anos, contra 85% para os casos com marcador positivo ($p = 0,013$). O CEA ($p = 0,13$), o RE ($p = 0,928$) e o P16 ($p = 0,702$) não mostraram diferença significativa na sobrevida câncer específica, como se vê na Figura 12.



Legenda: (A) = Vimentina; (B) = CEA; (C) = RE; (D) = P16.

Figura 12 - Sobrevida câncer específica no grupo IB/IIA-LND por marcador.

5 DISCUSSÃO

O nosso estudo é o primeiro de que temos conhecimento, na literatura, a comparar o prognóstico dos ACs do colo uterino, de acordo com a definição de origem obtida por um painel de imunoistoquímica. Após a obtenção dos resultados dos marcadores, a composição dos grupos mostrou um número relativamente alto de casos que não se encaixavam em nenhum dos dois grupos. O grupo chamado de Indeterminado conteve todos as pacientes que não foram classificadas no grupo Origem Endometrial (RE+ e Vimentina+ / CEA- e P16-) ou no grupo Origem Endocervical (CEA+ e P16+ / RE- e Vimentina-), Foram 28 casos nessa situação (30,8%).

Esse percentual foi maior que o geralmente descrito na literatura. Estudos como os de DABBS et al. (1996), KAMOI et al. (2002), STAEBLER et al. (2002), ALKUSHI et al. (2003), MCCLUGGAGE et al. (2003), ANSARI-LARI et al. (2004), e YEMELYANOVA et al. (2009) descrevem uma quantidade de casos que não se enquadraria em nenhum dos dois grupos de 3 a 16%. Devemos considerar, no entanto, que a forma como esses marcadores são analisados é diferente entre os trabalhos. Em sua maioria, esses estudos separam os casos considerando cada um individualmente. Por exemplo, um caso em que o RE ficou com marcação moderada, mas em que a Vimentina foi fortemente positiva e o P16 negativo é classificado como Origem Endometrial. Esse tipo de abordagem tende a classificar menos casos como grupo Indeterminado do que, por exemplo, se for definido

previamente se o RE moderadamente marcado será classificado como negativo ou positivo. Em nosso trabalho, utilizamos uma análise binária (sim ou não), de forma que primeiro todos os marcadores foram classificados com positivos ou negativos e só depois os casos foram agrupados.

Fazendo a análise dessa forma, KONG et al. (2010), mostrou uma capacidade de diagnóstico diferencial de 70% em um painel muito semelhante ao nosso (exceto que este não utilizou CEA). Isso significa que 30% dos seus casos não puderam ser classificados em nenhum dos dois grupos. Esse resultado está muito próximo do nosso, e isso talvez reflita a decisão do autor de interpretar os casos de forma mais simplificada. Nesse estudo, ele comparou a acurácia de se interpretar os resultados de forma contínua, contando a porcentagem de células marcadas para cada marcador em cada caso, a outra forma que ele chamou de binária, em que cada marcador era determinado simplesmente como positivo ou negativo, e só depois eram agrupados para chegar à classificação da origem. O resultado comparado entre a acurácia diagnóstica de analisar dessa forma simplificada foi muito semelhante à análise numérica e por considerar a forma binária mais simples o autor recomenda essa forma de interpretação. Como nosso material visava trazer informação prognóstica relevante para a clínica, decidimos seguir essa recomendação e obtivemos resultados muito similares. Outro fator que pode ter contribuído para os achados semelhantes entre o estudo de KONG et al. (2010) e o nosso é que ele foi realizado com a utilização de um TMA, assim como o nosso.

Não existem estudos sobre o perfil molecular ou genômico desse grupo Indeterminado e também não há evidência sobre o seu desfecho clínico em comparação com os outros dois grupos. Em nosso estudo, as curvas de sobrevida de toda a amostra apresentam o grupo indeterminado com sobrevida global semelhante ao grupo Origem Endocervical, mas a análise parcial dos dados não reproduz esse efeito, sendo a curva de sobrevida do grupo indeterminado diferente dos outros dois grupos quando considerada a análise de IB/IIA-LND. Outro dado bastante interessante é a maior prevalência de grau histológico 3 no grupo indeterminado. Nesse grupo, 18,5% das pacientes eram grau 3, enquanto apenas 9% e 5% das pacientes do grupo Origem Endocervical e Origem Endometrial eram grau 3 respectivamente ($p=0,026$). É interessante pensar que o grupo indeterminado poderia ser um grupo de neoplasias menos diferenciadas e que, por isso, os marcadores imunoistoquímicos não estão mais na sua configuração de origem (endocervical ou endometrial) e, por isso, também o grau histológico é mais avançado. De outro lado, os desfechos clínicos não mostraram um pior prognóstico para esse grupo, então essa interpretação é mais complexa e carece de mais estudos para se sustentar.

Apesar de vermos separação das curvas na maioria das análises de sobrevida, os resultados não mostraram diferenças estatisticamente significativas entre os 3 grupos. Na análise parcial dos dados que inclui apenas pacientes ECI, também não obtivemos diferença significativa entre os tumores do grupo Origem Endocervical e os do grupo Origem Endometrial. Apenas com esse resultado e sem dispor de outros estudos

similares na literatura não é possível determinar se realmente os grupos são idênticos em termo de sobrevida ou se a amostra foi muito pequena para detectar uma diferença.

A premissa do estudo, desde o início, era de que por alguns estudos mostrarem pior sobrevida para os ACs cervicais, comparados com os CECs e outros estudos não, essa diferença poderia residir no fato de alguns ACs cervicais serem histológica e clinicamente mais parecidos com tumores do colo do útero (seriam “verdadeiros” ACs cervicais) e outros serem, na verdade, ACs do corpo do útero com invasão do colo (seriam “falsos” ACs cervicais). Dessa forma, para inferir se não haveria realmente diferença entre os grupos ou se deveria haver e a nossa amostra foi pequena para detectar, é necessário comparar a sobrevida dos tumores cervicais EC I (dos quais muitos também têm invasão do corpo do útero) e a dos tumores endometriais EC II (que são os que têm invasão do colo). Assim podemos tentar estimar se uma diferença deveria ser esperada entre os ACs cervicais de origem endocervical e endometrial.

Como vimos, são poucos os estudos que analisaram a sobrevida dos tumores cervicais em cada EC e diferenciaram os ACs dos CEC. IRIE et al. (2000) mostram uma sobrevida global em 5 anos de 95% nas pacientes com ACs cervicais ECI. Já a maioria dos outros estudos traz sobrevidas em 5 anos mais modestas, EIFEL et al. (1990) e CHEN et al. (1999) mostram sobrevidas de 75% e 72% respectivamente. LANDONI et al. (1997), é o único estudo randomizado em que é possível estimar a sobrevida global das pacientes com AC EC I. O resultado em 5 anos é 70%, corroborando que um

valor mais provável para a sobrevida global em 5 anos de pacientes com AC cervical EC I esteja entre 70 e 75%. Para os tumores cervicais CEC, o próprio LANDONI et al. (1997) mostra uma sobrevida superior de 84% em 5 anos.

São raros os estudos analisando apenas a sobrevida dos ACs endometriais do ECII. Em sua quase totalidade, os grandes estudos randomizados avaliam as indicações de tratamento no EC I (CREUTZBERG et al. 2000; NOUT et al. 2010) ou nos casos de doença mais avançada, geralmente no EC III (RANDALL et al. 2005). PITSON et al. (2002), analisaram 170 pacientes com AC endometrial ECII submetidas a tratamento cirúrgico, seguido ou não de radioterapia adjuvante e obtiveram uma sobrevida global em 5 anos de 77%. Em um trabalho com 86 pacientes, COZAD (2008), investigaram essa mesma população e obtiveram uma sobrevida de 75% em 5 anos. Mas em geral, a maioria dos estudos com pacientes do EC II vai mostrar um resultado mais próximo da sobrevida das pacientes do EC I. COHN et al. (2007), analisaram 162 pacientes com as mesmas características e o resultado mostrou uma sobrevida superior, atingindo 88% em 5 anos. Outros estudos como os de AYHAN et al. (2004) que avaliaram 48 pacientes e CANNON et al. (2009) que avaliaram 71 também obtiveram valores mais altos, chegando a 86% e 82% em 5 anos respectivamente.

Utilizando então esses valores de forma simplificada, podemos formular uma hipótese em que os ACs EC I do colo uterino teriam sobrevida global em 5 anos de 70 a 75%, enquanto os tumores de endométrio ECII

teriam uma sobrevida de 75% a 85%. Se essa hipótese for correta, a sobrevida global em nosso estudo deveria apontar uma diferença de sobrevida global na ordem de 5% a 10% entre o grupo Origem Endocervical (com prognóstico pior) e o grupo Origem Endometrial (com prognóstico um pouco melhor). Como nosso estudo não foi capaz de apontar essa diferença, mas também não apresenta curvas de sobrevida sobrepostas, acreditamos que novos estudos com casuísticas maiores devem ser realizados, a fim de investigar se existe ou não uma diferença prognóstica entre os ACs do colo do útero de origem endocervical e endometrial.

Em nossos resultados, a Vimentina foi o único dos marcadores que mostrou relação com o prognóstico. As pacientes com marcador positivo tiveram pior controle local, pior sobrevida livre de doença e pior sobrevida câncer específica. É difícil empreender uma comparação desse resultado com a literatura, pois existem apenas pequenos relatos sobre a relação dos marcadores e o prognóstico dos ACs cervicais.

A expressão de Vimentina foi investigada em alguns tipos de tumores e se mostrou associada com o prognóstico em alguns deles. HANDRA-LUCA et al. (2011), avaliaram o marcador em tumores pancreáticos; ZHANG et al. (2011) avaliaram o marcador em tumores de cólon. No caso dos tumores de pâncreas a positividade da Vimentina foi fator independente de menor sobrevida. Outro tumor onde a Vimentina foi associada à pior sobrevida foi no carcinoma de células transicionais. SABO et al. (1997), investigaram 39 casos e concluíram que a Vimentina e o grau histológicos eram os 2 mais importantes fatores prognósticos independentes. Já em

outros tumores como o de mama (SESHADRI et al. 1996) e o de pulmão (PELLETIER et al. 2001) a Vimentina não revelou significância prognóstica. Em tumores de endométrio, os níveis de expressão de Vimentina diminuem à medida que as lesões vão evoluindo de hiperplasia benigna até tumores francamente invasivos (PAPADOPOULOS et al. 2002).

Nos tumores cervicais, GILLES et al. (1996), demonstraram que a Vimentina estava expressa com muito maior frequência nos casos de carcinomas cervicais com metástases linfonodais. Demonstraram ainda que, enquanto a maioria dos tumores invasivos expressavam o marcador, nenhum dos casos de NIC III expressava Vimentina na imunoistoquímica. STEWART e LITTLE (2010), demonstraram que também, nos adenocarcinomas “in-situ”, não há marcação para a Vimentina. Outro achado interessante é que o gene que codifica a proteína, quando super-expresso, dá maior poder de migração a células de linhagens de tumores cervicais in vitro (JUNG et al. 2001). No único relato da literatura que investigou especificamente o valor prognóstico da Vimentina nos adenocarcinomas cervicais, uma série de 59 pacientes tratadas com radioterapia exclusiva foi analisada e ficou demonstrado que os casos com marcação da Vimentina estavam associados a um pior prognóstico (OKA et al. 1992).

Quanto aos outros marcadores, NGAN et al. (1998), avaliaram 91 pacientes com AC cervical antes do tratamento cirúrgico e demonstraram que os valores séricos de CEA não estão correlacionados com recorrência ou mortalidade. MOLINA et al. (2003), mostraram que o nível sérico de CEA pré-tratamento está associado com características patológicas de doença

mais avançada como invasão parametrial ou tamanho do tumor, mas também não mostraram relação com o prognóstico quando submetido à análise multivariada. Quanto ao valor prognóstico da demonstração de CEA no tecido tumoral por imunoistoquímica, KAINZ et al. (1994), investigaram 76 casos de tumores cervicais IB e IIB e não encontraram correlação do CEA com sobrevida ou recidiva.

A literatura sobre o RE e a sua influência nos tumores cervicais é mais substancial, possibilitando obter alguma informação especificamente sobre os AC. No maior dos relatos, BAALBERGEN et al. (2004) analisaram uma série de marcadores em 101 pacientes e não encontraram relação entre RE e sobrevida global. BODNER et al. (2010) avaliaram outros 39 ACs e, apesar de 39% dos casos serem positivos para RE na marcação com imunoistoquímica, não houve relação entre o marcador e os dados clínico-patológicos, sobrevida livre de doença ou sobrevida global. SUZUKI et al. (2000), também não mostraram associação significativa do RE com sobrevida em um estudo que incluiu 66 pacientes tratados com radioterapia exclusiva, mas a positividade do marcador foi de apenas 12 casos. Outro relato que não encontrou relação do RE com a sobrevida foi FUJIWARA et al. (1997), que investigou 84 casos, dos quais 17 foram positivos (20%). Entretanto, foi demonstrado que o marcador era menos frequente nos tumores mais indiferenciados. Já MASOOD et al. (1993), em um estudo com 54 pacientes e 30% de marcação para RE mostrou associação do marcador com grau histológico menor e uma sobrevida melhor. Esse resultado foi independente do estadiamento clínico.

Existe um número considerável de relatos sobre o papel do P16 na transformação dos tumores cervicais desde a displasia de baixo grau até a lesão invasiva (YILDIZ et al. 2007; ANSCHAU et al. 2009; TSOUNPOU et al. 2009), mas há poucos relatos avaliando a sua influência na sobrevida. VAN DE PUTTE et al. (2003) possuem a maior casuística nesse sentido, com um total de 221 pacientes com tumores CEC IB, demonstraram que, apesar do P16 estar associado com características clínicas de pior prognóstico, não é fator independente de pior sobrevida global ou livre de doença. Em se tratando especificamente dos ACs, temos apenas um trabalho de BODNER et al. (2011). Nele, 39 pacientes foram analisados e apesar de 56% deles marcarem para P16 não houve qualquer relação com parâmetros clínico-patológicos, sobrevida ou recorrência.

6 CONCLUSÕES

Nosso estudo não demonstrou relação entre a origem dos adenocarcinomas cervicais investigada através do painel imunoistoquímico e a sobrevida ou controle da doença.

Na análise individual dos marcadores, a Vimentina se mostrou associada a um pior controle local, uma pior sobrevida livre de doença e uma pior sobrevida câncer específica.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alfsen GC, Thoresen SO, Kristensen GB, et al. Histopathologic subtyping of cervical adenocarcinoma reveals increasing incidence rates of endometrioid tumors in all age groups: a population based study with review of all nonsquamous cervical carcinomas in Norway from 1966 to 1970, 1976 to 1980, and 1986 to 1990. **Cancer** 2000; 89:1291-99.

Alfsen GC, Kristensen GB, Skovlund E, Pettersen EO, Abeler VM. Histologic subtype has minor importance for overall survival in patients with adenocarcinoma of the uterine cervix: a population-based study of prognostic factors in 505 patients with nonsquamous cell carcinomas of the cervix. **Cancer** 2001; 92:2471-83.

Alkushi A, Irving J, Hsu F, et al. Immunoprofile of cervical and endometrial adenocarcinomas using a tissue microarray. **Virchows Arch** 2003; 442:271-7.

Ansari-Lari MA, Staebler A, Zaino RJ, et al. Distinction of endocervical and endometrial adenocarcinomas: immunohistochemical p16 expression correlated with human papillomavirus (HPV) DNA detection. **Am J Surg Pathol** 2004; 28:160-7.

Anschau F, Schmitt VM, Lambert AP, Gonçalves MA, Machado DC. Transition of cervical carcinoma in situ to invasive cancer: role of p16 INK4a expression in progression and in recurrence. **Exp Mol Pathol** 2009; 86:46-50.

Appleby P, Beral V, Berrington GA, et al. Sweetland S. International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer. Carcinoma of the cervix and tobacco smoking: collaborative reanalysis of individual data on 13,541 women with carcinoma of the cervix and 23,017 women without carcinoma of the cervix from 23 epidemiological studies. **Int J Cancer** 2006; 118:1481-95.

Ayhan A, Taskiran C, Celik C, Yuce K. The long-term survival of women with surgical stage II endometrioid type endometrial cancer. **Gynecol Oncol** 2004; 93:9-13.

Baalbergen A, Ewing-Graham PC, Hop WCJ, Struijk P, Helmerhorst TJM. Prognostic factors in adenocarcinoma of the uterine cervix. **Gynecol Oncol** 2004; 92:262-7.

Berek JS, Hacker NS, Fu YS, et al. Adenocarcinoma of the uterine cervix: histologic variables associated with lymph node metastasis and survival. **Obstet Gynecol** 1985; 65:46-52

Bodner K, Laubichler P, Kimberger O, et al. Oestrogen and progesterone receptor expression in patients with adenocarcinoma of the uterine cervix and correlation with various clinicopathological parameters. **Anticancer Res** 2010; 30:1341-5.

Bodner K, Laubichler P, Kimberger O, et al. Expression of p16 protein and epidermal growth factor receptor in patients with adenocarcinoma of the uterine cervix: an immunohistochemical analysis. **Arch Gynecol Obstet** 2011; 283:611-6.

Bray F, Carstensen B, Moller H, et al. Incidence trends of adenocarcinoma of the cervix in 13 European countries. **Cancer Epidemiol Biomark Prev** 2005; 14:2191-9.

Cannon GM, Geye H, Terakedis BE, et al. Outcomes following surgery and adjuvant radiation in stage II endometrial adenocarcinoma. **Gynecol Oncol** 2009; 113:176-80.

Castellsagué X, Díaz M, Sanjosé S, et al. Worldwide human papillomavirus etiology of cervical adenocarcinoma and its cofactors: implications for screening and prevention. **J Natl Cancer Inst** 2006; 98:303-15.

Chen RJ, Lin YH, Chen CA, Huang SC, Chow SN, Hsieh CY. Influence of histologic type and age on survival rates for invasive cervical carcinoma in Taiwan. **Gynecol Oncol** 1999; 73:184-90.

Cohn DE, Woeste EM, Cacchio S, et al. Clinical and pathologic correlates in surgical stage II endometrial carcinoma. **Obstet Gynecol** 2007; 109:1062-7.

Cozad SC. Stage II adenocarcinoma of the endometrium: adjuvant radiotherapy and recurrence patterns. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2008; 71:205-12.

Creutzberg CL, Van Putten WL, Koper PC, et al. Surgery and postoperative radiotherapy versus surgery alone for patients with stage-1 endometrial carcinoma: multicentre randomised trial. PORTEC Study Group. Post Operative Radiation Therapy in Endometrial Carcinoma. **Lancet** 2000; 355:1404-11.

Dabbs DJ, Sturtz K, Zaino RJ. The immunohistochemical discrimination of endometrioid adenocarcinomas. **Hum Pathol** 1996; 27:172-7.

Davy MLJ, Dodd JT, Luke CG, Roder DM. Cervical cancer: effect of glandular cell type on prognosis, treatment, and survival. **Obstet Gynecol** 2003; 101:38-45.

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

Dyson N, Howley PM, Munger K, et al. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. **Science** 1989; 243:934-7.

Eifel PJ, Morris M, Oswald MJ, Wharton JT, Delclos L. Adenocarcinoma of the uterine cervix: prognosis and patterns of failure in 367 cases. **Cancer** 1990; 65:2507-14.

Eifel PJ, Burke TW, Morris M, Smith TL. Adenocarcinoma as an independent risk factor for disease recurrence in patients with stage 1B cervical carcinoma. **Gynecol Oncol** 1995; 59:38-4.

Farley JH, Hickey KW, Carlson JW, Rose GS, Kost ER, Harrison TA. Adenosquamous histology predicts a poor outcome for patients with advanced-stage, but not early stage, cervical carcinoma. **Cancer** 2003; 97:2196-202.

Fujiwara H, Tortolero-Luna G, Mitchell MF, et al. Adenocarcinoma of the cervix. Expression and clinical significance of estrogen and progesterone receptors. **Cancer** 1997; 79:505-12.

Gallup DG, Harper RH, Stock RJ. Poor prognosis in patients with adenosquamous cell carcinoma of the cervix. **Obstet Gynecol** 1985; 65:416-22.

Gilles C, Polette M, Piette J, et al. Vimentin expression in cervical carcinomas: association with invasive and migratory potential. **J Pathol** 1996; 180:175-80.

Grigsby PW, Perez CA, Kuske RR, et al. Adenocarcinoma of the uterine cervix: lack of evidence for a poor prognosis. **Radiother Oncol** 1988; 12:289-96.

Grisaru D, Covens A, Chapman B, et al. Does histology influence prognosis in patients with early-stage cervical carcinoma. **Cancer** 2001; 92:2999-3004.

Han CP, Kok LF, Wang PH, et al. Scoring of p16(INK4a) immunohistochemistry based on independent nuclear staining alone can sufficiently distinguish between endocervical and endometrial adenocarcinomas in a tissue microarray study. **Mod Pathol** 2009; 22:797-806.

Han CP, Kok LF, Lee MY, et al. Five commonly used markers (p53, TTF1, CK7, CK20, and CK34 β E12) are of no use in distinguishing between primary endocervical and endometrial adenocarcinomas in a tissue microarray extension study. **Arch Gynecol Obstet** 2010; 281:317-23.

Handra-Luca A, Hong SM, Walter K, Wolfgang C, Hruban R, Goggins M. Tumour epithelial vimentin expression and outcome of pancreatic ductal adenocarcinomas. **Br J Cancer** 2011; 104:1296-302.

Harmon ML, Cooper K. Cervical neoplasia. In: Nucci MR, Oliva E, editors. **Gynecologic pathology**. Philadelphia: Elsevier; 2009. p.141-96.

Hopkins MP, Morley GW. A Comparison of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the cervix. **Obstet Gynecol** 1991; 77:912-7.

Irie T, Kigawa J, Minagawa Y, et al. Prognosis and clinicopathological characteristics of Ib-IIb adenocarcinoma of the uterine cervix in patients who have had radical hysterectomy. **Eur J Surg Oncol** 2000; 26:464-7.

Jung S, Yi L, Kim J, et al. The role of vimentin as a methylation biomarker for early diagnosis of cervical cancer. **Mol Cells** 2011; 31:405-11.

Kainz C, Zeisler H, Kohlberger P, et al. Prognostic value of cytokeratins and carcinoembryonic antigen expression in primary surgically treated cervical cancer. **Anticancer Res** 1994; 14:667-71.

Kamoi S, AlJuboury MI, Akin MR, et al. Immunohistochemical staining in the distinction between primary endometrial and endocervical adenocarcinomas: another viewpoint. **Int J Gynecol Pathol** 2002; 21:217-23.

Kilgore LC, Soong SJ, Gore H, et al. Analysis of prognostic features in adenocarcinoma of the cervix. **Gynecol Oncol** 1998; 31:137-48.

Koh J, Enders GH, Dynlacht BD, et al. Tumour-derived p16 alleles encoding proteins defective in cell-cycle inhibition. **Nature** 1995; 375:506–10.

Kok LF, Lee MY, Tyan YS, et al. Comparing the scoring mechanisms of p16INK4a immunohistochemistry based on independent nucleic stains and independent cytoplasmic stains in distinguishing between endocervical and endometrial adenocarcinomas in a tissue microarray study. **Arch Gynecol Obstet** 2010; 281:293-300.

Kong CS, Beck AH, Longacre TA. A panel of 3 markers including p16, ProExC, or HPV ISH is optimal for distinguishing between primary endometrial and endocervical adenocarcinomas. **Am J Surg Pathol** 2010; 34:915-26.

Landoni F, Maneo A, Colombo A, et al. Randomized study of radical surgery versus radiotherapy for stage Ib-IIa cervical cancer. **Lancet** 1997; 350:535-40.

Lawrence MW, Chang KL. **Practical applications of immunohistochemistry**. Duarte: United States and Canadian Academy of Pathology; 2001. Antibodies important for non-hematolymphoid tissues; p.27-31.

Martins E, Curado MP, Freitas NM, Oliveira JC, Freitas R Jr. Increase in cervical adenocarcinoma rate in Goiânia, GO, Brazil. **Int J Gynecol Cancer** 2009; 19:694-8.

Marchiole P, Benchaib M, Buenerd A, Lazlo E, Dargent D, Mathevet P. Oncological safety of laparoscopic-assisted vaginal radical trachelectomy (LARVT or Dargent's operation): a comparative study with laparoscopic-assisted vaginal radical hysterectomy (LARVH). **Gynecol Oncol** 2007; 106:132-41.

Masood S, Rhatigan RM, Wilkinson EW, et al. Expression and prognostic significance of estrogen and progesterone receptors in adenocarcinoma of the uterine cervix. An immunocytochemical study. **Cancer** 1993; 72:511-8.

Matias-Guiu X. Endometrial neoplasia. In: Nucci MR, Oliva E, editors. **Gynecologic pathology**. Philadelphia: Elsevier; 2009. p.233-60.

McCluggage WG, Sumathi VP, McBride HA, Patterson A. A panel of immunohistochemical stains, including carcinoembryonic antigen, vimentin, and estrogen receptor, aids the distinction between primary endometrial and endocervical adenocarcinomas. **Int J Gynecol Pathol** 2002; 21:11-5.

McCluggage WG, Jenkins D. p16 immunoreactivity may assist in the distinction between endometrial and endocervical adenocarcinoma. **Int J Gynecol Pathol** 2003; 22:231-5.

Milde-Langosch K, Riethdorf S, Kraus-Poppinghaus A, et al. Expression of cyclin-dependent kinase inhibitors p16MTS1, p21WAF1, and p27KIP1 in HPV-positive and HPV-negative cervical adenocarcinomas. **Virchows Arch** 2001; 439:55-61.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativas 2010/ incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2009.

Molina R, Filella X, Lejarcegui JÁ, et al. Prospective evaluation of squamous cell carcinoma and carcinoembryonic antigen as prognostic factors in patients with cervical cancer. **Tumour Biol** 2003; 24:156-64.

Ngan HY, Cheung AN, Lauder IJ, Cheng DK, Wong LC, Ma HK. Tumour markers and their prognostic value in adenocarcinoma of the cervix. **Tumor Biol** 1998; 19:439-44.

Nakanishi T, Ishikawa H, Suzuki Y, Inoue T, Nakamura S, Kuzuya K. A comparison of prognoses of pathologic stage IB adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the uterine cervix. **Gynecol Oncol** 2000; 79:289-93.

Nout RA, Smit VT, Putter H, et al. Vaginal brachytherapy versus pelvic external beam radiotherapy for patients with endometrial cancer of high-intermediate risk (PORTEC-2): an open-label, non-inferiority, randomised trial. **Lancet** 2010; 375:816-23.

Oka K, Nakano T, Arai T. Adenocarcinoma of the cervix treated with radiation alone: prognostic significance of S-100 protein and vimentin immunostaining. **Obstet Gynecol** 1992; 79:347-50.

Papadopoulos N, Kotini A, Cheva A, et al. Immunohistochemical expression of vimentin and secretory component antigens in endometrial hyperplasia and neoplasia. **Eur J Gynaecol Oncol** 2002; 23:411-4.

Pelletier MP, Edwardes MD, Michel RP, Halwani F, Morin JE. Prognostic markers in resectable non-small cell lung cancer: a multivariate analysis. **Can J Surg** 2001; 44:180-8.

Peters WA, Liu PY, Barrett RJ, et al. Concurrent chemotherapy and pelvic radiation therapy compared with pelvic radiation therapy alone as adjuvant therapy after radical surgery in high-risk early stage cancer of the cervix. **J Clin Oncol** 2000; 18:1606-1.

Pitson G, Colgan T, Levin W, et al. Stage II endometrial carcinoma: prognostic factors and risk classification in 170 patients. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2002; 53:862-7.

Randall ME, Filiaci VL, Muss H, et al. Randomized phase III trial of whole-abdominal irradiation versus doxorubicin and cisplatin chemotherapy in advanced endometrial carcinoma: a Gynecologic Oncology Group Study. **J Clin Oncol** 2005; 24:36-44.

Rosai J. **Rosai and Ackerman's surgical pathology**. 9th ed. St. Louis: C. V. Mosby; 2004. Utero cervix; p.1523-68.

Rotman M, Sedlis A, Piedmonte MR, et al. A phase III randomized trial of postoperative pelvic irradiation in stage 1B cervical carcinoma with poor prognostic features: follow-up of a Gynecologic Oncology Group study. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2006; 65:169–76.

Sabo E, Miselevich I, Bejar J, et al. The role of vimentin expression in predicting the long-term outcome of patients with localized renal cell carcinoma. **Br J Urol** 1997; 80:864-8.

Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, et al. Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. **Am J Pathol** 1998; 153:1741-8.

Sano T, Masuda N, Oyama T, et al. Overexpression of p16 and p14ARF is associated with human papillomavirus infection in cervical squamous cell carcinoma and dysplasia. **Pathol Int** 2002; 52:375-83.

Sasieni P, Adams J. Changing rates of adenocarcinoma and adenosquamous carcinoma of the cervix in England. **Lancet** 2001; 357:1490-3.

Seshadri R, Raymond WA, Leong AS, Horsfall DJ, McCaul K. Vimentin expression is not associated with poor prognosis in breast cancer. **Int J Cancer** 1996; 67:353-6.

Shimada M, Kiwaga J, Nishimura R, et al. Ovarian metastasis in carcinoma of the uterine cervix. **Gynecol Oncol** 2006; 101:234-7.

Shingleton HM, Bell MC, Fremgen A, et al. Is there really a difference in survival of women with squamous cell carcinoma, adenocarcinoma, and adenosquamous cell carcinoma of the cervix? **Cancer** 1995; 76:1948-55.

Smith HO, Tiffany MF, Qualls CR, Key CR. The rising incidence of adenocarcinoma relative to squamous cell carcinoma of the uterine cervix in the United States: a 24-year population-based study. **Gynecol Oncol** 2000; 78:97-105.

Smith JS, Green J, Berrington de Gonzalez A, et al. Cervical cancer and use of hormonal contraceptives: a systematic review. **Lancet** 2003; 361:1159-67.

Staebler A, Sherman ME, Zaino RJ, et al. Hormone receptor immunohistochemistry and human papillomavirus in situ hybridization are useful for distinguishing endocervical and endometrial adenocarcinomas. **Am J Surg Pathol** 2002; 26:998-1006.

Stewart CJ, Little L. Diagnostic value and implications of vimentin expression in normal, reactive and neoplastic endocervical epithelium. **Pathology** 2010; 42:217-23.

Suzuki Y, Nakano T, Arai T, Morita S, Tsujii H, Oka K. Progesterone receptor is a favorable prognostic factor of radiation therapy for adenocarcinoma of the uterine cervix. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2000; 47:1229-34.

Takeda N, Sakuragi N, Takeda M, et al. Multivariate analysis of histopathologic prognostic factors for invasive cervical cancer treated with radical hysterectomy and systematic retroperitoneal lymphadenectomy. **Acta Obstet Gynecol Scand** 2002; 81:1144-51.

Tinga DJ, Bouma J, Aalders JG. Patients with squamous cell versus adeno(squamous) carcinoma of the cervix, what factors determine the prognosis? **Int J Gynecol Cancer** 1991; 2:83-91.

Tsompou I, Arbyn M, Kyrgiou M, et al. p16(INK4a) immunostaining in cytological and histological specimens from the uterine cervix: a systematic review and meta-analysis. **Cancer Treat Rev** 2009; 35:210-20.

Van de Putte G, Holm R, Lie AK, Tropé CG, Kristensen GB. Expression of p27, p21, and p16 protein in early squamous cervical cancer and its relation to prognosis. **Gynecol Oncol** 2003; 89:140-7.

Vargas H A, Akin O, Zheng J, et al. The value of MR imaging when the site of uterine cancer origin is uncertain. **Radiology** 2011; 258:785-92.

Wang SS, Sherman ME, Hildesheim A, Lacey Junior JV, Devesa S. Cervical adenocarcinoma and squamous cell carcinoma incidence trends among white women and black women in the United States for 1976-2000. **Cancer** 2004; 100:1035-44.

Yemelyanova A, Ji H, Shih IeM, Wang TL, Wu LS, Ronnett BM. Utility of p16 expression for distinction of uterine serous carcinomas from endometrial endometrioid and endocervical adenocarcinomas: immunohistochemical analysis of 201 cases. **Am J Surg Pathol** 2009; 33:1504-14.

Yildiz IZ, Usubütün A, Firat P, Ayhan A, Küçükali T. Efficiency of immunohistochemical p16 expression and HPV typing in cervical squamous intraepithelial lesion grading and review of the p16 literature. **Pathol Res Pract** 2007; 203:445-9.

Zaino RJ. Glandular lesions of the uterine cervix. **Mod Pathol** 2000; 13:261-274.

Zhang C, Xu JH, Liu T, Cui H. Clinical significance of signal transduction and activators of transcription 3, E-cadherin and vimentin in colon cancer. **Zhonghua Wei** 2011; 14:202-5.

Anexo 1 - Parecer do comitê de ética**Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP**

São Paulo, 07 de Outubro de 2009.

Ao
Dr. João Victor Salvajoli

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1311/09

"Estudo de Marcadores Imuno-histoquímicos Relacionados a Origem dos Adenocarcinomas do Colo Uterino: Análise do Impacto Prognóstico e Terapêutico da Diferenciação Entre Tumores de Origem Endocervical e Tumores de Origem Endometrial".

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente - Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 06/10/2009, aprovaram a realização do estudo em referência e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com Resoluções do CNS;
- Termo de Dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido;
- Orçamento Financeiro detalhado;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Radioterapia.

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

Atenciosamente,

Dr. Alexandre Sá de Andrade
2º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

Anexo 2 - Figuras ampliadas das curvas com p significativo

Reprodução da Figura 6 (página 38)

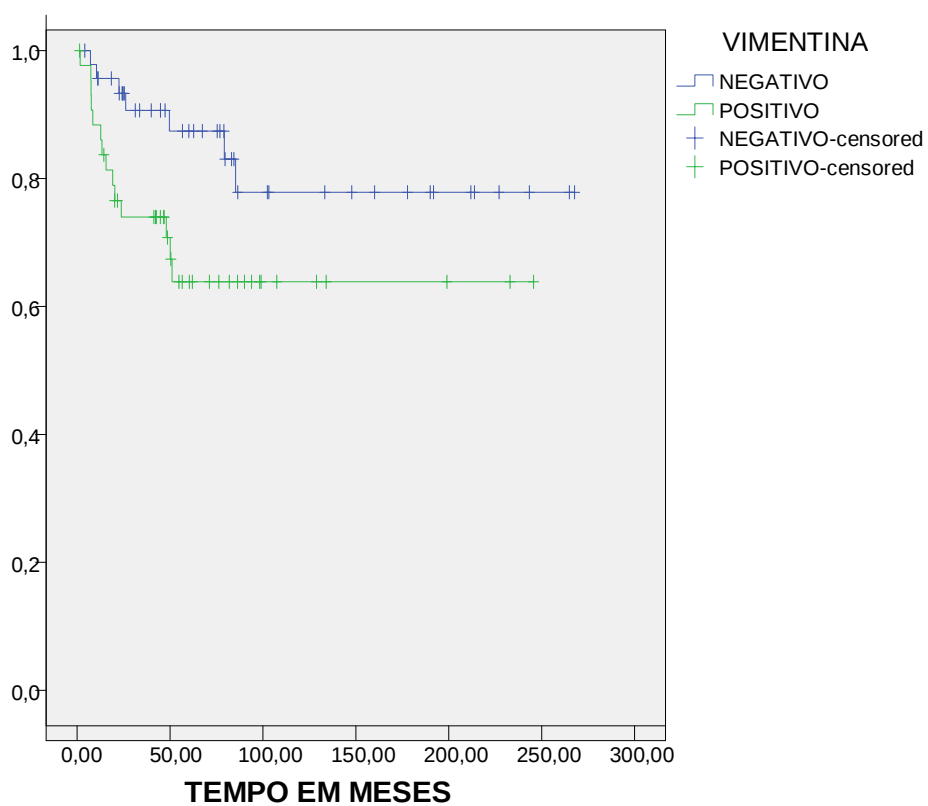
SOBREVIDA LIVRE DE DOENÇA (p=0,045)

Figura 6 - Curva de sobrevida livre de doença para a Vimentina.

Reprodução da Figura 7A (página 39)

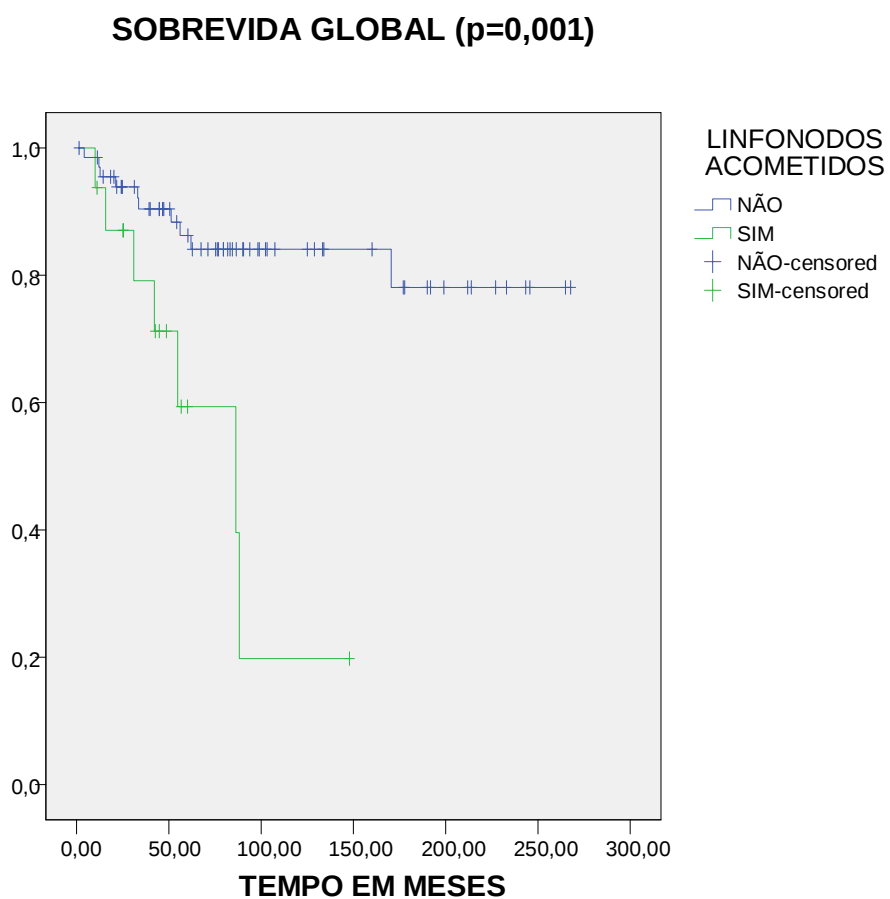
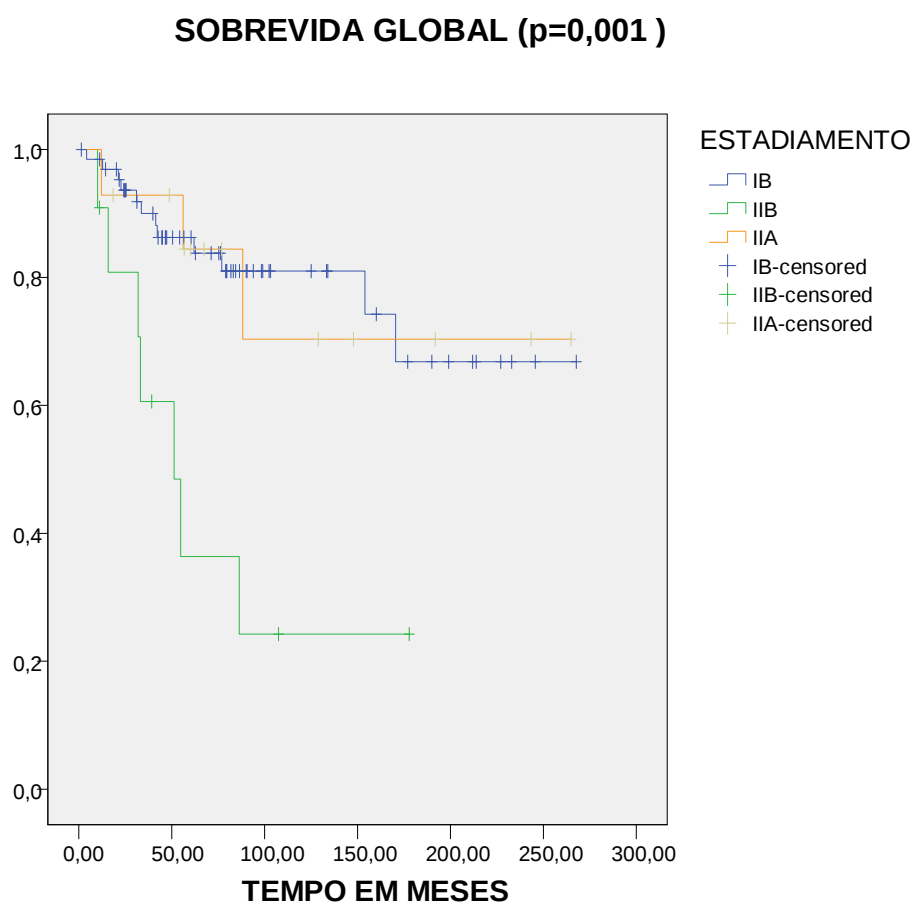


Figura 7A - Curvas de sobrevida global por acometimento linfonodal

Reprodução da Figura 7B (página 39)

Figura
7B -
Curvas
de



sobrevida global por EC

Reprodução da Figura 9 (página 43)

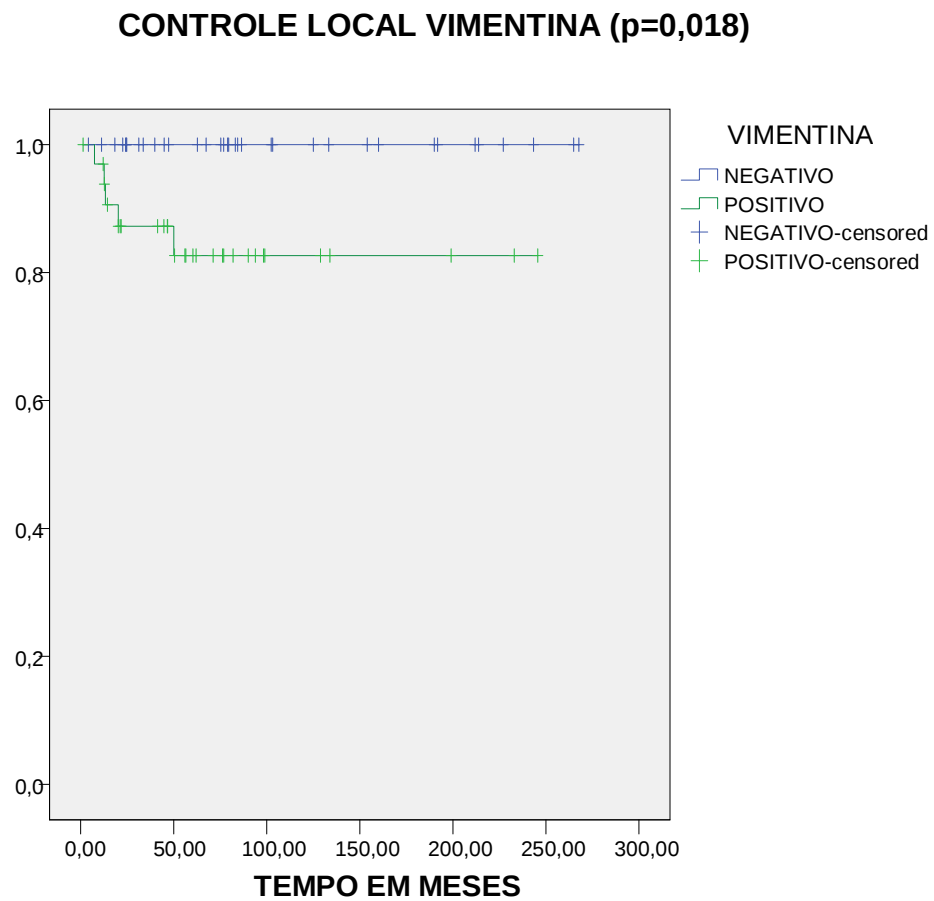


Figura 9 - Controle local no grupo IB/IIA-LND por marcador.

Reprodução da Figura 10 (página 44)

SOBREVIDA LIVRE DE DOENÇA VIMENTINA (p=0,008)

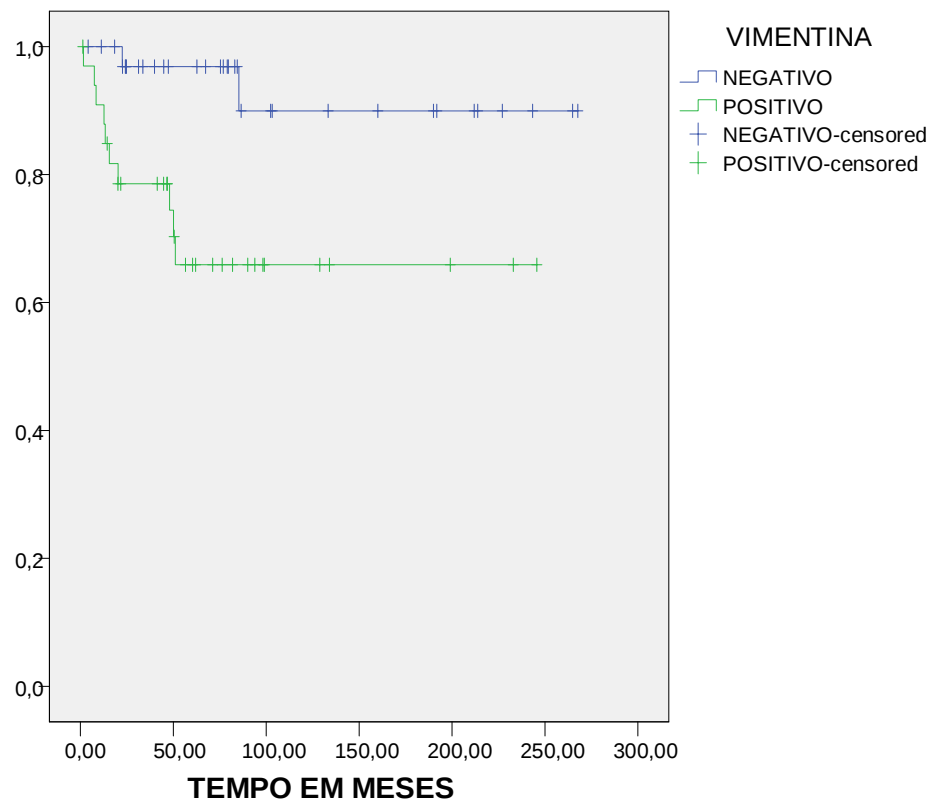


Figura 10 - Sobrevida livre de doença no grupo IB/IIA-LND por marcador.

Reprodução da Figura 12 (página 46)

SOBREVIDA CÂNCER ESPECÍFICA VIMENTINA (p=0,013)

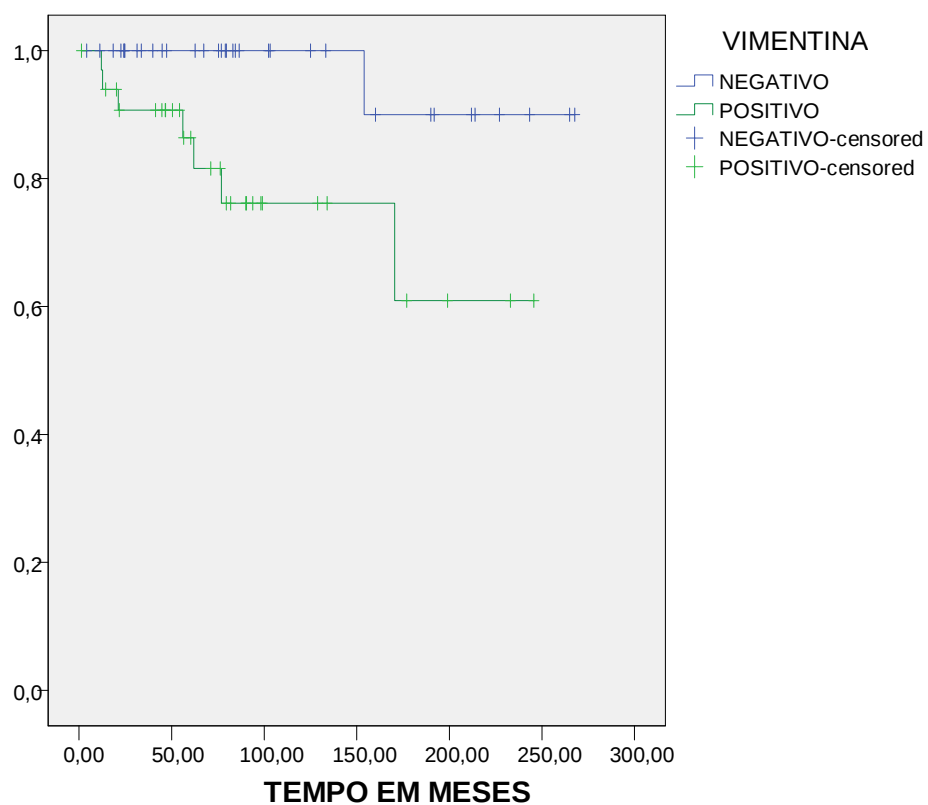


Figura 12 - Sobrevida câncer específica no grupo IB/IIA-LND por marcador.