

**ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA DA  
EXPRESSÃO DE COX-2 E VEGF  
EM ALTERAÇÕES PROLIFERATIVAS  
ENDOMETRIAIS EM *TISSUE MICROARRAY***

**GABRIEL LOWNDES DE SOUZA PINTO**

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

**Área de concentração: Oncologia**

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

**São Paulo**

**2007**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Pinto Gabriel Lowndes de Souza

**Análise imunoistoquímica da expressão de COX-2 e VEGF em alterações proliferativas endometriais em *tissue microarray*** / Gabriel Lowndes de Souza Pinto -- São Paulo, 2007.

78p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Fernando Augusto Soares

Descritores: 1. CÂNCER DO ENDOMÉTRIO. 2. HIPERPLASIA ENDOMETRIAL. 3. IMUNOHISTOQUÍMICA. 4. CICLOOXIGENASE 2. 5. PÓLIPOS. 6. TISSUE MICRO ARRAY.

## DEDICATÓRIA

A minha amada esposa Flávia, por sua compreensão e apoio em todo o período de realização deste trabalho, e acima de tudo, pelo carinho com que o fez.

As minhas filhas, Rafaela e Luisa, fontes de amor incondicional que me alimentaram neste período.

Aos meus pais Cornélio e Mônica, que sempre me estimularam a buscar o melhor, de maneira correta e linear.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Fernando Augusto Soares, meus agradecimentos por sua orientação cuidadosa em todas as etapas deste trabalho e mais importante que tudo, pela forma com que o fez: com firmeza, sabedoria e compreensão.

Ao Dr. Ronaldo L. R. Costa, por ser sempre um exemplo de excelência e assistência a ser seguido, a sua amizade e carinho.

Aos meus colegas e amigos de trabalho, Elza, Soraia, Romualdo, Vespa e Ademir pelo incentivo em finalizar este estudo.

Ao Dr. José Humberto T. G. Fregnani pela sua atenção e disposição em explicar os caminhos da estatística.

Ao Prof. Dr. Fabio Ferreira Alves e Dra. Filomena M. Carvalho pela atenção e tempo despendidos para me ajudar na elaboração do trabalho.

Ao Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A. C. Camargo pela paciência com que atendeu minhas necessidades.

A biblioteca do Hospital A. C. Camargo, em especial à Suely por sua atenção e carinho ao corrigir e formatar este trabalho.

## RESUMO

Pinto GLS. **Análise imunoistoquímica da expressão de COX-2 e VEGF em alterações proliferativas endometriais em tissue microarrays.** São Paulo; 2007. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente]

O carcinoma de endométrio é a neoplasia do trato genital feminino mais freqüente nos países desenvolvidos, sendo responsável por 7% das causas de morte por câncer em mulheres. Em 1987, Delighdisch e Holinka sugeriram duas apresentações clínicas do carcinoma de endométrio, o tipo 1, com evolução ligada diretamente a ação estrogênica prolongada e caráter evolutivo mais caracterizado, e o tipo 2, com história natural sem relação a atividade estrogênica, e pior prognóstico. VEGF é um marcador biomolecular muito utilizado em estudos de neoplasias e patologias com potencial neoplásico devido a seu papel importante no processo de angiogênese. A ciclooxigenase 2 (COX-2) apresenta uma participação direta nas vias de ativação de VEGF. Foi realizada análise da expressão imunoistoquímica de COX-2, VEGF-1 (angiogênese) e VEGF-3 (linfangiogênese) em pacientes portadoras de carcinoma do endométrio do tipo endometrióide e pacientes com lesões com conhecido potencial pré-neoplásico (pólipos endometriais, hiperplasias atípicas e hiperplasias típicas) ao carcinoma de endométrio. Nosso estudo demonstrou que todas as patologias analisadas expressam os marcadores, sendo esta expressão estatisticamente mais importante nos carcinomas que nas patologias benignas ( $p < 0,001$  para COX-2 e VEGF-1 e  $p = 0,003$  para VEGF-3). Nosso trabalho não demonstrou diferença estatística na expressão dos marcadores entre as hiperplasias e pólipos ( $p = 0,0530$ ,  $p = 0,038$ ,  $p = 0,145$ , para COX-2, VEGF-1 e VEGF-3 respectivamente). Não houve uma relação direta entre a expressão dos marcadores estudados com os fatores prognósticos anátomo-patológicos conhecidos para o carcinoma de endométrio. Em relação à sobrevida somente pacientes com expressão positiva forte para COX-2 apresentaram uma tendência a pior sobrevida em relação a pacientes com expressão negativa e expressão positiva fraca. Este resultado não demonstrou significância estatística ( $p = 0,546$ ). Concluímos que os carcinomas endometriais expressam

positivamente COX-2, VEGF-1 e VEGF-3. Existe uma relação direta entre as expressões dos marcadores estudados. As expressões dos marcadores são mais significativas nos carcinomas endometriais do tipo endometrióide do que nas patologias benignas estudadas. Nosso estudo não demonstrou relação entre a expressão de COX-2, VEGF-1 e VEGF-3 com fatores prognósticos anátomo-patológicos.

## SUMMARY

Pinto GLS. **[Immunohistochemistry analysis of COX-2 and VEGF expression in endometrial diseases in tissue micro arrays]**. São Paulo; 2007. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente]

The endometrial cancer is the most prevalent neoplasia of the female genital tract in developed countries, being responsible for 7% of all deaths due to cancer in women. In 1987 Delighdisch and Holinka suggested that the endometrial cancer may have two different clinical presentations, one based in continued estrogen action in the endometrial tissue and with a progressive evolution (type 1) and the other with a natural history without intense estrogen action, and worst prognosis (type 2). VEGF is a biomolecular marker in neoplasia and precursors lesions because of its participation in angiogenesis process and this has been largely studied by many authors. The cyclooxygenase-2 (COX-2) has a direct participation in activation lines of VEGF. We did an immunohistochemistry analysis of COX-2, VEGF-1 (angiogenesis) and VEGF-3 (lymphangiogenesis) in patients with endometrioid carcinoma of the endometrium and in pre-neoplastic lesions (polyps, typical hyperplasia and atypical hyperplasia). We demonstrated that all pathologies had a positive expression for the biomarkers, but it was statistically higher in carcinomas than the other lesions ( $p < 0,001$  for COX-2 and VEGF-1 and  $p = 0,003$  for VEGF-3). In our study we do not demonstrated statistic correlation between the biomarkers expression and clinicopathologic factors for endometrial cancer. In the group of patients with high expression for COX-2, there was a trend towards a worst prognosis, but it wasn't statistically significant ( $p = 0,546$ ). We concluded that there was a direct correlation between the expression of COX-2 and VEGF in endometrial neoplasia. The endometrioid carcinoma of the endometrium had a higher expression for COX-2, VEGF-1 and VEGF-3 than benign endometrial lesions. The expressions of the biomarkers show no statistically correlation with clinicopathologic factors for endometrial cancer.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Imagem microscópica da expressão de COX-2 em carcinomas endometrióides.	28
<b>Figura 2</b>	Imagem microscópica da expressão de VEGF-1 em carcinomas endometrióides.	29
<b>Figura 3</b>	Imagem microscópica da expressão de VEGF-3 em carcinomas endometrióides.	30
<b>Figura 4</b>	Imagem microscópica da expressão de COX-2 em pólipos endometriais.	32
<b>Figura 5</b>	Imagem microscópica da expressão de VEGF-1 em pólipos endometriais.	33
<b>Figura 6</b>	Imagem microscópica da expressão de VEGF-3 em pólipos endometriais.	34
<b>Figura 7</b>	Imagem microscópica da expressão de COX-2 em hiperplasia atípica.	36
<b>Figura 8</b>	Imagem microscópica da expressão de VEGF-1 em hiperplasia atípica.	37
<b>Figura 9</b>	Imagem microscópica da expressão de VEGF-3 em hiperplasia atípica.	38
<b>Figura 10</b>	Imagem microscópica da expressão de COX-2 em hiperplasia típica.	40
<b>Figura 11</b>	Imagem microscópica da expressão de VEGF-1 em hiperplasia típica.	41
<b>Figura 12</b>	Imagem microscópica da expressão de VEGF-3 em hiperplasia típica.	42
<b>Figura 13</b>	Gráfico de expressão de COX-2 nas diferentes doenças.	43
<b>Figura 14</b>	Gráfico de expressão de VEGF-1 nas diferentes doenças.	43
<b>Figura 15</b>	Gráfico de expressão de VEGF-3 nas diferentes doenças.	44
<b>Figura 16</b>	Gráfico de sobrevida global x estadio.	56
<b>Figura 17</b>	Gráfico de sobrevida global e expressão de COX-2.	57
<b>Figura 18</b>	Gráfico de sobrevida global e expressão de VEGF-1.	58
<b>Figura 19</b>	Gráfico de sobrevida global e expressão de VEGF-3.	59



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Esquema diagnóstico de EIN	6
<b>Tabela 2</b>	Critérios diagnósticos de EIN	7
<b>Tabela 3</b>	Graduação da reação de acordo com a intensidade.	21
<b>Tabela 4</b>	Graduação da reação de acordo com a intensidade.	21
<b>Tabela 5</b>	Score final (intensidade + número de células)	21
<b>Tabela 6</b>	Caracterização da casuística segundo o padrão anátomo-patológico e as variáveis clínico demográficas. (Hospital do Câncer A. C. Camargo, 1991 a 2001)	24
<b>Tabela 7</b>	Número e porcentagem de casos segundo a expressão de COX-2. (Hospital do Câncer A. C. Camargo, 1991 a 2006)	25
<b>Tabela 8</b>	Número e porcentagem de casos segundo a expressão de VEGF-1. (Hospital do Câncer A. C. Camargo, 1991 a 2004)	25
<b>Tabela 9</b>	Número e porcentagem de casos segundo a expressão de VEGF-3. (Hospital do Câncer A. C. Camargo, 1991 a 2004)	26
<b>Tabela 10</b>	Número e porcentagem de casos com adenocarcinoma segundo a expressão de COX-1, VEGF-1 e VEGF-3. (Hospital do Câncer A. C. Camargo, 1991 a 2004)	27
<b>Tabela 11</b>	Número e porcentagem de casos com pólipos segundo a expressão de COX-1, VEGF-1 e VEGF-3. (Hospital do Câncer A. C. Camargo, 1991 a 2004).	31
<b>Tabela 12</b>	Número e porcentagem de casos com hiperplasias atípicas segundo a expressão de COX-1, VEGF-1 e VEGF-3. (Hospital do Câncer A. C. Camargo, 1991 a 2004).	35
<b>Tabela 13</b>	Número e porcentagem de casos com hiperplasias típicas segundo a expressão de COX-1, VEGF-1 e VEGF-3. (Hospital do Câncer A. C. Camargo, 1991 a 2004).	39

<b>Tabela 14</b>	Comparação entre o adenocarcinoma e as patologias benignas segundo variáveis clínico demográficas. (Hospital A. C. Camargo, 1991 a 2004)	45
<b>Tabela 15</b>	Comparação entre o adenocarcinoma e as patologias benignas segundo as expressões de COX-2, VEGF-1 e VEGF-3. (Hospital A. C. Camargo, 1991 a 2004)	47
<b>Tabela 16</b>	Comparação entre o adenocarcinoma e as patologias benignas segundo as expressões de COX-2, VEGF-1 e VEGF-3. (Hospital A. C. Camargo, 1991 a 2004)	48
<b>Tabela 17</b>	Comparação entre hiperplasias típicas/ pólipos versus hiperplasias atípicas segundo as expressões de COX-2, VEGF-1 e VEGF-3. (Hospital A. C. Camargo, 1991 a 2004)	49
<b>Tabela 18</b>	Análise entre a expressão dos marcadores e o Grau histológico	50
<b>Tabela 19</b>	Análise entre a expressão dos marcadores e a presença ou ausência de invasão miometrial.	51
<b>Tabela 20</b>	Análise entre a expressão dos marcadores e a presença ou ausência de metástase linfonodal.	52
<b>Tabela 21</b>	Análise entre a expressão dos marcadores com a presença ou ausência de invasão linfovascular.	53
<b>Tabela 22</b>	Associação entre os marcadores COX-2 e VEGF-1 no grupo de pacientes com adenocarcinomas. (Hospital A. C. Camargo, 1991 a 2004)	54
<b>Tabela 23</b>	Associação entre os marcadores COX-2 e VEGF-1 no grupo de pacientes com adenocarcinomas. (Hospital A. C. Camargo, 1991 a 2004)	55

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>bFGF</b>	<i>Basic Fibroblastic Growth Factor</i>
<b>COX-1</b>	Ciclooxigenase-1
<b>COX-2</b>	Ciclooxigenase-2
<b>EGF</b>	<i>Epidermal Growth Factor</i>
<b>EIN</b>	<i>Endometrial Intraepithelial Neoplasia</i>
<b>FIGO</b>	Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
<b>HA</b>	Hiperplasia Atípica
<b>HC</b>	Hiperplasia Complexa
<b>HE</b>	Hematoxilina- eosina
<b>HNPCC</b>	<i>Human Non-polipóyds Colon-retal Cancer</i>
<b>HS</b>	Hiperplasia Simples
<b>IL-1</b>	Interleocina-1
<b>INOS</b>	<i>Inductible Nitric Oxide Synthase</i>
<b>ISGP</b>	<i>International Society of Gynecologic Pathologists</i>
<b>MSI</b>	<i>Microsatélit Instability</i>
<b>PDGF</b>	<i>Platelet-derived Growth Factor</i>
<b>PGE1</b>	Prostaglandina E-1
<b>PGE2</b>	Prostaglandina E-2
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	<i>Transforming Growth Factor-<math>\beta</math></i>
<b>TH</b>	Terapia Hormonal
<b>TMA</b>	<i>Tissue micro arrays</i>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<i>Tumor Necrosis Factor-<math>\alpha</math></i>
<b>UVB</b>	Ultravioleta-B
<b>VEGF-1</b>	<i>Vascular Endotelial Growth Factor-1</i>
<b>VEGF-3</b>	<i>Vascular Endotelial Growth Factor-3</i>
<b>VEGFR</b>	<i>Vascular Endothelium Growth Factor Receptor</i>
<b>WHO</b>	<i>World Health Organization</i>

# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1	Endométrio	1
1.2	Pólipos Endometriais	3
1.3	Hiperplasias Endometriais	4
1.4	Câncer de endométrio	7
1.5	COX-2/ VEGF	12
<b>2</b>	<b>OBJETIVO</b>	<b>16</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>17</b>
3.1	Critérios de inclusão	18
3.2	Critérios de exclusão	18
3.3	Construção do “Tissue Microarray”	19
3.4	Imunohistoquímica	19
3.5	Análise Estatística	22
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>23</b>
4.1	Caracterização da casuística	23
4.2	Expressão dos marcadores COX-2, VEGF-1 e VEGF-3	25
4.3	Pacientes com adenocarcinomas	26
4.4	Pacientes com pólipos	31
4.5	Pacientes com hiperplasias atípicas	35
4.6	Pacientes com hiperplasias típicas	38
4.7	Comparação entre os adenocarcinomas e demais grupos	44
4.8	Comparação entre os grupos de patologias benignas	48
4.9	Associação entre as variáveis histopatológicas e a expressão de COX-2, VEGF-1 e VEGF-3	50
4.10	Associação entre os marcadores biomoleculares	53
4.11	Avaliação de sobrevida global	55

<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>60</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>70</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>71</b>

### **ANEXOS**

**Anexo 1** estadiamento cirúrgico do câncer de corpo uterino, FIGO 1988.

**Anexo 2** classificação dos carcinomas endometriais.

**Anexo 3** câncer de endométrio: duas doenças.

**Anexo 4** protocolo das reações imunoistoquímicas.

# **1 INTRODUÇÃO**

## **1.1 ENDOMÉTRIO**

O útero tem sua origem a partir da junção dos condutos paramesonéfricos ou de Muller.

O endométrio é uma membrana mucosa que reveste internamente a cavidade uterina, e deriva-se do epitélio celômico dos canais de Muller e do mesênquima adjacente que originará o estroma adjacente (MACHADO 1993).

Durante todo o período pré-menacme o tecido endometrial permanece em repouso. Com o início da produção endógena dos esteróides sexuais, iniciam-se as alterações proliferativas endometriais.

Durante o período da menacme, a atividade estrogênica e progestagênica no endométrio é constante e normalmente cíclica, intercalando períodos da grande atividade estrogênica exclusiva, com períodos de atividade estrôgenica e progestagênica.

O estrogênio é um hormônio produzido fisiologicamente nos ovários durante o período da menacme e tem como ação principal no endométrio a promoção de seu crescimento (CLARK e PECK 1979).

A progesterona bloqueia a atividade hiperplásica estrogênica no endométrio e promove sua diferenciação em tecido secretório (CLARK e PECK 1979).

A interação harmoniosa entre a atividade estrogênica e progestagênica, conseqüência de uma atividade ovariana cíclica regular, é responsável pelas fases do

ciclo menstrual e cada fase acaba por apresentar uma característica endometrial específica.

Diversas são as doenças que podem de alguma maneira alterar este quadro endócrino na mulher e levar a um estímulo estrogênico persistente.

Durante o período da menacme, a obesidade, os ciclos anovulatórios e a nuliparidade são fatores de risco conhecidos que tem como consequência principal a atividade estrogênica persistente sem antagonismo progestagênico (MCDONALD et al. 1977; ROSE 1997).

Após o término da atividade hormonal ovariana normal (período pós-menopausa), há uma redução importante da quantidade de estrogênio circulante, levando a um quadro de atrofia endometrial fisiológica.

Na menopausa, os principais fatores de risco para carcinoma de endométrio são obesidade e terapia de reposição hormonal (TRH) estrogênio exclusivo (ZIEL 1982).

No caso da obesidade, a fisiopatologia parece estar presente na conversão periférica da androstenediona em estrona (principal fonte de estrogênio da menopausa). A obesidade está relacionada a altos níveis de conversão e elevados níveis plasmáticos de estrogênio. Além disso, a obesidade está relacionada a baixos níveis de proteína carreadora de hormônios sexuais (aumentando os níveis plasmáticos de estrogênio livre), e maior frequência de ciclos anovulatórios (período pré-menopausa).

## 1.2 PÓLIPOS ENDOMETRIAIS

O termo pólipo é aplicado a toda formação séssil ou pediculada que faz relevo na superfície de implante. Sua gênese, no endométrio, está na ação proliferativa estrogênica, onde receptores de estrogênio e progesterona estão presentes em maior número na superfície dos pólipos que no endométrio adjacente (SANT'ANA DE ALMEIDA 2004).

São requeridos, no mínimo, duas das três características a seguir para o diagnóstico de pólipo endometrial: vasos de paredes grossas, estroma alterado (usualmente fibroso ou colagenoso), e, arquitetura glandular irregular. O diagnóstico diferencial de pólipo endometrial inclui pólipo adenomatoso, adenomioma polipóide atípico e adenosarcoma de baixo grau (CRUM et al. 2003).

Sua prevalência em mulheres com sangramento uterino anormal varia entre 10 e 30%, sendo sua maior incidência entre 51 e 70 anos de idade. (SAVELLI et al. 2003; SANT'ANA DE ALMEIDA 2004).

A manifestação clínica mais comum é o sangramento anormal, apesar de na menopausa 70 a 75% serem assintomáticos (SANT'ANA DE ALMEIDA 2004).

Os pólipos raramente sofrem transformação maligna, com frequência de malignização variando, nos diferentes estudos, entre 0,5 e 3,2% (BAKOUR et al. 2000; MARTIN-ONDARZA et al. 2005).



### 1.3 HIPERPLASIAS ENDOMETRIAIS

As hiperplasias endometriais são alterações epiteliais com potencial pré neoplásico, e são classificadas tanto pela *International Society of Gynecologic Pathologists* (ISGP) e *World Health Organization* (WHO), segundo esquema de KURMAN et al. (1985) que as divide de acordo com seu arranjo arquitetural em simples e complexa e a sua citologia, em típica e atípica, resultando em quatro categorias básicas: hiperplasia simples, hiperplasia complexa, hiperplasia simples com atipias e hiperplasia complexa com atipias. Esta classificação se baseia em achados histopatológicos.

As Hiperplasias simples (HS) são caracterizadas por aumento numérico de glândulas endometriais com alterações arquiteturais diversas produzindo irregularidade na sua forma com alterações císticas e poucas mitoses. Estas lesões raramente evoluem para adenocarcinoma (1%) e refletem normalmente um estímulo estrogênico persistente (KURMAN et al. 1985).

As Hiperplasias complexas (HC) apresentam aumento em número e tamanho das glândulas endometriais, com presença de processos papilares e pontes intraluminares. Frequentemente apresentam pseudo-estratificações intraluminares. Estas lesões dificilmente evoluem para adenocarcinoma (3%) (KURMAN et al. 1985).

As Hiperplasias atípicas (HA) são caracterizadas por citologia atípica das glândulas endometriais, que podem apresentar um formato simples ou complexo, sendo mais comum sua associação às hiperplasias complexas. As células apresentam hipercromatismo nuclear com aumento da relação núcleo/citoplasma. Os núcleos são

irregulares em tamanho e forma com nucléolos proeminentes. Estas lesões evoluem para adenocarcinoma com maior frequência (8% quando associada à HS e 30% quando associada à HC) (KURMAN et al. 1985).

A história natural da evolução de hiperplasias para carcinoma de endométrio é de difícil definição por várias razões: os critérios anátomo-patológicos de definição das hiperplasias têm sido alterados frequentemente; o método inicial de diagnóstico ocorre usualmente por curetagem uterina o que remove parte ou toda a lesão a ser estudada, a presença de lesões coexistentes e intervenções subseqüentes ao diagnóstico (hormonal ou cirúrgica), que acabam por interromper a história natural da doença (TROPÉ et al. 2005).

Independentes das dificuldades acima citadas, existem boas razões que suportam a teoria de evolução das hiperplasias até o adenocarcinoma. As hiperplasias endometriais são, normalmente, reflexo de uma estimulação estrogênica prolongada, algumas regredindo depois de cessado o estímulo estrogênico ou em resposta a terapia progestagênica; algumas hiperplasias coexistem com adenocarcinomas, e, a probabilidade de progressão para adenocarcinoma está diretamente relacionada à presença de alterações arquiteturais ou atipias celulares (TROPÉ et al. 2005).

MUTTER (2007) faz uma análise diferenciada das lesões previamente classificadas segundo os critérios histopatológicos de KURMAN et al. (1985), denominando as lesões histopatológicas de elevado risco ao desenvolvimento do carcinoma de endométrio como Neoplasia Intra-epitelial Endometrial (*EIN-Endometrial Intraepitelial Neoplasia*). Segundo MUTTER (2007), os aspectos práticos que implementam esta teoria estão listados na tabela abaixo.

**Tabela 1** - Esquema diagnóstico de EIN.

EIN NOMENCLATURA	TOPOGRAFIA	CATEGORIA FUNCIONAL	TRATAMENTO
Hiperplasia Endometrial benigna	Difusa	Efeito estrogênico	<i>Hormonal</i>
EIN	Focal com progressão para difusa	Pré- cancer	<i>Hormonal ou cirúrgico</i>
<i>Carcinoma</i>	<i>Focal com progressão para difusa</i>	<i>Cancer</i>	<i>Cirúrgico baseado no estadio</i>

**Fonte:** MUTTER (2007).

O diagnóstico anátomo-patológico de EIN usa a técnica tradicional de hematoxilina-eosina (HE) e caracteriza-se por um processo focal dentro do compartimento endometrial que se diferencia arquiteturalmente e citologicamente do tecido ao redor.

Os critérios utilizados para o diagnóstico de EIN estão listados na tabela abaixo.

**Tabela 2** - Critério diagnóstico de EIN.

CRITÉRIOS (EIN)	COMENTÁRIOS
Arquitetura	<i>Área glandular maior que área estromal.</i>
Citologia	<i>Citologia difere entre confluência arquitetural focal e clara atípica.</i>
Tamanho	<i>Citologia difere entre confluência arquitetural focal e clara atípica.</i>
Exclusão	<i>Condições benignas: secretório, pólipos, reparo, etc.</i>
<i>Exclusão de câncer</i>	<i>Áreas sólidas, glândulas “mosaic-like”; micro invasão ou padrão cribiforme.</i>

**Fonte:** MUTTER (2007).

## 1.4 CÂNCER DE ENDOMÉTRIO

O câncer de endométrio é a neoplasia do trato genital feminino mais freqüente nos países desenvolvidos sendo responsável por aproximadamente 7% das causas de morte por câncer em mulheres.

É uma neoplasia que ocorre entre a quinta e sexta décadas de vida, com incidência na raça branca quatro vezes maior que na não branca.

O estrogênio está diretamente relacionado à proliferação endometrial. Sendo assim, todos os fatores que diretamente ou indiretamente promovem uma exposição constante ao estrogênio levam a um aumento do risco de desenvolvimento de neoplasia.

Entre os principais fatores de risco ao carcinoma de endométrio estão a nuliparidade (risco aumentado em duas a três vezes), a infertilidade (com risco aumentado em três a oito vezes), a menopausa (70% dos casos), TRH, principalmente a realizada somente com estrogênios com o aumento do risco iniciando com dois a três anos de terapia atingindo seu pico após 10 anos (BRINTON et al. 1992).

A principal manifestação clínica nas pacientes portadoras de neoplasia endometrial é o sangramento genital (90%), seguida de manifestações menos características como corrimento (10%) e dor em baixo ventre (3%).

Em meados de 1980, todo sangramento uterino pós-menopausa era obrigatoriamente submetido à investigação através da coleta de material, normalmente mediante dilatação e curetagem (D&C), com diagnósticos negativos em até 60% dos casos (GRIMES 1982). Após publicação por KARLSSON et al., em 1995, de estudo multicêntrico sobre a avaliação ultrassonográfica transvaginal do endométrio de mulheres com sangramento uterino pós-menopausa, tornou-se consenso que endométrios bem visualizados com espessura menor ou igual a 4 mm, têm possibilidade quase nula de apresentar uma neoplasia, portanto tal paciente não precisa submeter-se a investigação histológica, a não ser em casos onde ocorram sangramentos repetitivos. No caso de espessamento endometrial (maior ou igual a cinco milímetros) ou imagem focal hiperecogênica, deve-se proceder à investigação anátomo-patológica.

Os principais métodos usados para obtenção do tecido endometrial são a biópsia aspirativa e a curetagem seriada da cavidade uterina. De maneira geral a análise deste material permite o diagnóstico adequado da neoplasia (66,67%)

(FIORICA et al. 1990). Quando a análise do material resulta em diagnóstico de hiperplasia atípica, em 15 a 25% das vezes as pacientes apresentam carcinoma endometrial (TAVASSOLI e KRAUS 1978; KING et al. 1984).

A histeroscopia diagnóstica permite a visualização direta da cavidade uterina possibilitando assim a biópsia dirigida, mas pode falhar no diagnóstico diferencial visual de lesões malignas e benignas. REIS et al., em 2001, encontraram dois casos de carcinoma de endométrio ao analisarem 60 pacientes com pólipos endometriais de aspecto benigno típico.

Na maioria das amostras de tecido endometrial, a distinção entre adenocarcinoma e hiperplasia é estreita. O diagnóstico de neoplasia bem diferenciada é possível na presença de qualquer um dos seguintes critérios: a) infiltração irregular das glândulas no tecido fibroblástico estromal; b) padrão glandular confluyente resultando em arranjo cribiforme ou c) crescimento papilar extensivo do epitélio e estroma na luz glandular (KURMAN e NORRIS 1982).

A diferenciação dos carcinomas é definida por graus histológicos, através da análise do percentual de componente sólido da lesão, onde lesões **Grau 1**, apresentam 5% ou menos de padrão sólido, são bem diferenciadas e estão associadas a melhor prognóstico; **Grau 2** apresentam 6 a 50% de padrão sólido e apresentam prognóstico intermediário, e **Grau 3**, tumores com mais de 50% de padrão sólido, refletem lesões pouco diferenciadas e frequentemente apresentam piores prognósticos.

Ambos os critérios arquiteturais e de grau nuclear são usados nas classificações da FIGO e ISGP-WHO, e utilizados a todos os tipos histológicos nos diversos estádios cirúrgicos (Anexo 1).

Em relação aos tipos histológicos, o adenocarcinoma endometrióide é o mais freqüente, responsável por 75% a 80% de todos os carcinomas endometriais, apresentando uma variação entre bem diferenciado a pouco diferenciado (FANNING et al. 1989). Caracteristicamente, as glândulas do carcinoma endometrióide apresentam células colunares altas, que dividem uma borda apical comum. Com o decréscimo do grau de diferenciação há uma maior predominância de crescimento com padrão sólido em detrimento do padrão glandular, com o aumento do número das células lúminares, não necessariamente com aumento da estratificação. A invasão estromal manifestada por uma reação desmoplásica local e invasão vascular dificilmente pode ser documentada em amostras de biópsia ou curetagem.

A Sociedade Internacional de Patologia Ginecológica (ISGP) e a WHO revisaram em 1992 a classificação dos tumores ginecológicos endometriais (Anexo 2).

Em 1983, BOKHMAN apresenta um trabalho onde sugere que o carcinoma endometrial pode apresentar duas histórias naturais distintas, o denominado **Tipo 1**, com uma evolução ligada diretamente a atividade estrogênica e melhor prognóstico, e o **Tipo 2** com uma história natural sem relação à atividade estrogênica, normalmente com pior prognóstico. Em 1987, DELIGDISCH e HOLINKA reforçam a teoria de BOKHMAN. (Anexo 3)

Algumas alterações moleculares são atribuídas a uma maior incidência de câncer de endométrio, entre elas a deleção ou mutação do gene PTEN, a instabilidade micro satélite (MSI – *Microsatelit Instability*) e a mutação do TP53.

A mutação em PTEN e a MSI são relativamente comuns e são eventos iniciais no desenvolvimento da neoplasia endometrial.

A mutação somática PTEN é comum no carcinoma de endométrio e reflete normalmente baixa agressividade, apresentando maior frequência nos carcinomas endometrióides (Tipo 1) e menor frequência nos carcinomas serosos ou pequenas células (Tipo 2) (ZHENG et al. 1998). As funções do gene supressor de tumor PTEN incluem inibição da migração celular, *spreading* e adesão (LEE et al. 1999; TAMURA et al. 1998). Em aproximadamente 40% dos adenocarcinomas de endométrio ocorre uma perda de heterozigose para PTEN (gene 10q23), sendo esta a alteração genética (conhecida) mais freqüente associada a esta neoplasia (PEIFFER et al. 1995).

A MSI é resultado de uma série de replicações erradas de certa seqüência genética. Foi descrita originalmente em pacientes portadores de Câncer Colo-retal Hereditário não-polipóide (HNPCC- *Human Non- Polipoyds Colon-retal Cancer*). Uma das manifestações extra-colônicas mais freqüentes desta doença é o câncer endometrial. A freqüência de MSI em câncer endometrial varia entre 9% e 43%, com predomínio nos casos Tipo 1 (RISINGER et al. 1993; CADUFF et al. 1996). Poucos estudos têm sido realizados para tentar associar a importância desta alteração como fator prognóstico.

As mutações no gene p53 são freqüentes não só nos carcinomas serosos (Tipo 2), como também nos carcinomas intra-epiteliais (ZHENG et al. 1998). O gene p53 é um gene supressor de tumor envolvido na regulação do ciclo celular. Mutações do gene p53 frequentemente resultam em uma proteína de longa-vida que se acumula nas células. Embora este pareça ser um evento inicial no processo neoplásico, é um evento tardio no carcinoma de endométrio, sendo um indicador de pior prognóstico



com forte associação com diversas variáveis clinico-patológicas como estadió cirúrgico, grau histológico e profundidade de invasão miometrial.

## **1.5 COX-2/ VEGF**

As ciclooxigenases (COX-1 e COX-2), são duas enzimas que participam da conversão do ácido aracdônico em prostaglandinas. A COX 1 é constitutivamente expressa e responsável pelo funcionamento normal de rins e plaquetas assim como manutenção da integridade da mucosa gastrintestinal. Em contraste a COX-2 pode ser induzida por uma grande variedade de citocinas como IL-1, EGF, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , iNOS e UVB (FUJIWAKI et al. 2002)

Sua contribuição como fator de promoção cancerígeno foi bem demonstrada em famílias portadoras de polipose adenomatosa familiar, onde a deleção do gene responsável pelo COX-2 foi diretamente ligada à redução na ocorrência de polipose e semelhante àquela encontrada em ratos tratados com inibidores seletivos para COX-2.

Recentemente alguns trabalhos demonstraram o papel da COX-2 na angiogênese associado ao crescimento e progressão tumoral de diversas linhagens celulares como: câncer de colon (TSUJII et al. 1998), carcinoma seroso ovariano (ALI-FEHMI et al. 2003), câncer de mama (DAVIES et al. 2003), câncer gástrico (JOO et al. 2003) e carcinoma renal (MIYATA et al. 2003).

A angiogênese (processo de formação de novos vasos sanguíneos) é um pré-requisito ao crescimento tumoral que requer um maior aporte de oxigênio e nutrientes para seu desenvolvimento (FUJIWAKI et al. 2002). A angiogênese é um

evento inicial na progressão tumoral (suprimento básico ao crescimento), onde a hipóxia promove a liberação de fatores de crescimento. Um dos principais fatores de crescimento, as VEGFs (*Vascular Endothelium Growth Factor*), são produzidas pelas células tumorais (ALI-FEHMI et al. 2003; JOO et al. 2003) e têm sua expressão correlacionada diretamente à contagem de microvasos no câncer de endométrio, sugerindo que estes mediadores são importantes no processo de angiogênese (FUJIWAKI et al. 1999).

Os fatores de crescimento VEGF foram isolados inicialmente em líquido ascítico de tumores ovarianos e descritos como fator de permeabilidade vascular. Apresentam-se hiperexpressos em tecidos com atividade mitótica acentuada com ovários e tumores e estão relacionados a cinco processos essenciais o proliferação vascular: relaxamento vascular, indução de permeabilidade, migração endotelial, proliferação e sobrevivência (KARKKAINEN e PETROVA 2000).

As VEGFs agem através de uma família de receptores quinase do tipo tirosina, VEGFR (*Vascular Endothelium Growth Factor Receptor*).

Os VEGFRs estão presentes em níveis elevados nos “novos vasos”, e apresentam três grandes grupos: VEGFR1 e VEGFR2 expressos em células endoteliais de vasos sanguíneos em tumores em desenvolvimento (angiogênese) e VEGFR3, envolvidos no desenvolvimento dos vasos sanguíneos embrionários (DUMONT et al. 1998) e em adultos está restrito ao endotélio de vasos linfáticos (linfangiogênese) (KAIPAINEN et al. 1995; KUKK et al. 1996).

A associação entre a expressão de COX-2 e VEGF foi demonstrada em trabalhos onde linhagens de células de câncer colon-retal HCA-7 que superexpressam COX-2, co-expressam VEGF, bFGF, TGF- $\beta$  e PDGF (TSUJII et al.

1998). Metabólicos da COX-2, como as prostaglandinas E1 e E2, induzem a produção de VEGF em osteoblastos, fibroblastos sinoviais e macrófagos (HARADA et al. 1994; SUNDERKOTTER et al. 1994; TSUJII et al. 1998).

As aromatases são responsáveis pela conversão periférica de androgênios em estrogênios. No câncer de mama os inibidores de aromatases têm uma importante atividade em seu tratamento e prevenção. As prostaglandinas E2 (PGE2) aumentam a atividade intracelular das aromatases estimulando a biosíntese de estrogênios. Existe uma forte correlação entre a expressão de COX-2 e aromatase intratumoral em câncer de mama e esta interação enzimática pode ser um fator importante também na gênese do carcinoma endometrial (FOWLER et al. 2005).

Em tecido endometrial normal a expressão de COX-2 tem sido estudada principalmente no contexto da infertilidade e abortamento de repetição, onde aparentemente a COX-2 parece ter papel na regulação da decidualização e angiogênese no processo de implantação do blastocisto.

Um estudo sistemático de COX-2 em tecidos endometriais ainda não foi realizado. Alguns trabalhos têm demonstrado a expressão de COX-2 em carcinoma endometrial. O primeiro a realizar tal associação foi TONG et al. (2000), que identificaram aumento do RNA mensageiro de COX-2 e de sua proteína por imunistoquímica em 8 de 11 carcinomas endometriais, não identificando a expressão em 3 amostras de endométrio normal.

FUJIWAKI et al. (2002) relatam aumento na expressão de COX-2 em 63 pacientes (51%) com carcinoma de endométrio e em 6 pacientes em hiperplasia endometrial, mas em nenhuma paciente com endométrio normal, independente da fase do ciclo menstrual. Este trabalho também demonstrou uma associação entre

COX-2 e VEGF. Em suas análises foram encontradas proteínas COX-2 em tecido epitelial tumoral, mas não em células estromais.

CAO et al. (2002) estudaram 24 casos de adenocarcinoma bem diferenciados de endométrio e hiperplasia não encontrando superexpressão de COX-2 em nenhum caso; encontrando, no entanto, superexpressão em tumores pouco diferenciados sugerindo que no endométrio o papel da COX-2 está na progressão e não na iniciação tumoral.

FERRANDINA et al. (2002) estudaram a expressão de COX-2 através de análise imunoistoquímica em 69 pacientes com neoplasia endometrial sem tratamento prévio, tendo encontrado expressão de COX-2 em 27 pacientes (39,1%), sendo sua positividade mais freqüente em pacientes com doença extra-uterina e com invasão profunda de miométrio, sugerindo uma correlação com agressividade tumoral. LANDEN et al. (2003) encontraram superexpressão de COX-2 em 9 (69%) de 13 carcinomas endometriais, comparado com apenas um (7%) de 15 tecidos endometriais normais.

OREJUELA et al. (2005) analisaram a expressão de COX-2 em 43 pacientes, sendo 14 com carcinoma endometrial, 19 com hiperplasia e 10 com tecido endometrial normal, não encontrando aumento significativo na expressão de COX-2 em neoplasias ou hiperplasias.

A forte associação bioquímica entre COX-2 e VEGF e a tendência atual em terapia oncológica molecular específica (terapia alvo), motivou a realização deste trabalho, onde inibidores de COX e bloqueadores de VEGF, já identificados farmacologicamente poderão, caso demonstrem efetividade, ser utilizados como arma acessória as terapias anti-neoplásicas com eficácia já conhecida.

## **2 OBJETIVOS**

1. Análise da expressão e relação entre as expressões de COX-2, VEGF-1 e VEGF-3 nos pólipos, hiperplasias típicas, hiperplasias atípicas e adenocarcinoma de endométrio.
2. Analisar a relação entre as expressões dos marcadores e fatores prognósticos no adenocarcinoma de endométrio.
3. Analisar se possível, o valor prognóstico da expressão de COX-2 e VEGF nos carcinomas endometriais.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de um estudo de coorte retrospectivo, onde foram selecionados pacientes admitidos no Departamento de Ginecologia do Hospital A. C. Camargo no período compreendido entre 1991 e 2004.

Foram resgatados do arquivo do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C.Camargo todas as lâminas e blocos de parafina referentes às pacientes previamente selecionadas. Os registros das pacientes foram obtidos através de arquivo do próprio Departamento de Anatomia Patológica. Blocos com material representativo de tecido endometrial foram separados e novos cortes realizados.

Os primeiros cortes representativos obtidos foram então corados pela técnica tradicional de HE. A revisão de lâmina permitiu a confirmação do diagnóstico e a análise histológica. Todas as lâminas foram analisadas e revisadas por um mesmo patologista visando uniformidade de diagnóstico.

Os prontuários médicos dos casos analisados foram revisados e dados clínicos como idade, raça, antecedentes familiares, indicação do procedimento e estadiamento anátomo-patológico (em caso de neoplasia) foram analisados.

Foram separados inicialmente 442 prontuários de pacientes submetidas à investigação endometrial no período. Destas, 188 cumpriram os critérios de inclusão e exclusão pré-determinados (itens 3.1 e 3.2) e tiveram seus blocos de parafina separados.

Do total de 188 pacientes, 24 (12,76%) tiveram a análise de expressão dos marcadores realizada pela leitura individualizada em lâmina, devido ao material

colhido em blocos de parafina não apresentar qualidade suficiente para sua inclusão no TMA (*Tissue microarray*).

As expressões de COX-2, VEGF-1 e VEGF-3 foram realizadas através da técnica de imunistoquímica em TMA, com o método descrito nos itens 3.4 e 3.5.

Em nosso trabalho utilizaremos os critérios de classificação anátomo-patológica de KURMAN, devido à praticidade desta classificação já estar presente atualmente na rotina do serviço de anatomia patológica de nosso hospital.

### **3.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO**

- 1) Pacientes na pós-menopausa (mínimo de 1 ano de amenorréia).
- 2) Pacientes com câncer de endométrio do tipo adenocarcinoma endometrióide; hiperplasias endometriais e pólipos.
- 3) Seguimento mínimo de três anos nos casos de carcinomas.

### **3.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO**

- 1) Pacientes no menacme ou climatério.
- 2) Pacientes que façam uso de TH (estrogênio e ou progesterona) em período inferior a um ano da coleta de material para o estudo.
- 3) Pacientes em uso de antiinflamatórios não hormonais (citação em prontuário).
- 4) História prévia de irradiação pélvica.
- 5) História prévia de quimioterapia.

- 6) Pacientes que já tinham recebido qualquer terapêutica adjuvante a neoplasia endometrial (prévia a coleta do material a ser analisado).
- 7) Pacientes com câncer de endométrio com padrão histológico diferente do endometrióide.
- 8) Pacientes onde o material anátomo-patológico impossibilitasse a análise imunohistoquímica.

### **3.3 CONSTRUÇÃO DO “*TISSUE MICROARRAY*”**

Os blocos de Tissue Microarray (TMA) foram construídos utilizando-se os casos com diagnóstico de hiperplasias típicas, hiperplasias atípicas, pólipos e adenocarcinomas endometrióides, operados no Hospital A.C. Camargo no período entre 1991 e 2004. Os casos foram resgatados do arquivo de anatomia patológica e os blocos representativos das lesões separados. Novas lâminas de HE foram confeccionadas para a identificação da área a ser utilizada no TMA, através de marcação circular da região mais representativa. Usando o *tissue microarrayer* (Beecher Instruments, Silver Spring, MD), a área de interesse previamente marcada na lâmina e identificada no bloco doador foi retirada em duplicata (corte de 0,6mm) e transferida para um bloco receptor.

### **3.4 IMUNOISTOQUÍMICA**

As reações imunohistoquímicas foram realizadas nos cortes histológicos dos blocos de TMA.



Resumidamente, as lâminas foram previamente revestidas por solução de silano (APTS – Sigma<sup>®</sup> A3648) diluída a 4% em acetona. Os cortes obtidos foram de 3µm de espessura após microtomia mecânica. Os cortes foram desparafinizados e preparados por passagens sucessivas por xilol e etanol e submetidos à recuperação antigênica pelo calor por panela de pressão utilizando-se tampão citrato pH 6,0 para COX-2 e banho-maria usando-se como tampão solução EDTA/TRIS pH 9,0. Uma vez preparados os cortes, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio a 3% em metanol, seguida da incubação com o anticorpo primário específico. As diluições finais de trabalho a serem utilizadas foram 1/3000 para COX-2; 1/200 para VEGF-1 e 1/800 para VEGF-3. As reações foram reveladas com solução de Diaminobenzidina (DAB, Dako<sup>®</sup>) a 60mg% e contracoradas com hematoxilina de Harris (Merck<sup>®</sup>).

As reações foram sempre acompanhadas de controle positivo, em tecido sabidamente positivo para o anticorpo testado e dois controles negativos. O primeiro deles foi realizado pelo não uso do anticorpo primário e o segundo através da retirada do anticorpo secundário durante os passos da reação.

A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico comum e os resultados classificados em relação à intensidade da reação e número de células positivas. Esta gradação pode ser vista nas tabelas 3 e 4. O escore final foi estabelecido pela somatória dos graus, sendo considerado casos negativos os escores 0-2, fracamente positivos a somatória entre 3 e 4 e fortemente positivos os casos cuja somatória for maior do que 4 (Tabelas 3 e 4).

Os anticorpos utilizados foram NovoCasta<sup>®</sup> para COX-2, Neomarkers<sup>®</sup> para VEGF-1, e Neomarkers<sup>®</sup> para VEGF-3.

**Tabela 3** - Graduação da reação de acordo com a intensidade.

Característica	Grau
Coloração negativa	0
Coloração de intensidade fraca	1
Coloração de intensidade moderada	2
Coloração de intensidade forte	3

**Tabela 4** - Graduação da reação de acordo com o número de células coradas.

Característica	Grau
Nenhuma célula positiva	0
<10% das células positivas	1
10-50% das células positivas	2
51-75% das células positivas	3
>75% das células positivas	4

O score final se dará pela soma entre a intensidade da reação e o número de células coradas segundo a tabela abaixo.

**Tabela 5**- Score final (intensidade + número de células).

Classificação	Score
Negativo	0 a 2
Positivo fraco	3 a 4
Positivo forte	5 a 7

Os passos técnicos das reações de imunistoquímica podem ser vistos no Anexo 4.

### 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A casuística foi caracterizada através da estatística descritiva, empregando-se o cálculo de média, desvio padrão e frequências absoluta e relativa das variáveis.

Para a análise de associação entre as variáveis quantitativas empregou-se o teste de qui-quadrado de Pearson ou o teste exato de Fisher, dependendo-se dos valores esperados das tabelas de contingência.

A análise de sobrevida global foi realizada pelo método de Kaplan-Meier, sendo as curvas comparadas pelo teste de long-rank. Para tanto, calculou-se o intervalo de acompanhamento com base nas datas da cirurgia e da última informação objetiva em prontuário. Em todos os testes estatísticos adotou-se o nível de significância de 5%.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DA CASUÍSTICA

Do grupo de 188 pacientes pré-selecionado, 119 (63,3%) eram portadoras de adenocarcinoma de endométrio e 69 (36,7%) apresentavam doenças não neoplásicas. Destas patologias benignas, 45 (23,9%) eram pólipos endometriais, 11 (5,9%) hiperplasias típicas e 13 (6,9%) hiperplasias atípicas (Tabela 6).

A idade média das pacientes foi de  $65,9 \pm 8,8$  anos com mediana de 65 anos, sendo a mais nova com 43 anos e a mais idosa com 87 anos (Tabela 6)

O tempo médio de menopausa foi de  $15,3 \pm 8,7$  anos com mediana de 15 anos (em duas pacientes não havia tal informação no prontuário). O tempo mínimo averiguado foi de 1 ano (3 pacientes) com máximo de 40 anos (1 paciente) (Tabela 6)

Do total de pacientes, 22 (11,7%) faziam uso de tamoxifeno por um período que oscilou entre 4 meses (1 paciente) e 70 meses (1 paciente). O tempo médio de utilização do medicamento até a realização do procedimento foi de  $28,9 \pm 19,2$  meses com mediana de 27 meses. (Tabela 6)

Em relação à etnia, 163 (86,7%) pacientes eram brancas, 25 (13,3%) não brancas, sendo duas (1,1%) negras e 23 (12,2%) amarelas (Tabela 6)

**Tabela 6** – Caracterização da casuística segundo o padrão anatomo-patológico e variáveis clínico demográficas. (Hospital do Câncer A. C. Camargo, 1991 a 2005).

	Adenocarcinoma	Pólipos	Hiperplasia Típica	Hiperplasia Atípica	Total
Idade (média/anos)	68,8	65,18	60,73	64,54	65,9
Tempo de menopausa (média/anos)	15,73	14,47	13,64	15,77	15,3
Uso de tamoxifeno (sim/não)	5 / 114	12 / 33	1 / 10	4 / 9	22 / 166
Etnia (branca/não branca)	103 / 16	40 / 5	11 / 0	9 / 4	163 / 25

Quanto ao primeiro sintoma apresentado pelas pacientes, 131 (69,7%) apresentaram sangramento genital, 54 (28,7%) alteração em exame de ultrassonografia, uma (0,5%) paciente foi admitida com biópsia prévia e duas não tinham esta informação em prontuário.

O procedimento realizado como tratamento e/ou investigação nas pacientes foram: três (1,6%) foram submetidas à histerectomia simples (via abdominal ou via vaginal), 59 (31,4%) à histerectomia total com anexectomia bilateral, 85 (45,2%) à histerectomia total abdominal com anexectomia bilateral e linfadenectomia e 41 (21,8%) à histeroscopia ou curetagem uterina de prova.

## 4.2 EXPRESSÃO DOS MARCADORES COX-2, VEGF-1 E VEGF-3

Do grupo total estudado, 24 (12,8%) das pacientes apresentaram expressão negativa para COX-2, 29 (15,4%) expressão positiva fraca, 126 (67%) expressão positiva forte, e 9 (4,8%) não tiveram sua expressão analisada por perdas (Tabela 7).

**Tabela 7** - Número e porcentagem de casos segundo a expressão de COX-2. (Hospital do Câncer A. C. Camargo, 1991 a 2006).

	Frequência (n)	Total (%)	Total válido (%)
Negativo	24	12,8	13,4
Positivo Fraco	29	15,4	16,2
Positivo Forte	126	67	70,4
Perdas	9	4,8	0
<i>Total</i>	<i>188</i>	<i>100</i>	<i>100</i>

A análise da expressão de VEGF-1 seguiu os mesmos critérios utilizados para COX-2, e apresentou 20 (10,6%) pacientes com expressão negativa, 37 (19,7%) com expressão positiva fraca, 121 (64,4%) com expressão positiva forte e 10 (5,3%) não tiveram sua expressão analisada por perdas (Tabela 8)

**Tabela 8** - Número e porcentagem de casos segundo a expressão de VEGF-1. (Hospital do Câncer A. C. Camargo, 1991 a 2004)

	Frequência (n)	Total (%)	Total válido (%)
Negativo	20	10,6	11,2
Positivo Fraco	37	19,7	20,8
Positivo Forte	121	64,4	68
Perdas	10	5,3	0
<i>Total</i>	<i>188</i>	<i>100</i>	<i>100</i>

A análise da expressão de VEGF-3 seguiu os mesmos critérios anteriores e revelou 17 (9%) pacientes com expressão positiva fraca, 162 (86,2%) com expressão positiva forte e nove onde não foi possível a análise devido a perdas. Nenhuma paciente apresentou expressão negativa ao marcador (Tabela 9)

**Tabela 9** - Número e porcentagem de casos segundo a expressão de VEGF-3. (Hospital do Câncer A. C. Camargo, 1991 a 2004).

	Frequência (n)	Total (%)	Total válido (%)
Negativo	0	0	0
Positivo Fraco	17	9	9,5
Positivo Forte	162	86,2	90,5
Perdas	9	4,8	0
<i>Total</i>	<i>188</i>	<i>100</i>	<i>100</i>

### 4.3 PACIENTES COM ADENOCARCINOMAS

A análise isolada de cada grupo de patologia demonstrou, no grupo de adenocarcinomas, uma idade média de  $66,8 \pm 9.1$  anos com mediana de 66 anos e tempo médio de menopausa de  $15,7 \pm 9$  anos com mediana de 15 anos.

Quanto à etnia houve um predomínio de pacientes da raça branca, 86,6% (103) e 13,4% (16) de pacientes não brancas. O primeiro sintoma relatado pelas pacientes foi em 88% dos casos o sangramento vaginal pós-menopausa, seguido de alterações em ultrassonografia de rotina em 12% das pacientes. 95,8% (114) das pacientes não referiam uso prévio de tamoxifeno e 4,2% (5) estavam em uso do medicamento por um tempo médio de 44 meses.

Em pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma a expressão de COX-2 apresentou a seguinte distribuição: 8 (7%) pacientes apresentaram expressão negativa, 15 (13%) expressão positivo fraco e 92 (80%) expressão positivo forte (Tabela 10).

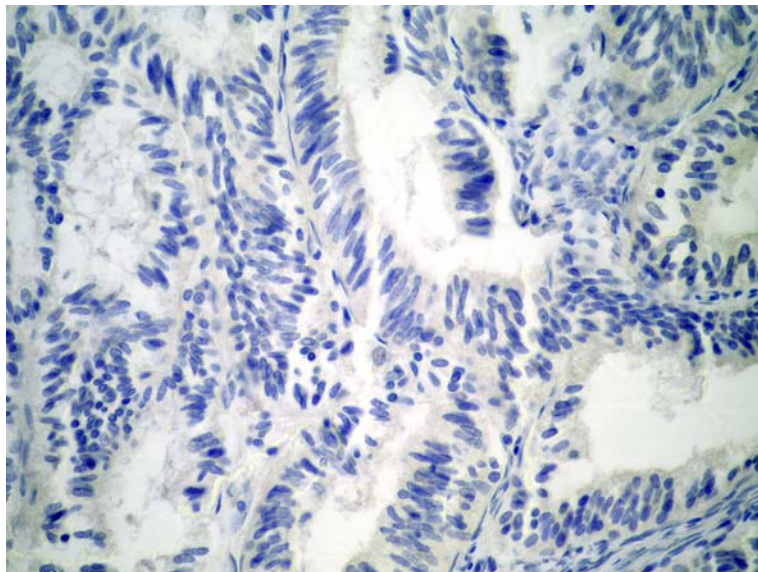
Na análise de expressão de VEGF-1, 4 (3,5%) das pacientes com adenocarcinomas não expressaram VEGF-1, 11 (9,6%) tiveram expressão positivo fraco, e 100 (87%) expressão positivo forte (Tabela 10).

Na análise de expressão de VEGF-3 em pacientes com adenocarcinomas, não houve casos com expressão negativa, 5 (4,4%) apresentaram expressão positivo fraco e 109 (95,6%) expressão positivo forte (Tabela 10).

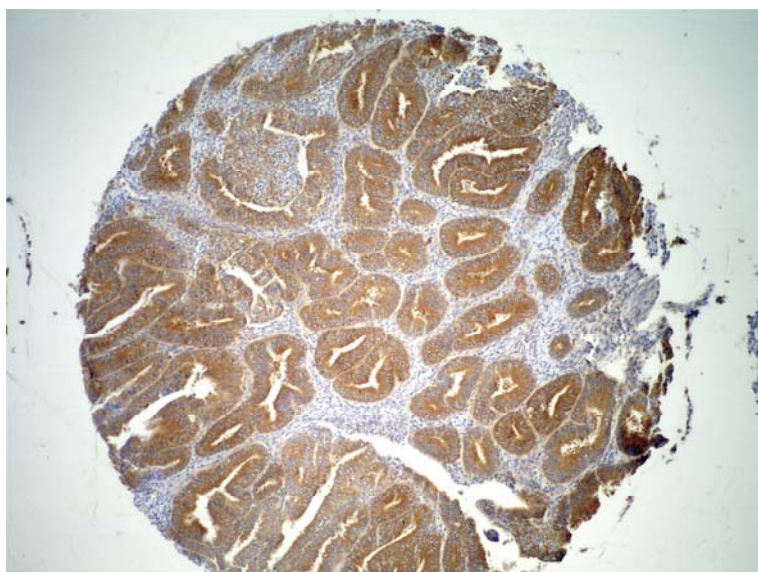
**Tabela 10** – Número e porcentagem de casos com adenocarcinoma segundo a expressão de COX-2, VEGF-1 e VEGF-3. (Hospital do Câncer A. C. Camargo, 1991 a 2004).

	COX-2 (n)	VEGF-1 (n)	VEGF-3 (n)
Negativo	8 (7%)	4 (3,5%)	0 (0%)
Positivo fraco	15 (13%)	11 (9,6%)	5 (4,4%)
Positivo forte	92 (80%)	100 (87%)	109 (95,6%)
<i>Total</i>	<i>115 (100%)</i>	<i>115 (100%)</i>	<i>114 (100%)</i>



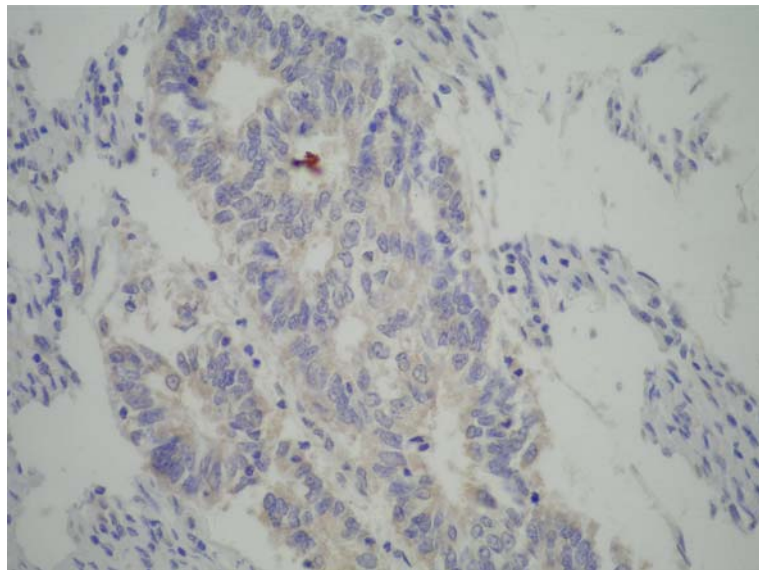


A – Expressão negativa

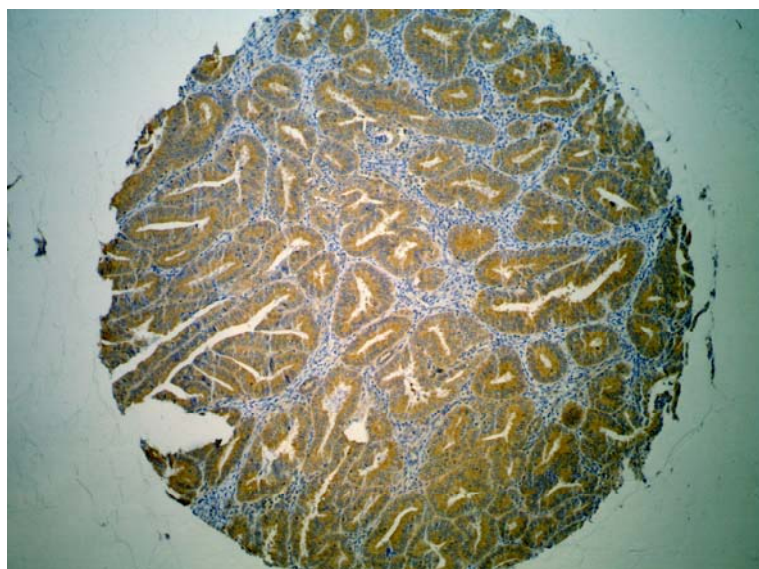


B – Expressão positiva forte

**Figura 1** – Imagem microscópica da expressão de COX-2 em carcinomas endometrióides.

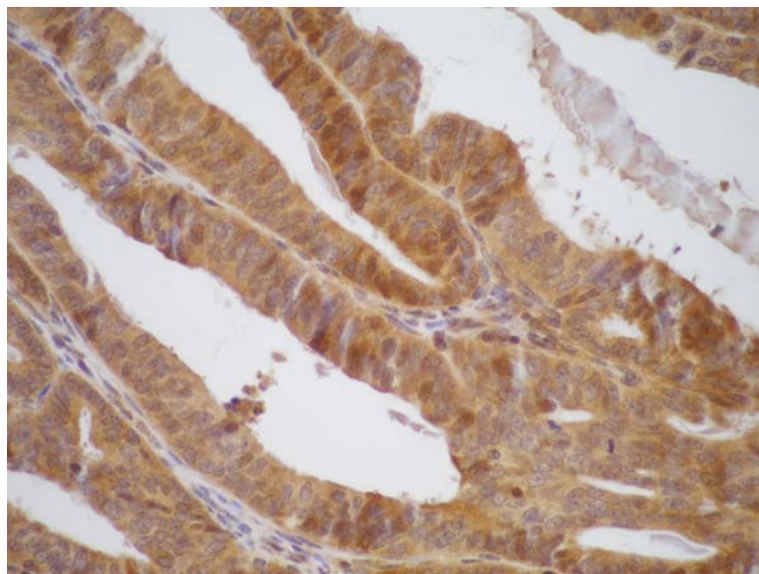


A – Expressão positivo fraco

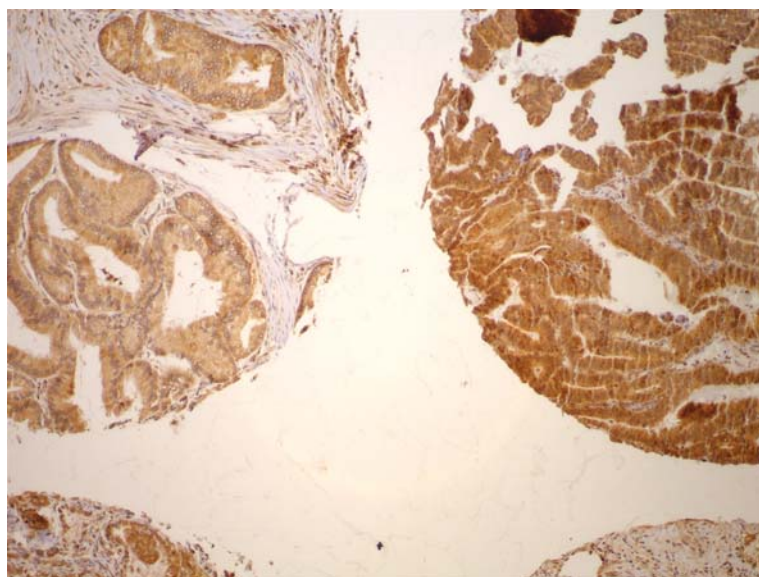


B – Expressão positivo forte

**Figura 2** – Imagem microscópica da expressão de VEGF-1 em carcinomas endometrióides.



A – Expressão positivo forte



B – Expressão positivo fraco à esquerda e positivo forte à direita

**Figura 3** – Imagem microscópica da expressão de VEGF-3 em carcinomas endometrióides.

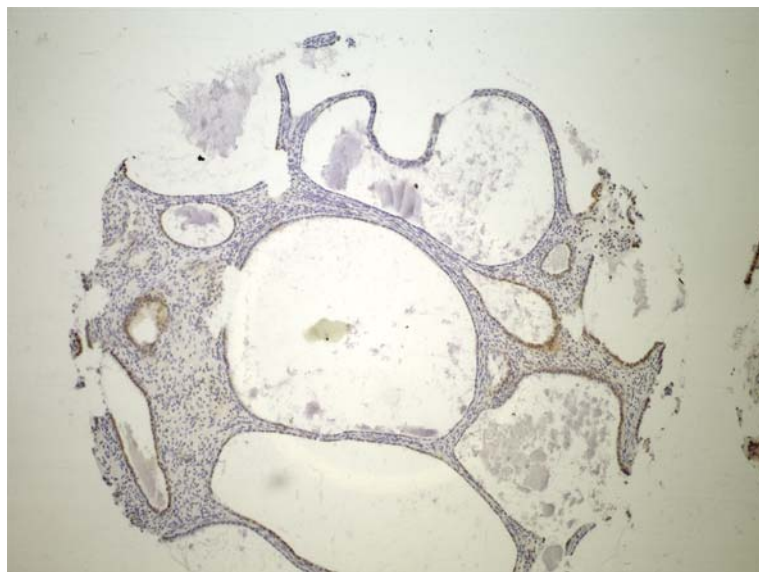
#### 4.4 PACIENTES COM PÓLIPOS

No grupo de pacientes com pólipos, a idade média foi de  $65,1 \pm 8,3$  anos, com mediana de 66 anos e um tempo de menopausa médio de  $14,4 \pm 8,3$  anos com mediana de 15 anos. Houve um predomínio de pacientes da raça branca (88,9%, n=40) em relação a não brancas (11,1%, n=5). O primeiro sintoma apresentado pelas pacientes foi em 66,7% (30) dos casos sangramento genital pós-menopausa, e em 33,3% (15) das pacientes achado de exame ultrassonográfico. Doze (26,7%) pacientes faziam uso de tamoxifeno no momento da cirurgia com tempo médio de utilização de 25 meses.

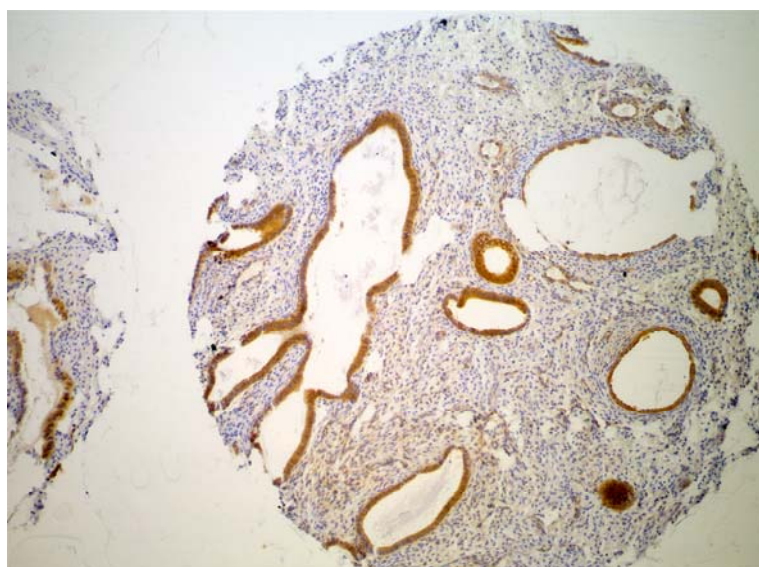
Em relação à expressão de COX-2, 24,4% (10) das pacientes não apresentaram expressão ao COX-2, 22% (9) delas tiveram expressão positivo fraco e 53,7% (22) expressão positivo forte. No caso de VEGF-1, 26,8% (11) não expressaram VEGF-1, 36,6% (15), tiveram expressão positivo fraco, e 36,6% (15) expressão positivo forte. Para VEGF-3 não houve casos de expressão negativa, com 19% (8) de expressão positivo fraco e 81% (34) de expressão positivo forte (Tabela 11).

**Tabela 11** - Número e porcentagem de casos com pólipos segundo a expressão de COX-1, VEGF-1 e VEGF-3. (Hospital do Câncer A. C. Camargo, 1991 a 2004).

	COX-2 (n)	VEGF-1 (n)	VEGF-3 (n)
Negativo	10 (24,4%)	11 (26,8%)	0 (0%)
Positivo fraco	9 (22%)	15 (36,6%)	8 (19%)
Positivo forte	22 (53,7%)	15 (36,6%)	34 (81%)
<i>Total</i>	<i>41 (100%)</i>	<i>41 (100%)</i>	<i>42 (100%)</i>

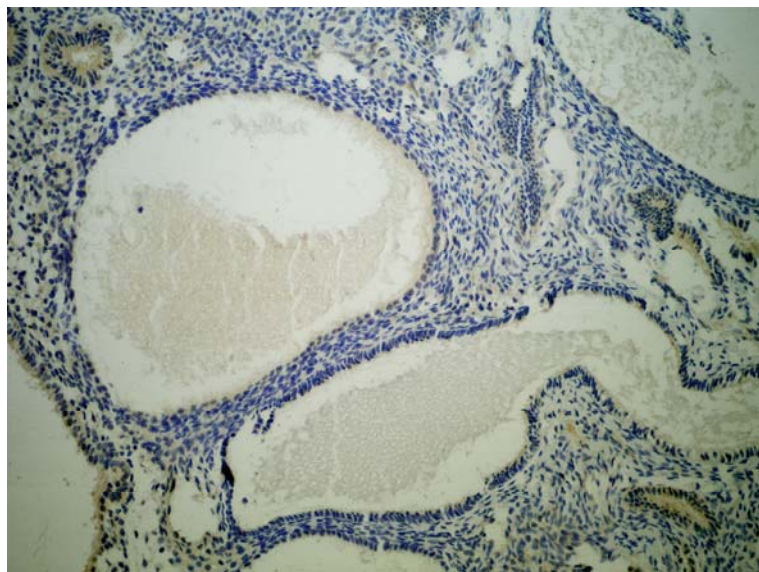


A - Expressão positivo fraco

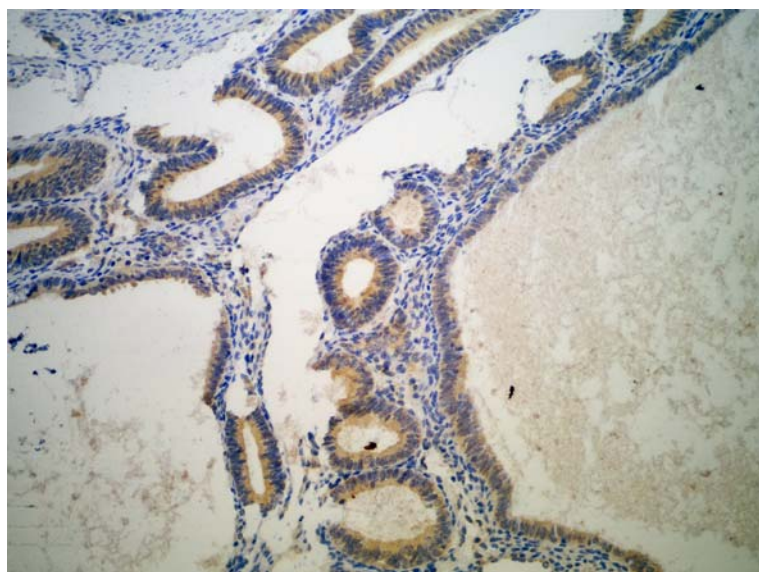


B - Expressão positivo forte

**Figura 4** – Imagem microscópica da expressão de COX-2 em pólipos endometriais.

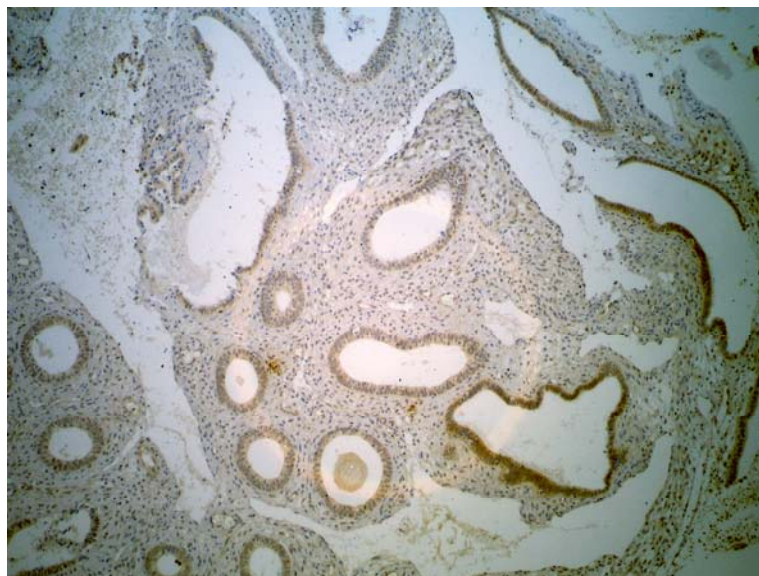


A – Expressão negativo

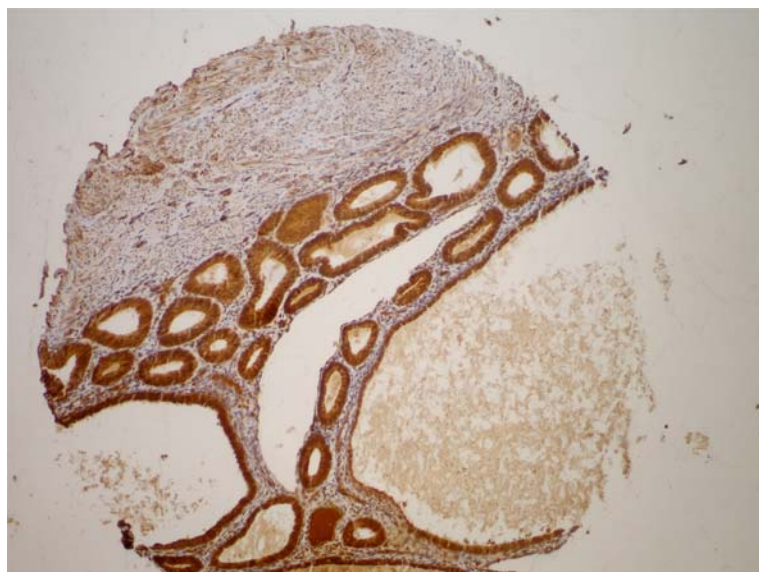


B – Expressão positivo forte

**Figura 5** – Imagem microscópica da expressão de VEGF-1 em pólipos endometriais.



A – Expressão positivo fraco



B- Expressão positivo forte

**Figura 6** – Imagem microscópica da expressão de VEGF-3 em pólipos endometriais.

#### 4.5 PACIENTES COM HIPERPLASIAS ATÍPICAS

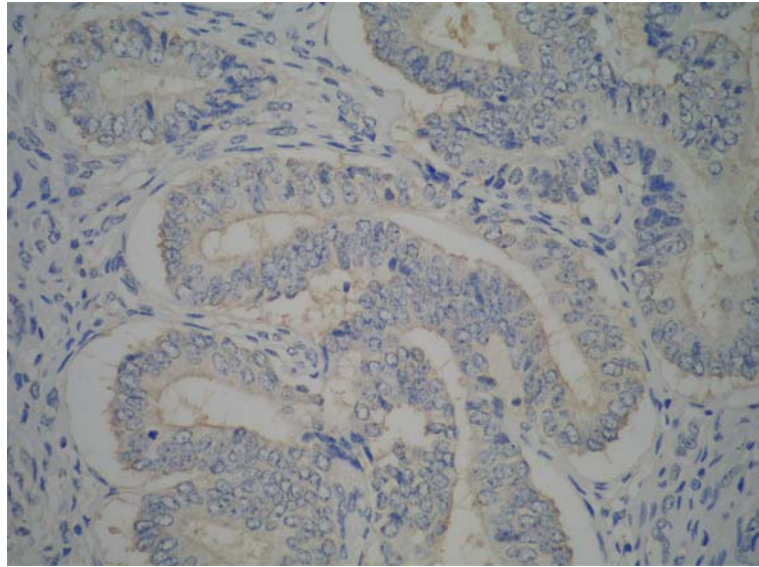
No grupo de hiperplasias atípicas, a idade média foi de  $64,5 \pm 7,5$  anos com mediana de 63 anos e um tempo médio de menopausa de  $15,7 \pm 9,7$  anos e mediana de 15 anos. Quanto à etnia, 9 (69,2%) pacientes eram brancas e 4 (30,8%) não brancas. O primeiro sintoma foi de sangramento em 46,2% (6) das pacientes, alteração ao ultrassonografia em 46,2% (6) das pacientes e uma (7,7%) paciente deu entrada no serviço com biópsia prévia. Das 13 pacientes, 9 (69,2%) não faziam uso de tamoxifeno e 4 (30,8%) o faziam por um período médio de 22,5 meses.

Em relação à expressão de COX-2, 25% (3) apresentaram expressão negativa, 25% (3) expressão positivo fraco, e 50% (6) expressão positivo forte. Para VEGF-1, 33,3% (4) apresentaram expressão negativa, 58,3% (7) expressão positivo fraco, e 7,7% (1) expressão positivo forte. No caso de VEGF-3 não houve pacientes com expressão negativa, 33,3% (4) obtiveram expressão positivo fraco e 66,7% (12) positivo forte (Tabela 12).

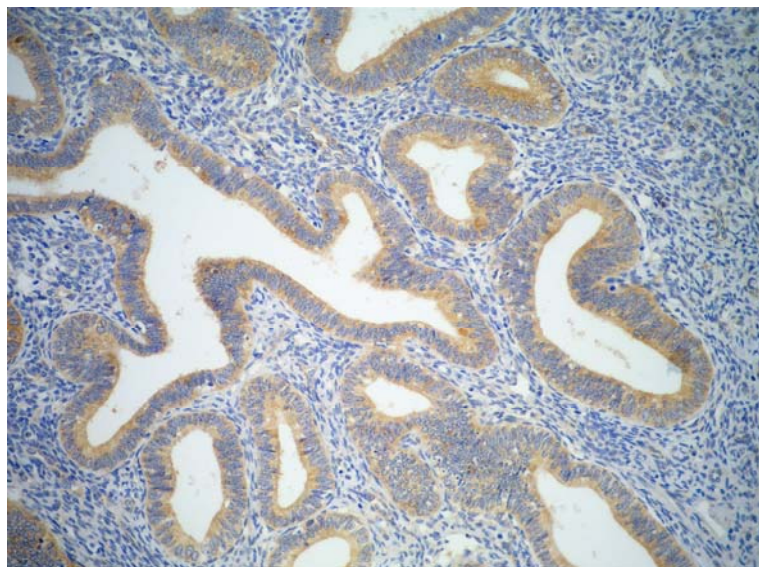
**Tabela 12** - Número e porcentagem de casos com hiperplasias atípicas segundo a expressão de COX-1, VEGF-1 e VEGF-3. (Hospital do Câncer A. C. Camargo, 1991 a 2004).

	COX-2 (n)	VEGF-1 (n)	VEGF-3 (n)
Negativo	3 (25%)	4 (33,3%)	0 (0%)
Positivo fraco	3 (25%)	7 (58,3%)	4 (33,3%)
Positivo forte	6 (50%)	1 (7,7%)	8 (66,7%)
<i>Total</i>	<i>12 (100%)</i>	<i>12 (100%)</i>	<i>12 (100%)</i>



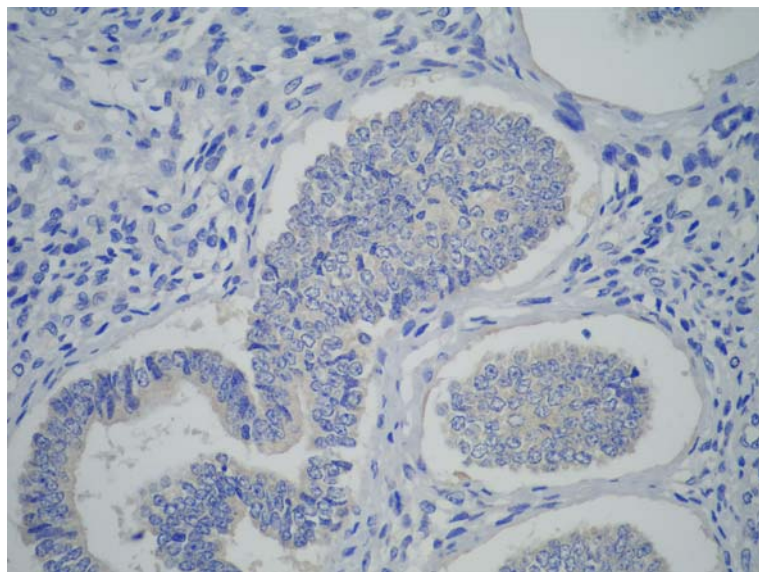


A – Expressão positivo fraco

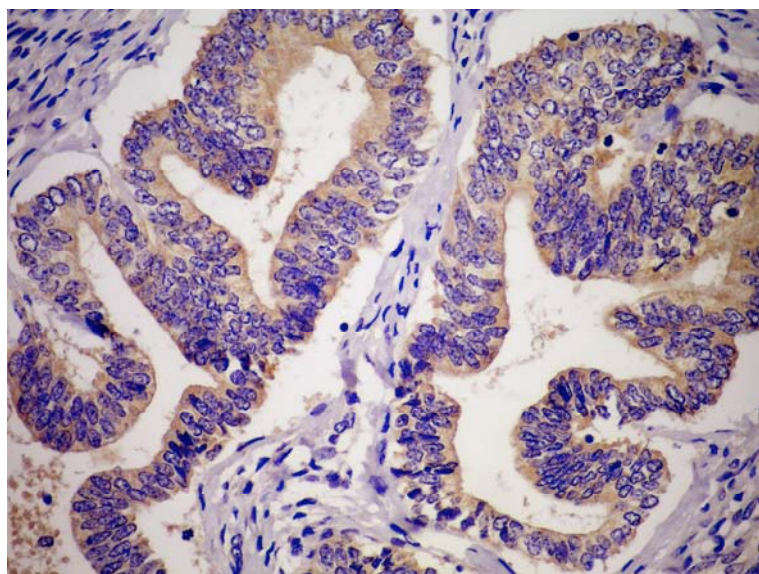


B - Expressão positivo forte

**Figura 7** – Imagem microscópica da expressão de COX-2 em hiperplasias atípicas.

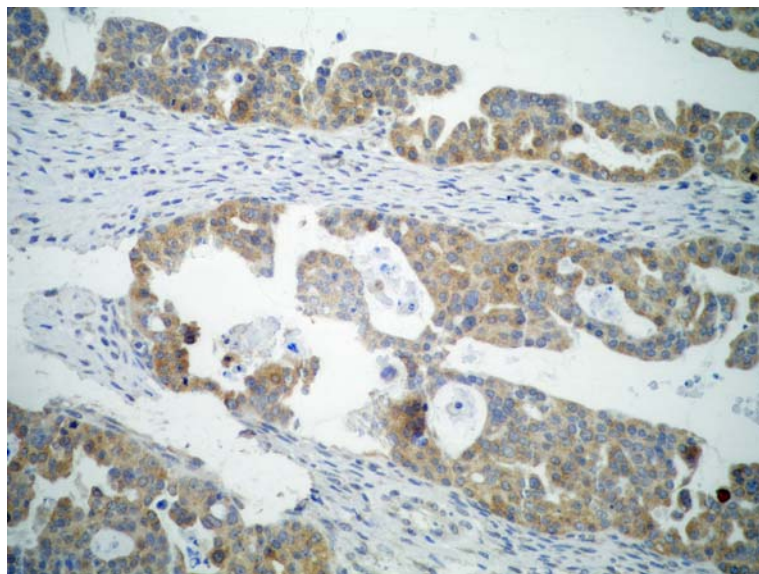


A – Expressão negativa



B – Expressão positivo forte

**Figura 8** – Imagem microscópica da expressão de VEGF-1 em hiperplasias atípicas.



A – Expressão positivo forte

**Figura 9** – Imagem microscópica de expressão de VEGF-3 em hiperplasias atípicas.

#### 4.6 PACIENTES COM HIPERPLASIAS TÍPICAS

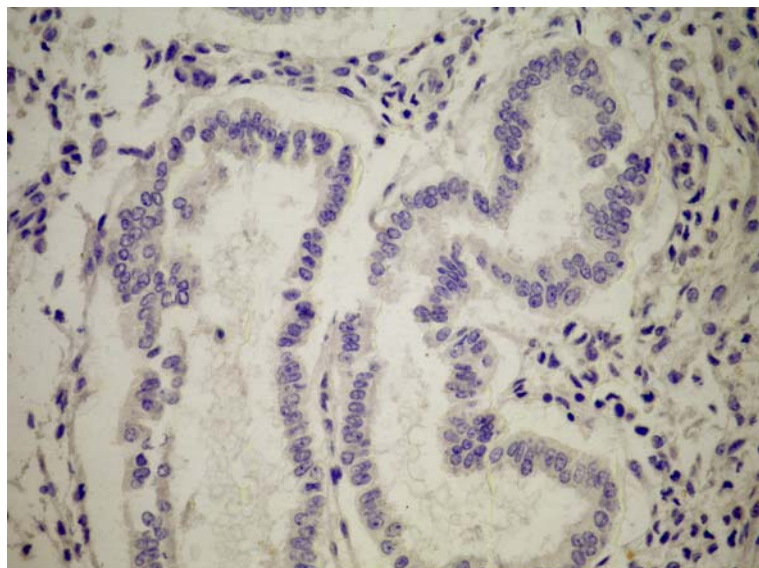
As pacientes com diagnóstico de hiperplasias típicas apresentaram média de idade de  $60,7 \pm 7,7$  anos com mediana de 61 anos, e tempo médio de menopausa de  $13,6 \pm 7,6$  anos e mediana de 12 anos. Todas as pacientes (100%) eram da raça branca, 63,6% (7) apresentaram sangramento pós-menopausa como queixa a admissão e 16,4% (4) foram submetidas a procedimento por alteração ao exame de ultrassonografia. Somente uma paciente (9,1%) fazia uso prévio de tamoxifeno por um período de 27 meses.

A análise da expressão de COX-2 demonstrou 27,3% (3) da expressão negativa, 18,2% (2) de expressão positivo fraco e 54,5% (6) de expressão positivo forte. Para VEGF-1, 10% (1) de expressão negativa, 40% (4) expressão positivo

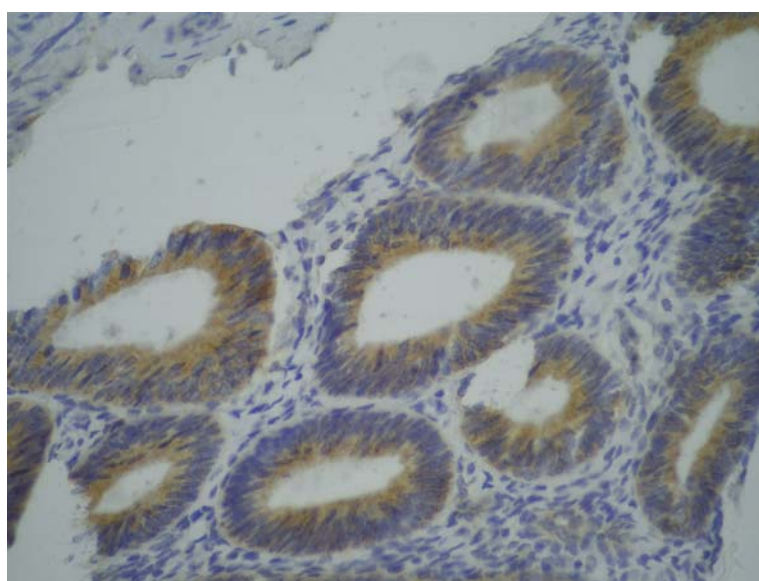
fraco e 50% (5) expressão positivo forte. Todos os casos apresentaram expressão positiva forte para VEGF-3 (Tabela 13)

**Tabela 13** - Número e porcentagem de casos com hiperplasias típicas segundo a expressão de COX-1, VEGF-1 e VEGF-3. (Hospital do Câncer A. C. Camargo, 1991 a 2004).

	COX-2 (n)	VEGF-1 (n)	VEGF-3 (n)
Negativo	3 (27,3%)	1 (10%)	0 (0%)
Positivo fraco	2 (18,2%)	4 (40%)	0 (0%)
Positivo forte	6 (54,5%)	5 (50%)	11 (100%)
<i>Total</i>	<i>11 (100%)</i>	<i>10 (100%)</i>	<i>11 (100%)</i>

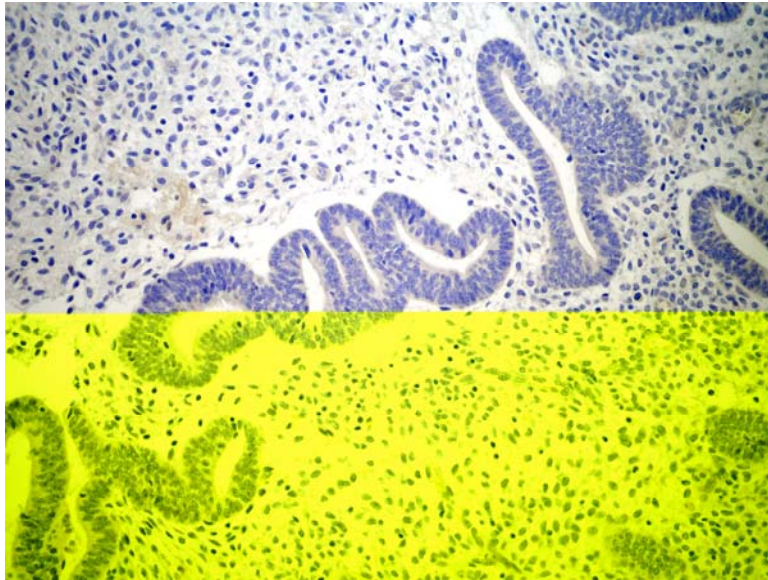


A - Expressão negativa

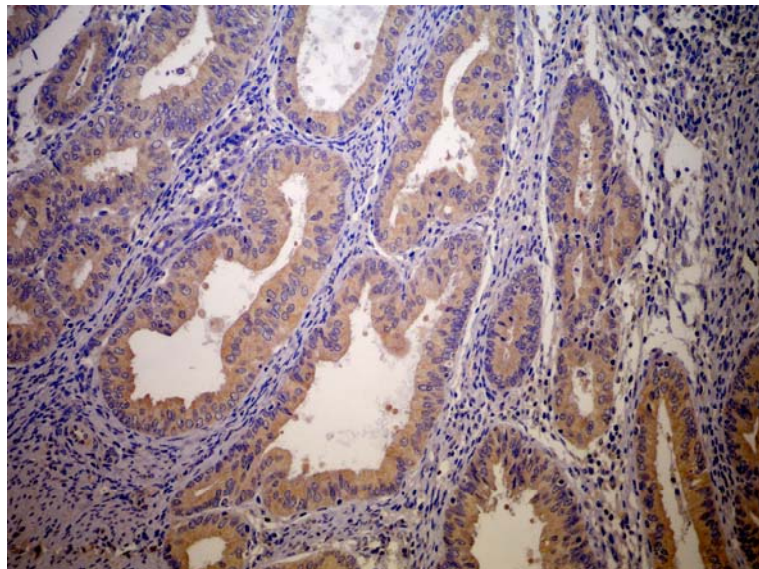


B- Expressão positivo forte

**Figura 10** – Imagem microscópica da expressão de COX-2 em hiperplasias típicas.

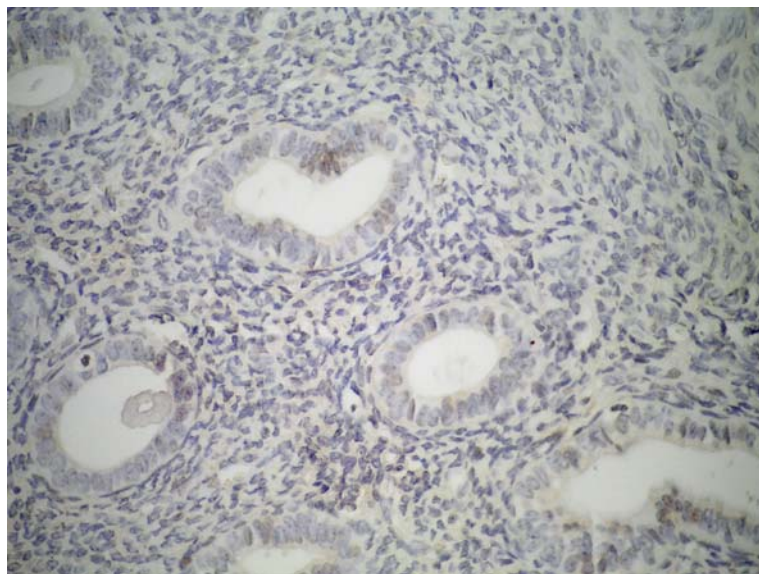


A - Expressão negativo

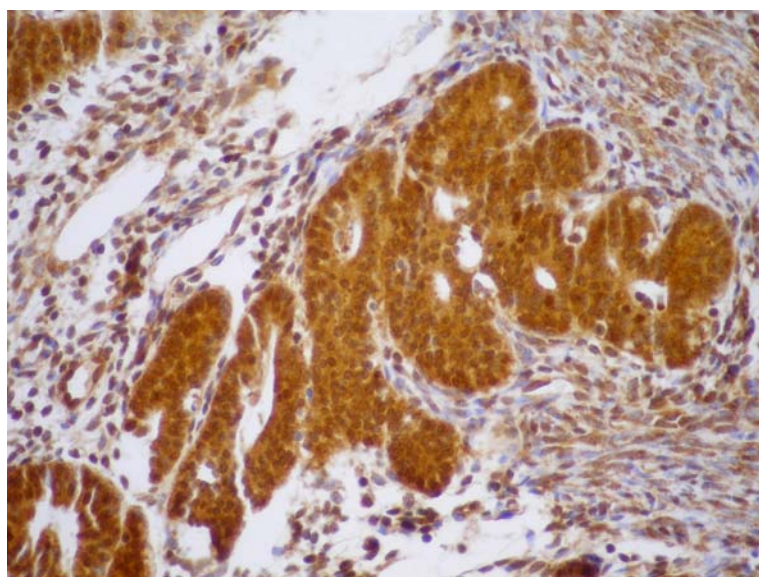


B – Expressão positivo forte

**Figura 11** – Imagem microscópica da expressão de VEGF-1 em hiperplasias típicas.

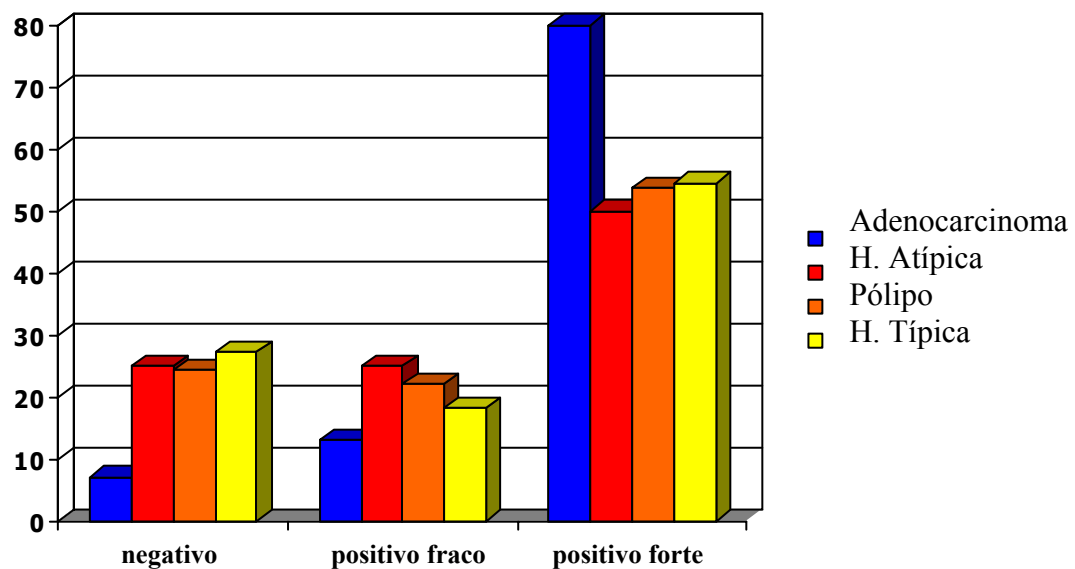


A – Expressão negativa

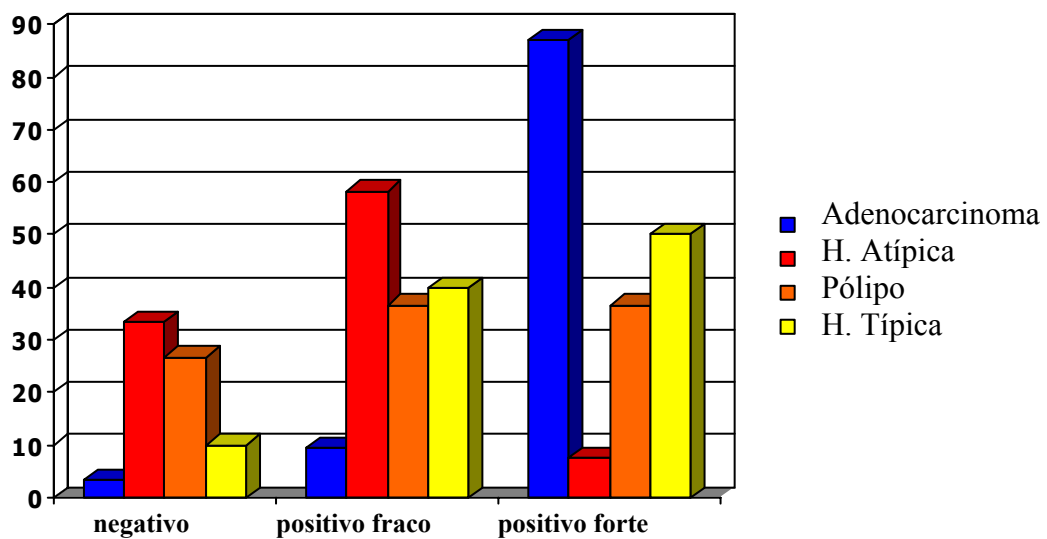


B – Expressão positiva forte

**Figura 12** – Imagem microscópica da expressão de VEGF-3 em hiperplasias típicas.

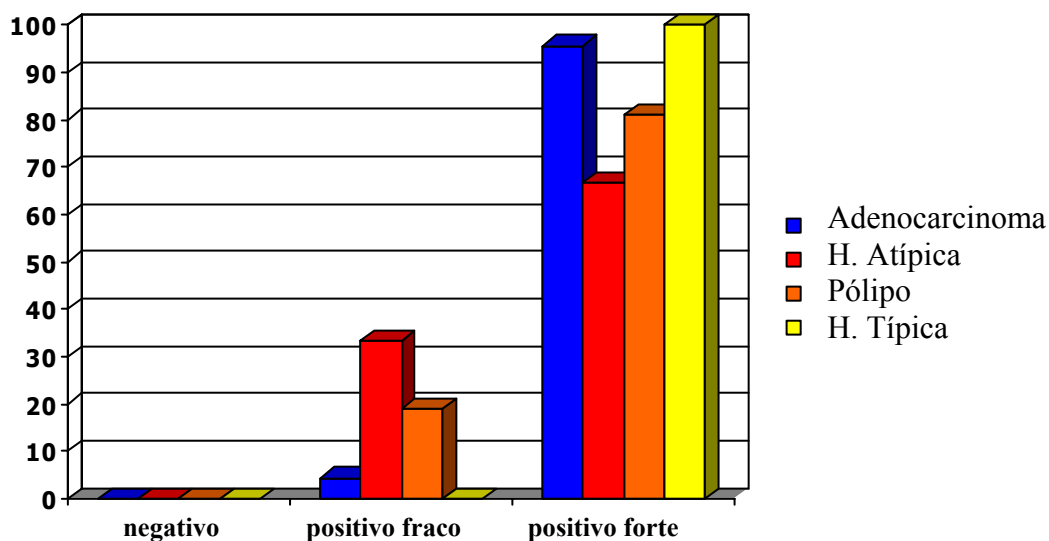


**Figura 13** - Gráfico da expressão de COX-2 nas diferentes doenças.



**Figura 14** - Gráfico da expressão de VEGF-1 nas diferentes doenças.





**Figura 15** - Gráfico de expressão de VEGF-3 nas diferentes doenças.

#### **4.7 COMPARAÇÃO DOS ADENOCARCINOMAS COM OS DEMAIS GRUPOS**

Após separação do grupo de carcinomas do restante da amostra (pólipos, hiperplasias típicas e hiperplasias atípicas), observou-se não haver diferença significativa quanto à idade à admissão (66,8 anos no grupo de carcinomas e 64,35 anos no grupo não neoplásico), tempo de menopausa (15,73 anos no grupo de carcinomas e 14,58 anos no grupo não neoplásico), raça (86,6% de brancas e 13,4% de não brancas no grupo dos carcinomas e 87% brancas e 13% não brancas no grupo não neoplásico) (Tabela 14).

Em relação ao primeiro sintoma apresentado pelas pacientes, no grupo de carcinomas, 103 (88%) das pacientes apresentaram sangramento, 14 (12%) apresentaram alteração ao exame de ultrassonografia de rotina, enquanto no grupo de

lesões não neoplásicas, 28 (40,6%) das pacientes apresentaram sangramento, 40 (58%) pacientes apresentaram alteração ao exame de ultrassonografia de rotina e uma (1,4%) paciente apresentou-se com biópsia prévia (Tabela 14).

**Tabela 14** – Comparação entre o adenocarcinoma e as doenças benignas segundo variáveis clínico demográficas. (Hospital A. C. Camargo, 1991 a 2004).

	Idade à admissão (média/ anos)	Raça (Branca / não Branca)	Tempo de menopausa (anos)	1º sintoma (sangramento / não sangramento)
Adenocarcinomas	66,80	103 / 16	15,73	103 / 14
Patologias benignas	64,35	60 / 9	14,58	28 / 40
<i>p= 0, 563</i>				<b>P &lt; 0, 001</b>

Quanto à expressão de COX-2 no grupo de carcinomas, oito (7%) pacientes apresentaram expressão negativa, 15 (13%) expressão positivo fraco e 92 (80%) expressão positivo forte, enquanto no grupo de lesão não neoplásicas, 16 (25%) das pacientes apresentaram expressão negativa, 14 (21,9%) expressão positivo fraco e 34 (53,1%) expressão positivo forte.

Em relação à expressão de VEGF-1, no grupo de carcinomas, quatro (3,5%) pacientes apresentaram expressão negativa, 11 (9,6%) expressão positivo fraco, 100 (87%) expressão positivo forte, enquanto no grupo de lesões não neoplásicas, 16 (25,4%) apresentaram expressão negativa, 26 (41,3%) expressão positivo fraco, 21 (33,3%) expressão positivo forte.

Na análise de expressão de VEGF-3 não houve casos de expressão negativa nos dois grupos, sendo que no grupo dos carcinomas, cinco (4,4%) pacientes

apresentaram expressão positivo fraco e 109 (95,6%) pacientes expressão positivo forte, enquanto no grupo das lesões não neoplásicas, 12 (18,5%) das pacientes apresentaram expressão positivo fraco e 53 (81,5%) das pacientes expressão positivo forte.

Após separação e novo agrupamento das pacientes que tiveram expressão negativa com as pacientes que obtiveram expressão positiva fraca em comparação com as pacientes com expressão positiva forte para COX-2, 23 (20%) das pacientes com carcinoma apresentaram expressão negativo/positivo fraco e 92 (80%) apresentaram expressão positivo forte, enquanto no grupo das lesões não neoplásicas, 30 (46,9%) destas apresentaram expressão negativo/positivo fraco e 34 (53,1%) expressão positivo forte, mostrando diferença significativa ( $p < 0,001$ ).

Em relação à expressão de VEGF-1, seguindo o mesmo agrupamento negativo e positivo fraco versus positivo forte, observou-se que no grupo dos carcinomas, 15 (13%) das pacientes apresentaram expressão negativo/positivo fraco, com 100 (87%) das pacientes com expressão positivo forte, enquanto no grupo das lesões não neoplásicas 42 (66,7%) das pacientes apresentaram expressão negativo/positivo fraco, com 21 (33,3%) apresentando expressão positivo forte, resultados estes com significância estatística ( $p < 0,001$ ).

Em relação à expressão de VEGF-3, 5 (4,4%) das pacientes com carcinomas apresentaram expressão negativo/positivo fraco, e 109 (95,6%) expressão positivo forte, enquanto no grupo das lesões não neoplásicas, 12 (18,5%) apresentaram expressão negativo/positivo fraco e 53 (81,5%) expressão positivo forte, com diferença significativa entre os grupos ( $p = 0,003$ ). (Tabela 15)

**Tabela 15** - Comparação entre o adenocarcinoma e as doenças benignas segundo as expressões de COX-2, VEGF-1 e VEGF-3. (Hospital A. C. Camargo, 1991 a 2004).

	Categoria	Adenocarcinoma		Doenças benignas		p*
		n	%	n	%	
COX-2	(-) / (+) fraco	23	20	30	46,9	<b>&lt;0,001</b>
	(+) forte	92	80	34	53,1	
VEGF-1	(-) / (+) fraco	15	13	42	66,7	<b>&lt;0,001</b>
	(+) forte	100	87	21	33,3	
VEGF-3	(-) / (+) fraco	5	4,4	12	18,5	<b>0,003</b>
	(+) forte	109	95,6	53	81,5	

\* Valores de p pelo teste de Qui-quadrado

A análise isolada comparativa entre os grupos de carcinomas e hiperplasias atípicas não demonstrou diferença significativa em relação à raça ( $p=0,111$ ). Em relação ao primeiro sintoma que originou a investigação endometrial houve diferença entre os grupos ( $p=0,003$ ), onde no grupo de carcinomas, 103 (88%) das pacientes apresentaram-se com queixa de sangramento genital, enquanto que no grupo das hiperplasias atípicas somente seis (50%). Em comparação a alteração ultrassonográfica também houve diferença significativa entre os grupos ( $p=0,003$ ), com 14 (12%) pacientes com carcinomas tendo a alteração radiológica como motivo do rastreamento, enquanto no grupo das hiperplasias seis (50%) pacientes.

A análise comparativa dos grupos em relação à expressão de COX-2 demonstrou que houve diferença estatisticamente significativa ( $p=0,029$ ), com 23 (20%) pacientes para carcinoma com expressão negativo/positivo fraco, e, 92 (80%) pacientes de carcinomas com expressão positivo forte, enquanto no grupo das hiperplasias atípicas, seis (50%) pacientes apresentaram expressão negativo/positivo fraco e seis (50%) expressão positivo forte.

A expressão dos grupos em relação à VEGF-1 foi estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ) com 15 (13%) pacientes do grupo de carcinomas com

expressão negativo/positivo fraco e 100 (87%) pacientes com expressão positivo forte, enquanto no grupo das hiperplasias atípicas somente uma (8,7%) paciente expressou positivo forte, com 11 (91,7%) das pacientes com expressão negativo/positivo fraco.

A expressão dos grupos em relação à VEGF-3 foi também estatisticamente significativa ( $p= 0, 005$ ) com cinco (4,4%) pacientes do grupo dos carcinomas expressando negativo/positivo fraco e 109 (95,6%) expressando positivo forte, enquanto no grupo de hiperplasias atípicas quatro (33,3%) expressaram negativo/positivo fraco e oito (66,7%) positivo forte. (Tabela 16)

**Tabela 16** - Comparação entre o adenocarcinoma e as hiperplasias atípicas segundo as expressões de COX-2, VEGF-1 e VEGF-3. (Hospital A. C. Camargo, 1991 a 2004).

	Categoria	Adenocarcinoma		Hiperplasia atípica		p*
		n	%	n	%	
COX-2	(-) / (+) fraco	23	20	6	50	<b>0,029</b>
	(+) forte	92	80	6	50	
VEGF-1	(-) / (+) fraco	15	13	11	91,7	<b>&lt;0,001</b>
	(+) forte	100	87	1	8,3	
VEGF-3	(-)/(+) fraco	5	4,4	4	33,3	<b>0,005</b>
	(+) forte	109	95,6	8	66,7	

\* Valores de p pelo teste de Qui-quadrado

#### 4.8 COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS DE LESÕES BENIGNAS

A análise comparativa entre os grupos de hiperplasias atípicas e pólipos/hiperplasias típicas não demonstrou diferença significativa em relação à raça ( $p=0,057$ ), sangramento ( $p=0,532$ ), alteração ultrassonográfica como primeiro sintoma ( $p=0,532$ ), ou uso prévio de tamoxifeno ( $p=0,722$ ).

Também não houve significância estatística em relação à expressão de COX-2 ( $p= 1,000$ ), com 24 (46,2%) das pacientes com pólipos/hiperplasia típica expressando negativo/positivo fraco e 28 (53,8%) expressando positivo forte, enquanto no grupo das hiperplasias atípicas, seis (50%) pacientes expressaram negativo/positivo fraco e seis (50%) positivo forte.

A expressão de VEGF-1 nos grupos não mostrou diferença significativa ( $p=0,048$ ) com 31 (60,8%) pacientes com pólipos/hiperplasias típicas expressando negativo/positivo fraco e 20 (39,2%) positivo forte, e no grupo das hiperplasias atípicas, 11 (91,7%) das pacientes tiveram expressão negativo/positivo fraco com uma (8,3%) expressão positivo forte.

A expressão de VEGF-3 nos grupos não mostrou diferença significativa ( $p= 0,211$ ), com oito (15,1%) pacientes do grupo pólipos/hiperplasia típica apresentando expressão negativo/positivo fraco e 45 (84,9%) expressão positivo forte, e no grupo das hiperplasias atípicas quatro (33,3%) apresentaram expressão negativo/positivo fraco e oito (66,7%) expressão positivo forte. (Tabela 17)

**Tabela 17** - Comparação entre hiperplasias típicas/ pólipos versus hiperplasias atípicas segundo as expressões de COX-2, VEGF-1 e VEGF-3. (Hospital A. C. Camargo, 1991 a 2004).

	Categoria	H. típica/ Pólipos		Hiperplasia atípica		p*
		n	%	n	%	
COX-2	(-)/(+) fraco	24	46,1	6	50	0,530
	(+) forte	28	53,9	6	50	
VEGF-1	(-) / (+) fraco	31	60,8	11	91,7	<b>0,038</b>
	(+) forte	20	39,2	1	8,3	
VEGF-3	(-) / (+) fraco	8	15,1	4	33,3	0,145
	(+) forte	45	84,9	8	66,7	

\* Valores de p pelo teste de Qui-quadrado

#### 4.9 ASSOCIAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS HISTOPATOLÓGICAS E A EXPRESSÃO DE COX-2, VEGF-1 E VEGF-3

O grau histológico e a expressão de COX-2 nos adenocarcinomas não demonstraram relação estatística significativa ( $p= 0,481$ ), onde oito (34,8%) pacientes COX-2 negativo/positivo fraco eram grau I e 15 (62,5%) grau II e III e, 41 (45,1%) pacientes COX-2 positivo forte eram grau I e 50 (54,9%) pacientes graus II e III.

A expressão de VEGF-1 não demonstrou diferença significativa entre as pacientes com adenocarcinomas dos diversos graus histológicos ( $p=0,091$ ), onde 46 (46,5%) das pacientes VEGF-1 positivo forte eram grau I e 53 (53,3%) graus II e III, enquanto três (20%) pacientes VEGF-1 negativo/positivo fraco eram grau I e 12 (80%) graus II e III.

A expressão de VEGF-3 nos adenocarcinomas também não mostrou relação estatística com o grau histológico ( $p= 0,386$ ), onde 48 (44,4%) das pacientes VEGF-3 positivo forte eram grau I e 60 (55,6%) eram graus II e III, enquanto 1 (20%) pacientes negativo/positivo fraco era grau I e quatro (80%) graus II e III. (Tabela 18)

**Tabela 18** - Análise entre a expressão dos marcadores e o grau histológico.

	Categoria	Grau I/II		Grau III		p*
		n	%	n	%	
COX-2	(-) / (+) fraco	20	19,6	3	25	0,451
	(+) forte	82	80,4	9	75	
VEGF-1	(-) / (+) fraco	14	13,7	1	8,3	0,510
	(+) forte	88	86,3	11	91,7	
VEGF-3	(-) / (+) fraco	5	5	0	0	0,564
	(+) forte	96	95	12	100	

\* Valores de p pelo teste de Qui-quadrado

Não se observou relação entre a expressão de COX-2 e a presença de invasão miometrial nos adenocarcinomas ( $p= 0,088$ ). Em seis (6,5%) pacientes COX-2 positivo forte não foi encontrada invasão miometrial e em 86 (93,5%) foram. Por outro lado, em quatro pacientes COX-2 negativo/positivo fraco não havia invasão miometrial, e em 17 (81%) havia.

A expressão de VEGF-1 também não demonstrou diferença significativa quando relacionada à presença ou não de invasão miometrial ( $p= 0,108$ ), onde em 11 (78,6%) pacientes VEGF-1 negativo/positivo fraco e 92 (92,9%) pacientes VEGF-1 positivo forte havia invasão do miométrio.

A análise entre VEGF-3 e invasão miometrial também não demonstrou diferença significativa ( $p= 0,316$ ), com três (75%) pacientes VEGF-3 negativo/positivo fraco e 99 (91,7%) pacientes VEGF-3 positivo forte apresentando invasão do miométrio. (Tabela 19)

**Tabela 19** - Análise entre a expressão dos marcadores e a presença ou ausência de invasão miometrial.

	Categoria	Ausência		Presença		p*
		n	%	n	%	
COX-2	(-) / (+) fraco	4	40	17	16,5	0,088
	(+) forte	6	60	86	83,5	
VEGF-1	(-) / (+) fraco	3	30	11	10,7	0,108
	(+) forte	7	70	92	89,3	
VEGF-3	(-) / (+) fraco	1	10	3	2,9	0,316
	(+) forte	9	90	99	97,1	

\* Valores de p pelo teste de Qui-quadrado

A expressão de COX-2 também não se relacionou à presença de metástase linfonodal nos adenocarcinomas ( $p= 1$ ). Em 13 (92,9%) pacientes COX-2 negativo/positivo fraco e 60 (89,6%) pacientes COX-2 positivo forte não apresentaram doença linfonodal.



O mesmo achado ocorreu com a expressão de VEGF-1 ( $p= 0,256$ ) e VEGF-3 ( $p= 1$ ), onde oito (80%) das pacientes VEGF-1 negativo/positivo fraco e 65 (91,5%) pacientes positivo forte não apresentavam metástase linfonodal e três (100%) das pacientes VEGF-3 negativo/positivo fraco e 69 (89,6%) positivo forte também tinham linfonodos negativos. (Tabela 20)

**Tabela 20** - Análise entre a expressão dos marcadores e a presença ou ausência de metástase linfonodal.

	Categoria	Ausência		Presença		p*
		n	%	n	%	
COX-2	(-) / (+) fraco	13	17,8	1	12,5	0,581
	(+) forte	60	82,2	7	87,5	
VEGF-1	(-) / (+) fraco	8	10,9	2	25	0,256
	(+) forte	65	81,1	6	75	
VEGF-3	(-) / (+) fraco	3	4,2	0	0	0,726
	(+) forte	69	95,8	8	100	

\* Valores de p pelo teste de Qui-quadrado

O achado de invasão linfovascular na peça cirúrgica não se relacionou com a expressão de COX-2 ( $p= 0,716$ ), VEGF-1 ( $p= 1$ ) e VEGF-3 ( $p= 1$ ) nos adenocarcinomas. No caso de COX-2, 13 (86,7%) pacientes COX-2 negativo/positivo fraco e 37 (80,4%) pacientes positivo forte não apresentavam invasão linfovascular. Para VEGF-1, nove (81,8%) pacientes VEGF-1 negativo/positivo fraco e 41 (82%) pacientes positivo forte não apresentavam achados de invasão linfovascular, e, com VEGF-3, três (100%) pacientes VEGF-3 negativo/positivo fraco e 47 (81%) pacientes positivo forte também não apresentaram achado de invasão linfovascular. (Tabela 21)

**Tabela 21** - Análise entre a expressão dos marcadores com a presença ou ausência de invasão linfovascular.

	Categoria	Ausência		Presença		p*
		n	%	n	%	
COX-2	(-) / (+) fraco	13	26	2	18,2	0,455
	(+) forte	37	74	9	81,8	
VEGF-1	(-) / (+) fraco	9	18	2	18,2	0,640
	(+) forte	41	82	9	81,8	
VEGF-3	(-) / (+) fraco	3	6	0	0	0,545
	(+) forte	47	94	11	100	

\* Valores de p pelo teste de Qui-quadrado

#### **4.10 ASSOCIAÇÃO ENTRE OS MARCADORES BIOMOLECULARES**

A análise comparativa entre as expressões de COX-2, VEGF-1 e VEGF-3 nas diversas patologias demonstrou uma associação significativa entre os marcadores. No estudo de toda a população de estudo, 87,6% (106) das pacientes com expressão positivo forte para VEGF-1 também apresentavam expressão positivo forte para COX-2 e 64,9% (37) das pacientes com expressão negativo/positivo fraco para VEGF-1 também eram negativo/positivo fraco para COX-2 ( $p < 0,001$ ).

Entre COX-2 e VEGF-3, 75,3% (122) das pacientes que apresentaram expressão positivo forte para VEGF-3, também apresentaram expressão positivo forte para COX-2 e 75% (12) das pacientes que apresentaram expressão negativo/positivo fraco para VEGF-3, obtiveram expressão semelhante para COX-2 ( $p < 0,001$ ).

Na população de carcinomas, 66,7% (10) da amostra que apresentaram expressão negativo/positivo fraco para VEGF-1, também apresentaram expressão negativo/positivo forte para COX-2 e 87% (87) da amostra que obtiveram expressão

positivo forte para VEGF-1, também expressaram forte para COX-2 ( $p < 0,001$ ) (Tabela 22).

**Tabela 22** - Associação entre os marcadores COX-2 e VEGF-1 no grupo de pacientes com adenocarcinomas. (Hospital A. C. Camargo, 1991 a 2004).

		VEGF-1		Total
		Negativo/positivo fraco	Positivo forte	
COX-2	Negativo/positivo fraco	66,7% (10)	13% (13)	20% (23)
	Positivo forte	33,3% (5)	87% (87)	80% (92)
total		100% (15)	100% (100)	100% (115)
				<b>P &lt; 0,001</b>

A relação entre as expressões de COX-2 e VEGF-3 para os carcinomas foi de 60% (3) de expressão negativo/positivo fraco para VEGF-3 com expressão similar para COX-2 e 87% (90) de expressão positivo forte para VEGF-3, também com expressão positivo forte para COX-2 ( $p = 0,049$ ) (Tabela 23).

Entre as lesões benignas (hiperplasias típicas, atípicas e pólipos), 90,5% (19) das pacientes que tiveram expressão positivo forte para VEGF-1, expressaram positivo forte para COX-2 e 64,3% (27) das pacientes com expressão negativo/positivo fraco para VEGF-1, também expressaram negativo/positivo fraco para COX-2 ( $p < 0,001$ ) (Tabela 23).

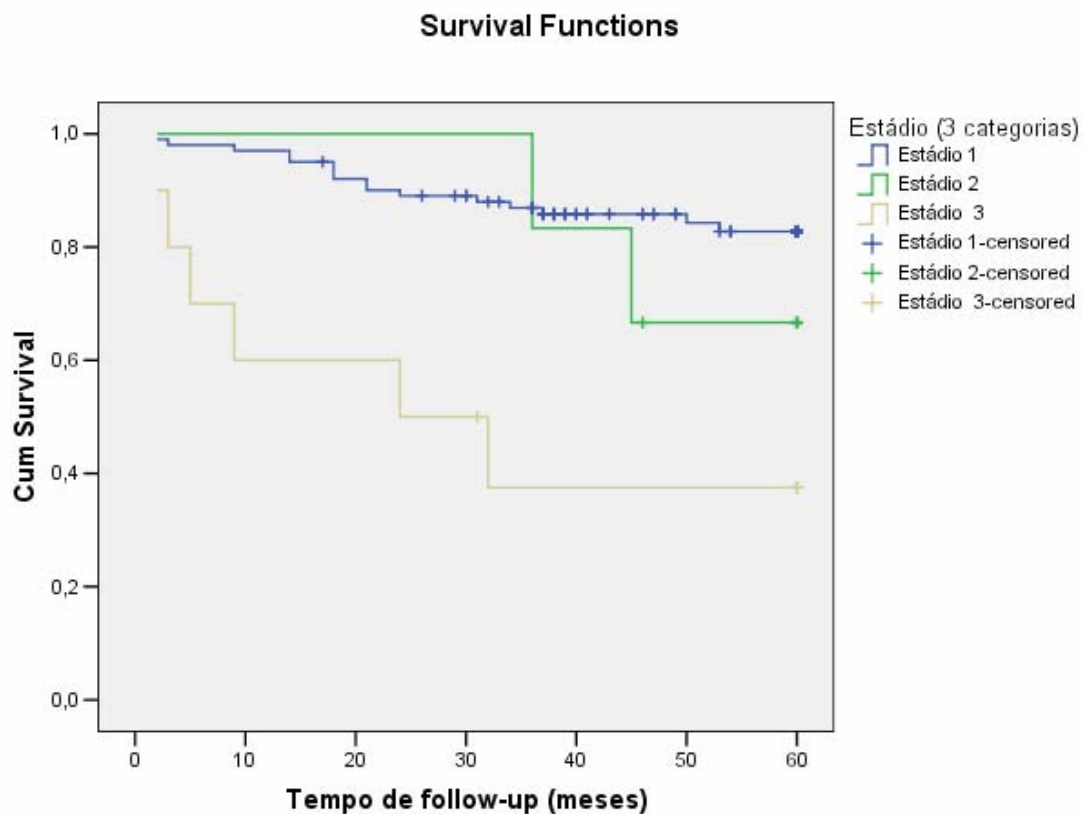
**Tabela 23** - Associação entre os marcadores COX-2 e VEGF-3 no grupo de pacientes com adenocarcinomas. (Hospital A. C. Camargo, 1991 a 2004).

		VEGF-3		Total
		Negativo/positivo fraco	Positivo forte	
COX-2	Negativo/positivo fraco	64,3% (27)	9,5% (2)	46% (29)
	Positivo forte	35,7% (15)	90,5% (19)	54% (34)
total		100% (42)	100% (21)	100% (63)
				<b>P &lt; 0,001</b>

Na análise entre as expressões de COX-2 e VEGF-3 nas patologias benignas, 81,8% (9) das pacientes que obtiveram expressão negativo/positivo fraco para VEGF-3, também assim expressaram para COX-2 e 60,4% (32) que obtiveram expressão positivo forte para VEGF-3, também expressaram positivo forte para COX2 (p= 0,012).

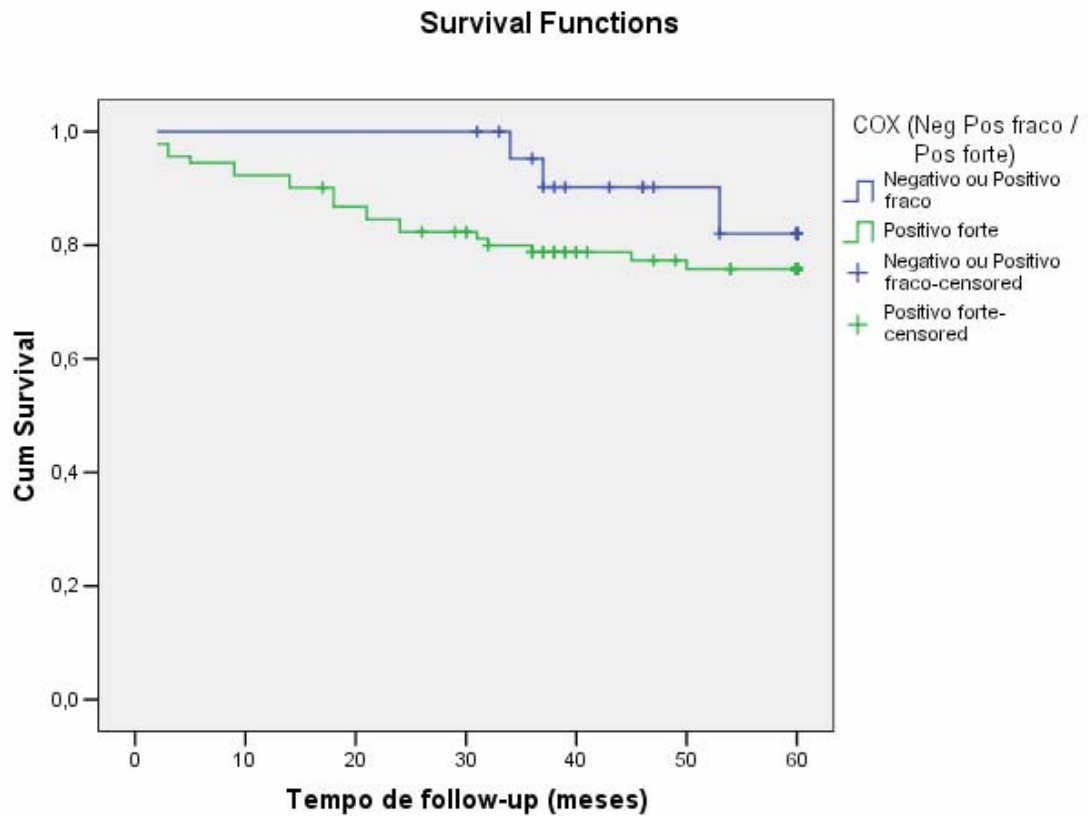
#### 4.11 ANÁLISE DE SOBREVIDA GLOBAL

A análise de sobrevida em relação ao estágio da doença demonstrou diferença significativa (p < 0,001), sendo que os pacientes estágios I têm melhores taxas de sobrevida que pacientes estágios II e ambos, melhores taxas que pacientes estágios III. As taxas de sobrevida em cinco anos foram de 84,2% para pacientes estadio I, 66,7% para estadio II e 40% para estadio III.



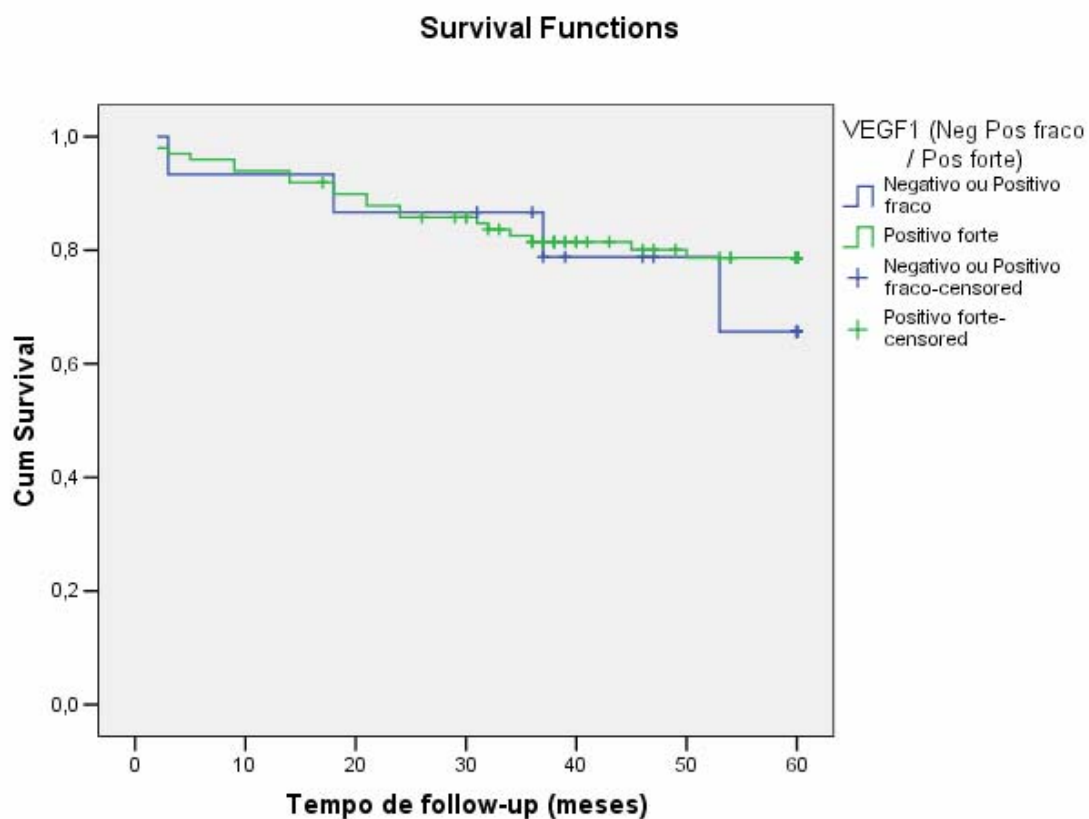
**Figura 16** – Gráfico de sobrevida global x estádio.

As pacientes com carcinoma de endométrio que expressaram COX-2 positivo forte apresentaram piores índice de sobrevida em relação às pacientes com expressão negativo/ positivo fraco, mas este número não alcança significância estatística ( $p=0,546$ ). As taxas de sobrevida em cinco anos foram de 87% para pacientes com expressão negativo/ positivo fraco e 76,9% para pacientes com expressão positivo forte.



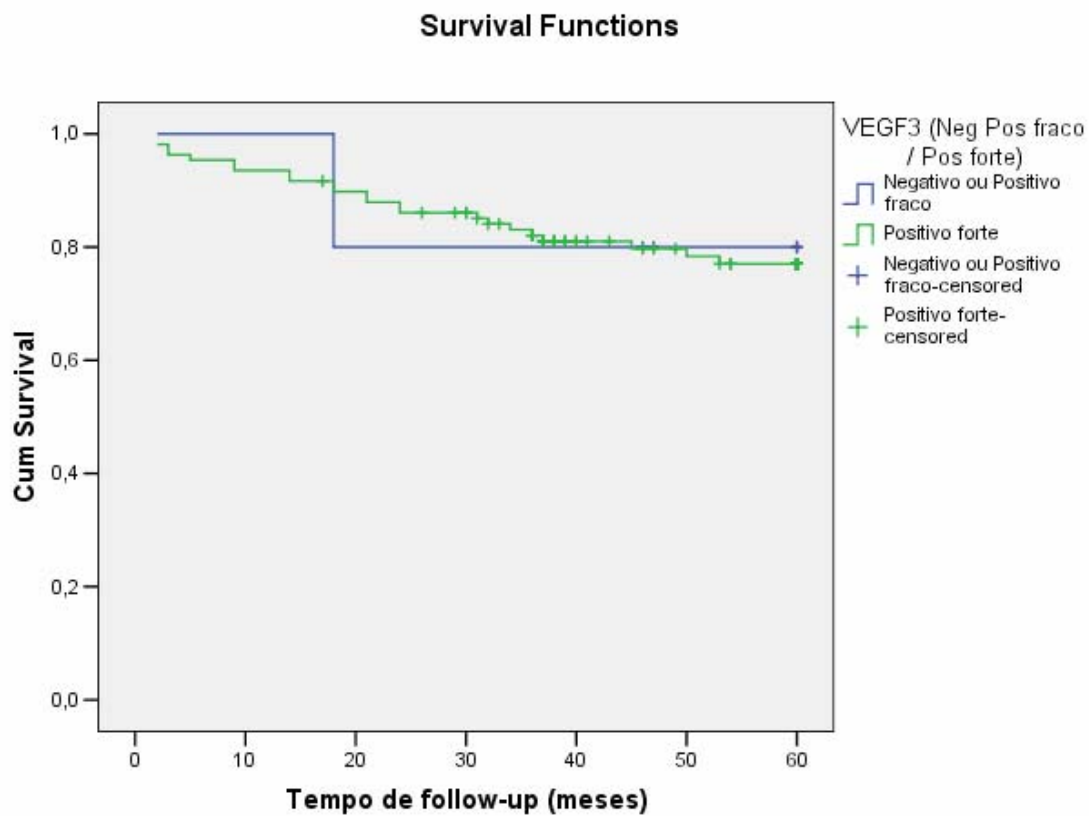
**Figura 17** – Gráfico de sobrevida global e expressão de COX-2.

A expressão de VEGF-1 não demonstrou relação estatística com a sobrevida em pacientes com adenocarcinoma de endométrio ( $p= 0,579$ ). As taxas de sobrevida em cinco anos foram de 73,3% para pacientes com expressão negativo/ positivo fraco e 79,8% para pacientes com expressão positivo forte.



**Figura 18** – Gráfico de sobrevida global e expressão de VEGF-1.

A expressão de VEGF-3 não demonstrou relação estatística com a sobrevida em pacientes com adenocarcinoma de endométrio ( $p= 0,942$ ). As taxas de sobrevida em cinco anos foram de 80% para pacientes com expressão negativo/ positivo fraco e 78,7% para pacientes com expressão positivo forte.



**Figura 19** – Gráfico da sobrevida global e expressão de VEGF-3.



## 5 DISCUSSÃO

O endométrio tem como característica uma resposta direta a atividade hormonal feminina durante o período da menacme.

Tal característica confere a este uma atividade celular específica, onde mensalmente ocorrem episódios de mitoses celulares associados à grande angiogênese. Isto fez com que optássemos por analisar em nosso grupo apenas pacientes na pós – menopausa e sem uso de TRH, onde não houvesse influência direta dos hormônios esteróides, buscando assim uma homogeneidade no grupo.

Em 1983, BOKHMAN, fez uma revisão de 366 pacientes com carcinoma de endométrio e relatou a possibilidade da existência de duas apresentações clínicas diferentes nas pacientes com esta patologia. Segundo ele, o primeiro tipo patogênico englobaria pacientes obesas, com história de ciclos anovulatórios, dislipidemias, infertilidade e menopausa tardia, caracterizando um grupo exposto a um período longo de hiperestrogenismo, denominado de TIPO 1. O segundo grupo abrange as pacientes magras, com doença na pré- menopausa, sem fatores de risco ao desenvolvimento de carcinoma de endométrio, denominados de TIPO 2. A frequência do primeiro grupo é em torno de 65% e do segundo grupo de aproximadamente 35%.

A opção por trabalharmos somente com adenocarcinomas endometrióides em pacientes menopausadas, baseou-se no fato deste ser o tipo histológico mais comum e estar, na grande maioria das vezes, relacionado a uma evolução progressiva de alterações celulares que culminam com a neoplasia. Estas pacientes em sua maioria

apresentam melhor evolução clínica e melhor prognóstico, pertencendo em sua maioria ao tipo 1 de Bokhman.

Pacientes que são acometidas pelo carcinoma de endométrio na pré-menopausa apresentam, em sua maioria, estádios mais avançados no momento do diagnóstico e alterações moleculares que sugerem pior prognóstico e pré-disposição genética (tipo 2 de Bokhman).

Para termos uma visão completa do processo evolutivo do carcinoma endometriíde, foram analisadas lesões com potencial pré neoplásico, como as hiperplasias típicas, hiperplasias atípicas e pólipos endometriais.

Segundo TROPÉ et al. (2005), existem boas razões que suportam a teoria das hiperplasias serem normalmente reflexo de um estímulo estrogênico persistente coexistindo com ou progredindo para carcinoma invasivo, e a possibilidade dessa progressão estar relacionada à presença de alterações arquiteturais ou atípicas celulares.

Em nosso estudo, devido às restrições através dos critérios de inclusão e exclusão, obtivemos uma amostragem reduzida de exemplares de hiperplasias (n=24), agrupados para análise estatística como típicas (n=12) e atípicas (n=12).

Todos os casos de hiperplasias típicas estão dentro do grupo das hiperplasias simples, enquanto os casos de hiperplasias atípicas preenchem critérios para classificá-las como hiperplasias complexas com atípicas, caracterizando assim os dois extremos dos grupos de hiperplasias segundo KURMAN et al. (1985).

Em nosso trabalho 86,55% (n=103) das pacientes tratadas para adenocarcinoma endometriíde apresentaram como primeiro, ou mais importante sintoma, o sangramento genital pós-menopausa, enquanto apenas 11,76% (n= 14) das

pacientes foram investigadas por uma alteração endometrial ao exame de ultrassonografia de rotina.

Nas pacientes onde o diagnóstico final foi de pólipo uterino, 31,81% (14/44) pacientes apresentaram como queixa à primeira consulta o sangramento pós-menopausa, enquanto 68,18% (30/44) pacientes tiveram a alteração ultrassonográfica como motivo inicial da consulta.

Estes números estão de acordo com achados de SANT'ANA DE ALMEIDA et al. (2004), onde 70 a 75 % das pacientes com pólipos endometriais na pós-menopausa apresentavam-se assintomáticas, tendo seu diagnóstico através de um espessamento endometrial focal em ultrassonografia transvaginal.

Nas pacientes com diagnóstico final de hiperplasia endometrial atípica 41,66% (5/12) apresentaram-se com sintomatologia de sangramento pós-menopausa, enquanto 50% (6/12) das pacientes submeteram-se a investigação endometrial por alteração ultrassonográfica (uma paciente já apresentava diagnóstico à primeira consulta através de biópsia prévia). Nas pacientes com diagnóstico final de hiperplasia típica, 66,66% (8/12) das pacientes apresentaram-se com queixa de sangramento genital pós-menopausa, enquanto 33,33% (4/12) delas tiveram em alteração ultrassonográfica o motivo de sua investigação endometrial. Segundo MONTGOMERY et al.(2004) o sangramento genital pós-menopausa é o sintoma mais freqüente em pacientes com hiperplasia, o mesmo autor refere que a associação entre sangramento genital pos-menopausal e citologia oncótica com atipia glandular aumenta o risco de hiperplasia endometrial e carcinoma em até quatro vezes.

Em nosso grupo de pacientes com adenocarcinoma endometrióide, 13 pacientes eram estádios Ia (10,92%), 52 pacientes estadio Ib (43,69%), duas

pacientes estadio IIa (1,68%), quatro pacientes estadio IIb (3,36%), duas pacientes estadio IIIa (1,68%), uma paciente estadio IIIb (0,84%) e sete pacientes estadio IIIc (5,88%). As pacientes estadio I representaram então 85,71% (102/119), estadio II 5,04% (6/119), e estadio III, 8,40% (10/119) do total estudado.

Na ultimo Anual Report (FIGO) a freqüência do carcinoma de endométrio segundo o estadio cirúrgico foi de 71,08% para estadio I, 12,16% para estadio II, 13,51% para estadio III e 3,24% para estadio IV (CREASMAN et al. 2006).

Nossa casuística está muito próxima da apresentada nos diversos centros, tendo em mente que pequenas variações decorrem de nossas pacientes representam um grupo específico, não estando incluídas neste trabalho, pacientes pré-menopausadas e de outros tipos histológicos que não o adenocarcinoma endometrióide.

A grande maioria dos trabalhos na literatura com análise da expressão de COX-2, VEGF-1 e VEGF-3 em adenocarcinoma de endométrio utilizou como metodologia o estudo através de análise imunoistoquímica em lâminas independentes ou em TMA, com o uso de diferentes anticorpos para os marcadores. A metodologia para definir positividade ou não à expressão dos marcadores variou entre trabalhos que analisaram a porcentagem de células positivas a trabalhos que analisaram em conjunto a intensidade da expressão dos mesmos.

Em nosso trabalho o marcador utilizado foi NovoCasta<sup>®</sup>, para COX-2, DAKO<sup>®</sup> para VEGF-1 e DAKO<sup>®</sup> para VEGF-3 e os índices de expressão levaram em conta a porcentagem de células positivas e a intensidade da positividade.

Obtivemos em nosso estudo expressão positiva para COX-2 em 93% das pacientes com adenocarcinomas, com 13% de expressão positiva fraca e 80 % de

expressão positiva forte. Os trabalhos na literatura apresentam índices de expressão que oscilam de 17% (JEON et al. 2004) até 92% (UOTILA et al. 2002) de positividade. Tal oscilação deve-se provavelmente a diversidade dos grupos estudados como tipos histológicos, estatus hormonal (pacientes pré e pós-menopausa), anticorpos diferentes, metodologias de análises diferentes (quantificação da positividade) e tamanhos das amostras.

Segundo trabalho de JEON et al. (2004), existe uma tendência a maior expressão de COX-2 em pacientes pós-menopausadas com 78% das pacientes com expressão positiva na pós-menopausada ( $p= 0,009$ ). Estes achados podem ser justificados por trabalho de OREJUELA et al. (2005) que realizou uma análise comparativa entre expressão de COX-2 e receptores de estrogênio (RE) e progesterona (RP) não encontrando diferença significativa entre os grupos, citando uma tendência à correlação negativa entre os mesmos (COX-2 x RE e RP). Estudo de MORISSET et al. (1998), demonstrou que 17-B estradiol inibiu a expressão de COX-2 mRNA em cultura de condrócitos bovinos e demonstrou ser tão potente quanto à dexametasona na inibição de COX-2 mRNA e produção de prostaglandinas.

A expressão de VEGF-1 em nosso estudo foi de 96,6% nos adenocarcinomas, sendo 9,6% de expressão positiva fraca e 87% de positiva forte. LI et al. (2006) obteve resultados de expressão para VEGF-1 de 64,7% e FUJIWAKI et al. (2002) de 44%. Tais resultados analisados em conjunto à expressão de COX-2 demonstraram correlação direta entre as expressões dos marcadores ( $p< 0,005$ ) para ambos os autores. Nosso estudo apresentou índices de expressão maiores que os trabalhos citados, mas confirmou a correlação positiva entre as expressões de COX-2 e VEGF encontrada pelos autores ( $p< 0,001$ ).

A correlação entre expressões de COX-2 e VEGF-1 é tema de diversos trabalhos devido à atuação de COX-2, no metabolismo do ácido aracdônico em prostaglandinas (PGE2) estimulando a atividade de VEGF, potente marcador de angiogênese (FUJIWAKI et al. (2002); LI et al. (2006)).

A expressão de COX-2 em pólipos endometriais em nosso trabalho foi de 75,7% com 53,7% de expressão positivo forte. MAIA et al. (2005) em estudo da expressão de COX-2 em pólipos de 52 pacientes pós-menopausadas refere que em não usuárias de terapia de reposição hormonal as expressões oscilaram entre fortemente positiva e fraca. No trabalho de MAIA et al. (2005) foram analisadas pacientes usuárias de tamoxifeno que demonstraram expressão forte para COX-2. GIORDANO et al. (2006), realizaram estudo sobre perfil das pacientes com carcinomas de endométrio originados em pólipos, com análise da expressão de COX-2, p 53, e KI 67. Neste trabalho foram encontrados seis casos de adenocarcinomas em 534 pólipos endometriais (1,12%), todos apresentando altas expressões para COX-2 e com fatores de risco importantes ao desenvolvimento de câncer de endométrio, como pacientes pós-menopausa com hipertensão, obesidade e TRH. A expressão de COX-2 não correlacionou com fatores de agressividade tumoral, expressão de p53 ou KI 67.

Dois autores, OREJUELA et al. (2005) e FUJIWAKI et al. (2002) estudaram a expressão simultânea de COX-2 em hiperplasias endometriais e carcinomas. No trabalho de OREJUELA et al. em 19 amostras de hiperplasias estudadas, 58% demonstraram positividade para COX-2, com 32% de forte positivos, tendo o autor neste estudo agrupado as diversas hiperplasias. FUJIWAKI não descreveu em seu trabalho os índices de expressão de COX-2 nas hiperplasias, relatando apenas que as

mesmas apresentaram expressões significativamente mais fortes que o endométrio normal em qualquer fase do ciclo menstrual e pós-menopausal ( $p < 0,0001$  a  $p < 0,05$ ).

Em nosso estudo COX-2 mostrou-se expresso em 75% das hiperplasias atípicas, com 50% de expressão forte positivo, e 72,7% de expressão nas hiperplasias típicas com 54,5% de expressão forte positiva.

Devido aos resultados encontrados de altos níveis de expressão de COX-2, VEGF-1 e VEGF-3 nas diversas patologias, e, a observação durante o processo de leitura das lâminas em uma diferença significativa entre os tecidos que expressaram fortemente os marcadores e aqueles com expressão negativa e positiva fraca, e visando uma análise estatística adequada, agrupamos as paciente com expressão negativa e positiva fraca em um grupo e realizamos uma análise comparativa com as pacientes positivas fortes.

Através deste novo agrupamento, a análise da expressão de COX-2 em pacientes portadoras de adenocarcinoma de endométrio demonstrou diferença significativa quando comparada ao grupo das patologias não neoplásicas, com 80% dos carcinomas apresentando expressão positivo forte comparado a 53,1% das pacientes com lesões não neoplásicas ( $p < 0,001$ ).

Resultados muito parecidos foram encontrados na expressão de VEGF-1, onde 87% dos adenocarcinomas apresentaram expressão positivo forte frente a 33,3% das lesões não neoplásicas ( $p < 0,001$ ). Na análise da expressão de VEGF-3 a diferença também foi estatisticamente significativa, com 95,6% dos adenocarcinomas apresentando expressão positivo forte frente a 81,5% das lesões não neoplásicas ( $p = 0,003$ ).

Estes resultados estão coerentes com trabalhos iniciados por TONG et al. (2000) que demonstrou a presença de expressão proteica de COX-2 e mRNA em oito de 11 carcinomas de endométrio, não encontrando expressão em três amostras de tecido endometrial normal. Em 2002, FUJIWAKI et al., publicou trabalho onde demonstrou expressão em adenocarcinomas e hiperplasias significativamente maiores que tecido endometrial normal, independente da fase do ciclo menstrual ou tecido pos-menopausal.

No trabalho de OREJUELA et al. (2005), não houve diferença significativa entre as expressões de COX-2 nos adenocarcinomas (24%) e hiperplasias (32%), ( $p=0,90$ ).

A análise isolada comparativa entre a expressão dos marcadores em carcinomas e hiperplasias atípicas demonstrou diferença significativa para COX-2 ( $p=0,029$ ), com 80% dos adenocarcinomas apresentando expressão positivo forte e 20% negativo/ positivo fraco e no caso das hiperplasias atípicas, 50% tiveram expressão positivo forte e 50% negativo/ positivo fraco. A expressão de VEGF-1 e VEGF-3 apresentaram diferença significativa entre os grupos ( $p<0,001$  e  $p=0,005$  respectivamente).

O fato da expressão de COX-2 não ter acompanhado as expressões de VEGF-1 e VEGF-3 na comparação entre adenocarcinomas e hiperplasias atípicas, talvez reflita o número reduzido da amostra de hiperplasias.

A análise comparativa entre as expressões dos marcadores em hiperplasias atípicas e pólipos/ hiperplasias típicas, não demonstrou diferença significativa para COX-2 ( $p=0,530$ ) e VEGF-3 ( $p=0,145$ ). Para VEGF-1 ( $p=0,038$ ) a diferença foi estatisticamente significativa.



A análise entre a expressão de COX-2 e fatores prognósticos anátomo-patológicos conhecidos, foram estudadas por diversos autores com divergências entre os achados.

Em nosso estudo, a análise comparativa entre a expressão de COX-2, VEGF-1 e VEGF-3 com fatores prognósticos conhecidos para o carcinoma de endométrio como grau histológico ( $p=0,451$ ;  $p=0,510$ ;  $p=0,564$ ), invasão miometrial ( $p=0,088$ ;  $p=0,108$ ;  $p=0,316$ ), presença de metástase linfonodal ( $p=0,81$ ;  $p=0,256$ ;  $p=0,726$ ) e achado de invasão linfovascular ( $p=0,455$ ;  $p=0,640$ ;  $p=0,545$ ) não demonstrou diferença significativa. Nossos resultados estão de acordo com trabalhos de OREJUELA et al. (2005), OHNO et al. (2005) e LI (2006), autores que também não encontraram relação com fatores prognósticos anátomo-patológicos.

FERRANDINA (2002) e FOWLER (2005) encontraram uma relação de significância positiva entre a expressão de COX-2 e grau histológico e invasão miometrial, com maior expressão do marcador em pacientes com grau histológico maiores e presença de invasão miometrial.

TOYOKI (2005) encontrou uma relação positiva entre a expressão de COX-2 e estadió cirúrgico e grau histológico, com pacientes de estádios iniciais e grau histológico I, apresentando menor expressão para COX-2 que pacientes com estádios II e III e graus histológicos II e III.

CAO et al. (2002) analisando 24 pacientes com adenocarcinomas endometrióides encontrou significância estatística entre os diversos graus histológicos e entre hiperplasias e carcinomas grau I.

O fato de, em nosso estudo, COX-2 apresentar maior expressão em carcinomas que hiperplasias e pólipos e, não apresentar relação direta com invasão

miometrial e presença de metástase linfonodal, sugere que COX-2 tenha um papel importante como evento inicial no processo de carcinogênese do carcinoma endometrial, hipótese esta também levantada por FUJIWAKI et al. (2002), TOYOKI et al. (2005) e LI et al. (2006).

Em nosso estudo, pacientes com expressão positivo forte para COX-2 apresentaram uma tendência a pior sobrevida em relação a pacientes com expressão negativo/ positivo fraco, apesar dos resultados não demonstrarem diferença estatística.

Segundo trabalho de FERRANDINA et al. (2002), pacientes com expressão positiva para COX-2 apresentaram menor sobrevida livre de doença. Outros autores não encontraram resultados relevantes entre COX-2 e sobrevida.

## 6 CONCLUSÕES

A partir de nosso estudo podemos concluir que em nossa amostra constituída por adenocarcinomas de endométrio do tipo endometrióide, pólipos, hiperplasias típicas e hiperplasias atípicas:

- 1) Os carcinomas expressam positivamente COX-2, VEGF-1 e VEGF-3 na grande maioria dos casos.
- 2) As expressões de COX-2, VEF-1 e VEGF-3 são estatisticamente mais frequentes nos carcinomas do endométrio que em hiperplasias típicas, hiperplasias atípicas e pólipos.
- 3) Existe uma relação direta entre as expressões de COX-2, VEGF-1 e VEGF-3 nos carcinomas endometrióides do endométrio.
- 4) O estudo não demonstrou relação entre expressão de COX-2, VEGF-1 e VEGF-3 nos carcinomas com fatores prognósticos anátomo-patológicos.
- 5) Pacientes com expressão positiva forte para COX-2 apresentam uma pior sobrevida global quando comparados aos pacientes com expressão negativo/positivo fraco (resultado sem significado estatístico).

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

Ali-Fehmi R, Che M, Khalifeh I, et al. The effect of cyclooxygenase-2 expression on tumor vascularity in advanced stage ovarian serous carcinoma. **Cancer** 2003; 98:1423-9.

Bakour SH, Khan KS, Gupta JK. The risk of premalignant and malignant pathology in endometrial polyps. **Acta Obstet Gynecol Scand** 2000; 79:317-20.

Bokhman JV. Two pathogenetical types of endometrial carcinoma. **Gynecol Oncol** 1983; 15:10-7.

Brinton LA, Berman ML, Mortel R, et al. Reproductive, menstrual, and medical risk factors for endometrial cancer: results from a case-control study. **Am J Obstet Gynecol** 1992; 167:1317-25.

Caduff RF, Johnston CM, Svoboda-Newman SM, Poy EL, Merajver SD, Frank TS. Clinical and pathological significance of microsatellite instability in sporadic endometrial carcinoma. **Am J Pathol** 1996; 148:1671-8.

Cao QJ, Einstein MH, Anderson PS, Runowicz CD, Balan R, Jones JG. Expression of COX-2, Ki-67, cyclin D1, and P21 in endometrial endometrioid carcinomas. **Int J Gynecol Pathol** 2002; 21:147-54.

Clark JH, Peck EJ Jr. Female sex steroids: receptors and function. **Monogr Endocrinol** 1979; 14:I-XII, 1-245.

Creasman WT, Odicino F, Maisonneuve P, et al. Carcinoma of the corpus uteri. **Int J Gynecol Obstetr** 2006 95(Suppl S1):S105-S43.

Crum CP, Hornstein MD, Nucci MR, Mutter GL. Hertig and beyond: A Systematic and practical Approach to the Endometrial Biopsy. **Adv Anat Pathol** 2003; 10:301-18.

Davies G, Salter J, Hills M, Martin LA, Sacks N, Dowsett M. Correlation between cyclooxygenase-2 expression and angiogenesis in human breast cancer. **Clin Cancer Res** 2003; 9:2651-6.

Deligdisch L, Holinka CF. Endometrial carcinoma: two diseases? **Cancer Detect Prev** 1987; 10:237-46.

Dumont DJ, Jussila L, Taipale J, et al. Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3. **Science** 1998; 282:946-9.

Fanning J, Evans MC, Peters AJ, Samuel M, Harmon ER, Bates JS. Endometrial adenocarcinoma histologic subtypes: clinical and pathologic profile. **Gynecol Oncol** 1989; 32:288-91.

Ferrandina G, Legge F, Ranelletti FO, et al. Cyclooxygenase-2 expression in endometrial carcinoma: correlation with clinicopathologic parameters and clinical outcome. **Cancer** 2002; 95:801-7.

Fiorica JV, Hoffman MS, Roberts WS, LaPolla JP, Cavanagh D. Detection of endometrial carcinoma: clinical judgement versus histologic examination. **South Med J** 1990; 83:759-60.

Fowler JM, Ramirez N, Cohn DE, et al. Correlation of cyclooxygenase-2 (COX-2) and aromatase expression in human endometrial cancer: tissue microarray analysis. **Am J Obstet Gynecol** 2005; 192:1262-71; discussion 1271-3.

Fujiwaki R, Hata K, Iida K, et al. Co-expression of vascular endothelial growth factor and thymidine phosphorylase in endometrial cancer. **Acta Obstet Gynecol Scand** 1999; 78:728-34.

Fujiwaki R, Iida K, Kanasaki H, Ozaki T, Hata K, Miyazaki K. Cyclooxygenase-2 expression in endometrial cancer: correlation with microvessel count and expression of vascular endothelial growth factor and thymidine phosphorylase. **Hum Pathol** 2002; 33:213-9.

Giordano G, Gnetti L, Merisio C, Melpignano M. Postmenopausal status, hypertension and obesity as risk factors for malignant transformation in endometrial polyps. **Maturitas** 2007; 56:190-7.

Grimes DA. Diagnostic dilation and curettage: a reappraisal. **Am J Obstet Gynecol** 1982; 142:1-6.

Harada S, Nagy JA, Sullivan KA, et al. Induction of vascular endothelial growth factor expression by prostaglandin E2 and E1 in osteoblasts. **J Clin Invest** 1994; 93:2490-6.

Jeon YT, Kang S, Kang DH, et al. Cyclooxygenase-2 and p53 expressions in endometrial cancer. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** 2004; 13:1538-42.

Joo YE, Rew JS, Seo YH, et al. Cyclooxygenase-2 overexpression correlates with vascular endothelial growth factor expression and tumor angiogenesis in gastric cancer. **J Clin Gastroenterol** 2003; 37:28-33.

Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen T, et al. Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1995; 92:3566-70.

Karkkainen MJ, Petrova TV. Vascular endothelial growth factor receptors in the regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. **Oncogene** 2000; 19:5598-605.

Karlsson B, Granberg S, Wikland M, et al. Transvaginal ultrasonography of the endometrium in women with postmenopausal bleeding--a Nordic multicenter study. **Am J Obstet Gynecol** 1995; 172:1488-94.

King A, Seraj IM, Wagner RJ. Stromal invasion in endometrial adenocarcinoma. **Am J Obstet Gynecol** 1984; 149:10-4.

Kukk E, Lymboussaki A, Taira S, et al. VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGFR-3 suggests a role in lymphatic vascular development. **Development** 1996; 122:3829-37.

Kurman RJ, Norris HJ. Evaluation of criteria for distinguishing atypical endometrial hyperplasia from well-differentiated carcinoma. **Cancer** 1982; 49:2547-59.

Kurman RJ, Kaminski PF, Norris HJ. The behavior of endometrial hyperplasia: a long-term study of "untreated" hyperplasia in 170 patients. **Cancer** 1985; 56:403-12.

Landen CN Jr, Mathur SP, Richardson MS, Creasman WT. Expression of cyclooxygenase-2 in cervical, endometrial, and ovarian malignancies. **Am J Obstet Gynecol** 2003; 188:1174-6.

Lee JO, Yang H, Georgescu MM, et al. Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association. **Cell** 1999; 99:323-34.

Li W, Xu RJ, Zhang HH, Jiang LH. Overexpression of cyclooxygenase-2 correlates with tumor angiogenesis in endometrial carcinoma. **Int J Gynecol Cancer** 2006 16:1673-8.

Machado LV. Controle da menstruação. In: Halbe, editor. **Tratado de ginecologia**. 2 ed. São Paulo: Roca; 1993. p.305-18.

Maia H Jr, Correia T, Freitas LA, Athayde C, Coutinho E. Cyclooxygenase-2 expression in endometrial polyps during menopause. **Gynecol Endocrinol** 2005; 21:336-9.

Martin-Ondarza C, Gil-Moreno A, Torres-Cuesta L, et al. Endometrial cancer in polyps: a clinical study of 27 cases. **Eur J Gynaecol Oncol** 2005; 26:55-8.

McDonald TW, Malkasian GD, Gaffey TA. Endometrial cancer associated with feminizing ovarian tumor and polycystic ovarian disease. **Obstet Gynecol** 1977; 49:654-8.

Miyata Y, Koga S, Kanda S, Nishikido M, Hayashi T, Kanetake H. Expression of cyclooxygenase-2 in renal cell carcinoma: correlation with tumor cell proliferation, apoptosis, angiogenesis, expression of matrix metalloproteinase-2, and survival. **Clin Cancer Res** 2003; 9:1741-9.

Montgomery BE, Daum GS, Dunton CJ. Endometrial hyperplasia: a review. **Obstet Gynecol Surv** 2004; 59:368-78.

Morrisset S, Patry C, Lora M, de Brum-Fernandes AJ. Regulation of cyclooxygenase-2 expression in bovine chondrocytes in culture by interleukin 1alpha, tumor necrosis factor-alpha, glucocorticoids, and 17beta-estradiol. **J Rheumatol** 1998; 25:1146-53.

Mutter GL. **Endometriun**. Available from: <URL:<http://www.endometriun.org>> [2007 sept 21].

Ohno Y, Ohno S, Suzuki N, et al. Role of cyclooxygenase-2 in immunomodulation and prognosis of endometrial carcinoma. **Int J Cancer** 2005; 114:696-701.



Orejuela FJ, Ramondetta LM, Smith J, et al. Estrogen and progesterone receptors and cyclooxygenase-2 expression in endometrial cancer, endometrial hyperplasia, and normal endometrium. **Gynecol Oncol** 2005; 97:483-8.

Peiffer SL, Herzog TJ, Tribune DJ, Mutch DG, Gersell DJ, Goodfellow PJ. Allelic loss of sequences from the long arm of chromosome 10 and replication errors in endometrial cancers. **Cancer Res** 1995; 55:1922-6.

Reis PDS, Nogueira AA, Reis FJC, Campolungo A, Carrara HHA, Andrade JM. Is hysteroscopic appearance a safe means of differentiating malignant from benign endometrial polyps in postmenopausal women? **Gynaecol Endosc** 2001; 10:49-51.

Risinger JI, Berchuck A, Kohler MF, Watson P, Lynch HT, Boyd J. Genetic instability of microsatellites in endometrial carcinoma. **Cancer Res** 1993; 53:5100-3.

Rose PG. Endometrial carcinoma. **N Engl J Med** 1996; 335:640-9. Erratum in: **N Engl J Med** 1997; 336:1335.

Sant'Ana de Almeida EC, Nogueira AA, Candido dos Reis FJ, Zambelli Ramalho LN, Zucoloto S. Immunohistochemical expression of estrogen and progesterone receptors in endometrial polyps and adjacent endometrium in postmenopausal women. **Maturitas** 2004; 49:229-33.

Savelli L, De Iaco P, Santini D, et al. Histopathologic features and risk factors for benignity, hyperplasia, and cancer in endometrial polyps. **Am J Obstet Gynecol** 2003; 188:927-31.

Sunderkotter C, Steinbrink K, Goebeler M, Bhardwaj R, Sorg C. Macrophages and angiogenesis. **J Leukoc Biol** 1994; 55:410-22.

Tamura M, Gu J, Matsumoto K, Aota S, Parsons R, Yamada KM. Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. **Science** 1998; 280:1614-7.

Tavassoli F, Kraus FT. Endometrial lesions in uteri resected for atypical endometrial hyperplasia. **Am J Clin Pathol** 1978; 70:770-9.

Tong BJ, Tan J, Tajeda L, et al. Heightened expression of cyclooxygenase-2 and peroxisome proliferator-activated receptor-delta in human endometrial adenocarcinoma. **Neoplasia** 2000; 2:483-90.

Toyoki H, Fujimoto J, Sato E, Sakaguchi H, Tamaya T. Clinical implications of expression of cyclooxygenase-2 related to angiogenesis in uterine endometrial cancers. **Ann Oncol** 2005; 16:51-5.

Tropé CG, Alektiar KM, Sabbatini PJ, Zaino RJ. Corpus: epithelial tumors. In: Hoskins WJ, editor. **Principles and practice of gynecologic oncology**. 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 2005. p.821-66.

Tsuji M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. **Cell** 1998; 93:705-16. Erratum in: **Cell** 1998; 94:following 271.

Uotila PJ, Erkkola RU, Klemi PJ. The expression of cyclooxygenase-1 and -2 in proliferative endometrium and endometrial adenocarcinoma. **Ann Med** 2002; 34:428-33.

Zheng W, Khurana R, Farahmand S, Wang Y, Zhang ZF, Felix JC. p53 immunostaining as a significant adjunct diagnostic method for uterine surface carcinoma: precursor of uterine papillary serous carcinoma. **Am J Surg Pathol** 1998; 22:1463-73.

Ziel HK. Estrogen's role in endometrial cancer. **Obstet Gynecol** 1982; 60:509-15.

***ANEXOS***

---

**Anexo 1 - Classificação dos carcinomas endometriais.**

---

Adenocarcinoma endometrióide

    Papilar viloglandular

    Secretório

    Células ciliadas

    Adenocarcinoma endometrióide com diferenciação escamosa

Carcinoma mucinoso

Carcinoma seroso

Carcinoma de células claras

Carcinoma escamoso

Carcinoma indiferenciado

Tipos mistos

Carcinoma “miscellaneos”

Carcinoma metastático

---

## Anexo 2 - Estadiamento cirúrgico do Câncer de Corpo Uterino, FIGO 1988

<b>Estadio/Grau</b>	<b>Característica</b>
IA G123	Tumor limitado ao endométrio
IB G123	Invasão de menos da metade do miométrio.
IB G123	Invasão de mais da metade do miométrio.
IIA G123	Envolvimento glandular endocervical.
IIB G123	Envolvimento estromal endocervical.
IIIA G123	Tumor invade serosa, anexo ou citologia peritoneal positiva.
IIIB G123	Metástase vaginal.
IIIC G123	Metástase para linfonodos pélvicos ou paraaórticos.
IVA G123	Tumor invade bexiga e/ ou mucosa intestinal.
IVB G123	Metástase a distancia (inclui linfonodos inguinais).

### **Graus de diferenciação histopatológica.**

Casos devem ser agrupados por graus de diferenciação de adenocarcinoma.

G1	5% ou menos de padrão não escamoso ou sólido.
G2	6% a 50% de padrão não escamoso ou sólido.
G3	mais de 50% de padrão escamoso ou sólido.

### **Notas sobre graduação patológica.**

Notadas atipias nucleares em um não esperado grau arquitetural eleva a graduação de tumores grau 1 e 2 em 1 ponto.

Em adenocarcinomas serosos, células claras e escamosos o grau nuclear é mais importante.

Adenocarcinomas com diferenciação escamosa são graduados de acordo com grau nuclear de componente glandular.

### **Notas ao estadiamento.**

Como o estadiamento do câncer de corpo uterino é cirúrgico, procedimentos prévios usados para estadiamento não são mais aplicáveis, como curetagem fracionada (D&C), para diferenciar estadio I e II.

É recomendado que um pequeno número de pacientes seja submetido à radioterapia exclusiva. Nestes casos específicos o estadiamento clínico adotado pela FIGO em 1971 é aplicado.

Idealmente a mensuração da invasão miometrial deve ser realizada no local do tumor invasivo.

### Anexo 3 - Câncer de Endométrio: Duas doenças?

---

Tipo 1	Tipo 2
Tumores (Hiper) estrogênicos	Tumores não estrogênicos
Associados a hiperplasias	Associado a endométrio atrófico
Bem diferenciados (G1 e G2)	Pouco diferenciado (G3)
Adenocarcinoma endometrióide ou com diferenciação escamosa	Adenocarcinoma adenoescamoso, papilar, seroso ou células claras
Pacientes obesas com diabetes e/ou hipertensão	Pacientes magras com hábitos saudáveis
Pacientes anovulatórias ou em TRH	Pacientes com ciclos menstruais regulares
Invasão miometrial discreta sem metástase linfonodal	Invasão miometrial profunda com metástase linfonodal
Bom prognóstico	Pior prognóstico

---

**Fonte:** DELIGDISCH e HOLINKA (1987)

#### Anexo 4 - Protocolo das Reações Imunoistoquímicas

1. Desparafinização dos cortes histológicos com 3 $\mu$ m de espessura, do material incluído em parafina e colocados em lâminas silanizadas (3-aminopropyl-triethoxy-silane – SIGMA), e deixados por 24h em estufa a 60°C.
2. Duas passagens em xilol (60°C e temperatura ambiente).
3. Seis passagens em etanol (100%, 95%, 80%, 70%), sendo três delas a 100%%.
4. Lavagem das lâminas em água corrente e destilada.
5. Incubação em tampão citrato pH 6,0 em panela de pressão elétrica (COX-2) e EDTA/TRIS pH 9,0 em banho-maria (VEGF-1 e VEGF-3).
6. Bloqueio da peroxidase endógena com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3% (água oxigenada 10 volumes).
7. Lavagem das lâminas em água corrente e destilada.
8. Solução salina tamponada com fosfatos.
9. Incubação com anticorpo primário, diluído em título estabelecido (1/3000 para COX-2; 1/200 para VEGFR1 e 1/800 para VEGFR3) em tampão PBS contendo albumina bovina BSA a 1% (SIGMA) e azida sódica (NaN<sub>3</sub>) 0,1%, em câmara úmida (16 a 18 horas).
10. Lavagem em tampão PBS.
11. Incubação com o anticorpo biotilado-reagente C, do kit StreptABComplex/HRP Duet (DAKO).
12. Lavagem em tampão PBS.



13. Incubação das lâminas em solução substrato cromógeno:  
3,3'Diaminobenzidine Tetrahydrochloride (DAB) 60mg (DAKO);  
Dimetilsulfóxido (DMSO) 1ml; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 6% (água oxigenada 20 volumes) 1  
ml, PBS 100ml (5min, 37°C, ao abrigo da luz).
14. Lavagem das lâminas em água corrente e destilada.
15. Contracorar com hematoxilina de Harris.
16. Imersão em água amoniacal (solução de hidróxido de amônio a 0,5%),  
lavando em seguida em água corrente e destilada.
17. Desidratação das lâminas (6 passagens em etanol a 50%, 80%, 95% e 100%,  
sendo três delas em 100%).
18. Montagem das lâminas.