

**AVALIAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS
DO GENE *TOP2A* E DA EXPRESSÃO DA SUA
PROTEÍNA EM LEIOMIOSSARCOMAS
UTERINOS**

FERNANDO LUÍS VISONI POLISELI

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

Área de concentração: Oncologia

Orientadora: Dra. Isabela Werneck da Cunha

Co-Orientador: Dr. Glauco Baiocchi Neto

São Paulo

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Poliseli, Fernando Luís Visoni

Avaliação do gene e da proteína TOP2A em leiomiossarcomas uterinos através das técnicas de imunistoquímica e de FISH /
Fernando Luís Visoni Poliseli - São Paulo, 2012.

71p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientadora: Isabela Werneck da Cunha

Descritores: 1. NEOPLASIAS DO COLO DO ÚTERO/diagnóstico.
2. LEIOMIOMA. 3. IMUNOISTOQUÍMICA. 4. HIBRIDIZAÇÃO IN SITU
FLUORESCENTE.

DEDICATÓRIA

À minha mãe Odete, exemplo maior de dedicação à família e perseverança.

À minha esposa Michelle, pelo companheirismo, paciência e por ser minha motivação para prosseguir.

AGRADECIMENTOS

Ao Hospital A.C. Camargo, por oferecer, de maneira integrada, ensino, assistência e pesquisa, dentro do mais alto nível de qualidade.

À minha orientadora, Dra Isabela, por sua dedicação e paciência na elaboração e orientação neste estudo.

Ao Dr Glauco, por motivar meu ingresso na Pós Graduação, por toda a confiança e incentivo.

A todos os companheiros de residencia do Hospital A.C. Camargo, meus amigos, com os quais tive o privilégio de trabalhar.

Ao meu pai Antonio, que me mostrou quanto a honestidade e o companheirismo são importantes.

Aos meus irmãos Rodolfo e Ana Paula, que são meus exemplos para uma vida correta.

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

RESUMO

Poliseli FLV. **Avaliação do número de cópias do gene *TOP2A* e da expressão da sua proteína em leiomiossarcomas uterinos.** São Paulo, 2012. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Leiomiossarcoma corresponde a apenas 1 a 2% das neoplasias uterinas, porém apresenta alta morbimortalidade e seu prognóstico pouco tem mudado nos últimos anos. O quadro clínico assemelha-se com tumores uterinos benignos e exames de imagem ainda não são confiáveis para fazer o diagnóstico. Sua sarcogênese não está compreendida, assim como não está claro qual é a célula progenitora. O tratamento primário permanece cirúrgico e a influência da quimioterapia é incerta. Entre os quimioterápicos mais ativos destacam-se os antracíclicos, que agem no bloqueio do *TOP2A*. Objetivo: Desta forma objetivamos estudar o gene *TOP2A* e sua proteína em leiomiossarcomas uterinos e sua relação com características clinicopatológicas, bem como com a sobrevida. Metodologia: As informações clínicas de pacientes com leiomiossarcoma uterino foram resgatadas dos prontuários médicos do Hospital A.C. Camargo no período de 1982 a 2010 e o material anatomopatológico foi revisto e reclassificado e posteriormente submetido a estudos imunohistoquímico e de FISH para análise do *TOP2A*. A casuística compreendeu um total de 37 pacientes. Resultados: A idade mediana foi de 50,2 anos e o seguimento mediano foi de 21 meses. A alta expressão da proteína Top2A estava presente 56,8% das pacientes. O número de cópias do gene *TOP2A* estava alterado em 36,7% das pacientes, estando a amplificação presente em 72,7% dos casos. A análise univariada mostrou que tamanho do tumor e estadiamento têm impacto na sobrevida global e somente o estadiamento tem impacto na sobrevida livre de doença. Índice mitótico maior do que 20 associou-se com alta expressão da proteína em 70,8% dos casos e estágio precoce associou-se com a baixa expressão da proteína Top2A em 61% dos casos. Não houve correlação

estatisticamente significativa do número de cópias do gene *TOP2A* e da sua proteína. Conclusão: Tamanho do tumor e estadiamento mostraram-se indicadores prognósticos válidos de leiomiossarcoma uterino na análise univariada. A expressão da proteína Top2A está associada com índice mitótico e com estadiamento da neoplasia.

SUMMARY

Poliseli FLV. **[Evaluation of the number of copies of the TOP2A gene and its protein expression in uterine leiomyosarcoma]**. São Paulo, 2012. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Leiomyosarcomas account for only 1-2% of uterine cancers, but have high morbimortality and their prognosis has changed little in recent years. The clinical profile consists of benign uterine tumors and imaging exams are still not reliable for making a definitive diagnosis. The sarcomagenesis of leiomyosarcomas is not understood as well as the precise nature of the progenitor cell remains unclear. Primary treatment remains surgical and the influence of adjuvant chemotherapy is uncertain. Standing out among the most active agents are anthracyclines, which act to block TOP2A. Thus, we aimed to study the TOP2A gene and its protein in uterine leiomyosarcoma and their relationship to features clinical and pathology as well as survival. Clinical information of patients with uterine leiomyosarcomas were taken from medical records of Hospital A.C. Camargo in the period from 1982 to 2010 and the anatomopathologic material was reviewed and reclassified and subsequently subjected to immunohistochemistry and FISH studies for the analysis of TOP2A. The cases selected for study consisted of 37 patients. The median age was 50.2 years and the median follow-up was 21 months. The high expression of the protein was present Top2A 56.8% of patients. The number of copies of the TOP2A gene was abnormal in 36.7% of patients, and amplifying present in 72.7% of cases. Univariate analysis showed that tumor size and staging had an impact on overall survival and that only staging had an impact on disease-free survival. Mitotic index greater than 20 was associated with high protein expression in 70.8% of cases and was associated with an early stage with low protein expression Top2A in 61% of cases. There was no correlation between the TOP2A number of copies of the gene and Top2A protein expression. Tumor size and staging proved to be valid prognostic indicators of uterine leiomyosarcoma and Top2A protein expression is associated with mitotic index and staging.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fluxograma demonstrando a descrição da casuística (AP anatomopatológico, HACC Hospital A.C. Camargo).....	22
Figura 2	Fotomicrografias mostrando leiomiossarcoma uterinos (HE) apresentando em A atipia leve, em B atipia moderada e em C atipia severa.....	26
Figura 3	Fotomicrografia ilustrando a expressão protéica do Top2A em leiomiossarcomas uterinos.....	28
Figura 4	Histograma com a distribuição das médias do número de células que expressavam a proteína Top2A em 2 níveis de TMA.....	29
Figura 5	Fotomicrografias mostrando reações de Hibridização in situ fluorescente (FISH) onde estão marcados em verde o gene TOP2A, em vermelho o gene HER2 e em azul o centrômero do cromossomo 17.....	31
Figura 6	Gráfico de sobrevida global (Hospital A.C. Camargo, 1982 – 2009).....	34
Figura 7	Sobrevida global de acordo com estadiamento da neoplasia (Hospital A.C. Camargo, 1982 – 2009).....	35
Figura 8	Gráfico de sobrevida global entre pacientes com leiomiossarcoma estágio I e estágio II, III e IV, $p=0,04$ (Hospital A.C. Camargo, 1982 – 2009).....	36

Figura 9	Sobrevida global de acordo com o maior diâmetro da neoplasia, $p=0,015$ (Hospital A.C. Camargo, 1982 – 2009).....	37
Figura 10	Sobrevida global em relação a baixa e alta expressão da proteína Top2A, $p=0,67$ (Hospital A.C. Camargo, 1982 – 2009).....	38
Figura 11	Sobrevida global conforme o número de cópias do gene TOP2A, $p=0,34$ (Hospital A.C. Camargo, 1982 – 2009).....	39
Figura 12	Sobrevida livre de doença (Hospital A.C. Camargo, 1982 – 2009).....	40
Figura 13	Sobrevida livre de doença em relação ao estadiamento da neoplasia, $p= 0,009$ (Hospital A.C. Camargo, 1982 – 2009).....	42
Figura 14	Sobrevida livre de doença conforme período de tratamento da neoplasia, $p=0,007$ (Hospital A.C. Camargo, 1982 – 2009).....	43
Figura 15	Sobrevida livre de doença conforme realização da quimioterapia adjuvante, $p=0,42$ (Hospital A.C. Camargo, 1982 – 2009).....	44
Figura 16	Sobrevida livre de doença quanto a realização da radioterapia adjuvante, $p=0,46$ (Hospital A.C. Camargo, 1982 – 2009).....	44
Figura 17	Sobrevida livre de doença quanto a expressão da proteína Top2A, $p=0,84$ (Hospital A.C. Camargo, 1982 – 2009).....	45

Figura 18	Sobrevida livre de doença em relação ao número de cópias do gene TOP2A, $p=0,92$ (Hospital A.C. Camargo, 1982 – 2009).....	45
Figura 19	Sobrevida livre de doença de acordo com local da cirurgia, $p=0,04$ (Hospital A.C. Camargo, 1982 – 2009).....	46

LISTA DE QUADRO E TABELAS

Quadro 1	Estadiamento do leiomiossarcoma uterino.....	6
Tabela 1	Características clínicas e de achados intra-operatórios das pacientes com leiomiossarcoma de útero (Hospital A.C. Camargo, 1982 – 2010).....	24
Tabela 2	Análise da relação do estadiamento de pacientes com leiomiossarcoma uterino conforme período do tratamento até 2009 (Hospital A.C. Camargo, 1982 – 2009).....	25
Tabela 3	Características anatomopatológicas do tumor das pacientes com leiomiossarcoma (Hospital A.C. Camargo, 1982 – 2010). (M/10CGA: mitose por 10 campos de grande aumento).....	25
Tabela 4	Situação final das 37 pacientes com leiomiossarcoma (Hospital A.C. Camargo, 1982 – 2010).....	26
Tabela 5	Relação entre estadiamento e quimioterapia (Hospital A.C. Camargo, 1982 – 2010).....	27
Tabela 6	Relação entre estadiamento e radioterapia (Hospital A.C. Camargo, 1982 – 2010).....	27
Tabela 7	Expressão da proteína Top2A com variáveis demográficas, clínicas e anatomopatológicas e idade (Hospital A.C. Camargo, 1982 – 2010).....	30
Tabela 8	Número de cópias do gene <i>TOP2A</i> com variáveis demográficas, clínicas e anatomopatológicas e idade (Hospital A.C. Camargo, 1982 – 2010).....	32

Tabela 9	Expressão da proteína Top2A de acordo com o número de cópias do gene TOP2A, variáveis nominais (Hospital A.C. Camargo, 1982 – 2010).....	33
Tabela 10	Expressão da proteína Top2A de acordo com o número de cópias do gene TOP2A, variável dicotomizada, (Hospital A.C. Camargo, 1982 – 2010).....	33
Tabela 11	Taxa de sobrevida mediana e global de acordo com estágio do leiomiossarcoma, (Hospital A.C. Camargo, 1982 – 2009).....	36
Tabela 12	Análise da sobrevida mediana em relação a variáveis clinicopatológicas (SM: Sobrevida mediana) (Hospital A.C. Camargo, 1982 – 2009).....	40
Tabela 13	Análise da sobrevida livre de doença mediana em relação a variáveis demográficas, clínicas e anatomopatológicas (SLM: Sobrevida livre de doença mediana) (Hospital A.C. Camargo, 1982 – 2009).....	47
Tabela 14	Modelo multivariado de avaliação da expressão imunoistoquímica de TOP2A como possível fator de risco para óbito e recidiva nos leiomiossarcomas uterinos (Hospital A.C. Camargo, 1982-2009).....	48
Tabela 15	Modelo multivariado de avaliação do número de cópias do gene TOP2A como possível fator de risco para óbito e recidiva nos leiomiossarcomas uterinos (Hospital A.C. Camargo, 1982-2009).....	48

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATP	adenosina trifosfato
DNA	ácido desoxirribonucleico
FIGO	International Federation of Gynecology and Obstetrics
HACC	Hospital A.C. Camargo
HE	Hematoxilina-Eosina
<i>HER2</i>	Human Epidermal growth factor Receptor 2
INCA	Instituto Nacional do Câncer
M/10 CGA	mitose por 10 campos de grande aumento
RM	Ressonância Magnética
SG	Sobrevida global
SLD	Sobrevida livre de doença
SLM	Sobrevida livre de doença mediana
STUMP	Tumor de músculo liso de potencial maligno incerto
TC	Tomografia Computadorizada
<i>TOP2A</i>	gene Topoisomerase 2 alfa
Top2A	proteína Topoisomerase 2 alfa
<i>TOP2B</i>	gene Topoisomerase 2 beta
Top2B	proteína Topoisomerase 2 beta
US	Ultrassonografia
WHO	World Health Organization

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Leiomiossarcoma de útero	1
1.2	Prognóstico e tratamento.....	5
1.3	Topoisomerase II alfa	8
2	OBJETIVOS	12
3	METODOLOGIA	13
3.1	Pacientes.....	13
3.2	Ficha de Registro de Dados	14
3.3	Construção do tissue microarray-TMA	14
3.4	Análise da proteína.....	15
3.5	Análise do número de cópias do gene	17
3.6	Análise Estatística	18
3.7	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	20
3.8	Descrição da casuística.....	21
4	RESULTADOS	23
4.1	Dados demográficos, clínicos e cirúrgicos.....	23
4.2	Dados anatomopatológicos	25
4.3	Dados de seguimento.....	26
4.4	Análise da relação entre estágio e tratamento quimioterápico e radioterápico.....	27
4.5	Avaliação da expressão da proteína Top2A.....	28
4.6	Avaliação do número de cópias do gene <i>TOP2A</i>	31
4.7	Avaliação da expressão da proteína top2a em relação ao número de cópias do gene	32
4.8	Análise da sobrevida global.....	33
4.9	Análise da sobrevida livre de doença	41

4.10	Análise multivariada	48
5	DISCUSSÃO	49
6	CONCLUSÕES	61
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

ANEXOS

Anexo 1 Protocolo sarcoma uterino

Anexo 2 Parecer final do Comitê de Ética em Pesquisa

1 INTRODUÇÃO

1.1 LEIOMIOSSARCOMA DE ÚTERO

Em 2012, estudos epidemiológicos mostram que câncer de útero é o oitavo câncer mais comum em mulheres brasileiras, com estimativa de 4520 casos novos em 2012, o que representa 2,5% de todas as neoplasias malignas (Ministério da Saúde 2011). Sarcomas uterinos são raros, representando somente 3 a 8% dos tumores malignos do útero (MAJOR et al. 1993; UEDA et al. 2008).

Sarcomas são tumores originários dos elementos mesenquimais e são distinguidos dos carcinomas que se originam de elementos epiteliais. Histologicamente, sarcomas uterinos são classificados como leiomiossarcomas, perfazendo 40% dos casos, carcinosarcomas ou tumores müllerianos mistos malignos (40%), sarcomas do estroma endometrial (10 a 15%) e sarcomas indiferenciados (5 a 10%). Mais recentemente, carcinosarcomas estão sendo reclassificados como formas desdiferenciadas ou metaplásicas de carcinomas endometriais, apesar de que a Classificação da Organização Mundial da Saúde de 2003 (TAVASSOLI 2003) ainda o classifica como sarcoma uterino (D'ANGELO e PRAT 2010).

O prognóstico de pacientes com sarcoma uterino não tem mudado nas últimas décadas. A sobrevida global de 5 anos tem estado entre 17 e

54% em vários estudos. Um estudo prévio mostrou taxa de sobrevida global de 2, 5 e 10 anos de 62%, 51% e 38%, respectivamente. Na análise multivariada, estágio, idade, tamanho do tumor e paridade mostraram ter influência independentemente na sobrevida global destes pacientes (KOIVISTO-KORANDER et al. 2008).

Após o carcinossarcoma, o leiomiossarcoma é o subtipo mais comum de sarcoma uterino, perfazendo 1 a 2% das malignidades uterinas (REED et al. 2003; GIUNTOLI et al. 2003; SOLOMON et al. 2005). A maioria dos casos ocorre em mulheres com cerca de 40 anos e apresenta-se como sangramento vaginal em 56% dos casos, massa pélvica palpável em 54% ou dor pélvica em 22%. Raramente, podem apresentar-se como hemoperitônio, extensão extra-uterina ou metástases. Sintomas e sinais são muito semelhantes aos de leiomiomas e a distinção pré-operatória é difícil. Suspeita-se de malignidade pela presença de certos comportamentos clínicos, tais como crescimento tumoral em mulheres na menopausa sem reposição hormonal (REED et al. 2003; PERRI et al. 2009).

Nenhum exame de imagem pode oferecer um diagnóstico pré-operatório confiável. Tomografia computadorizada é incapaz de diferenciar tumores mesenquimais benignos de malignos. Ultrassonografia e Ressonância Magnética podem trazer mais informações, porém ainda são insatisfatórios para o diagnóstico diferencial. A presença de invasão, crescimento e necrose hemorrágica pelo exame de Ressonância Magnética podem sugerir malignidade (SUTTON et al. 2004; VALENTIN 2006; AMANT et al. 2009).

Os principais critérios para diagnóstico histopatológico de leiomiossarcoma uterino são a presença de atipia citológica, alto índice mitótico e presença de necrose celular coagulativa. Além disso, frequentemente mostram bordas irregulares e infiltrativas bem como invasão vascular. O diagnóstico de leiomiossarcoma é feito em qualquer tumor de músculo liso que apresente necrose coagulativa com a presença de atipia citológica e qualquer índice mitótico, e também naqueles com necrose coagulativa e 10 ou mais mitoses/10 CGA, mesmo na ausência de atipia citológica. Nenhum destes achados é válido como critério único e o diagnóstico baseia-se na avaliação cumulativa de todas estas características (BELL et al. 1994; REED et al. 2003; TAVASSOLI e DEVILEE 2003; GADDUCCI 2011).

Ocasionalmente, as características histológicas são insuficientes para classificá-los em benignos ou malignos, sendo ideal em tais casos utilizar o termo “tumores de músculo liso de potencial maligno incerto” (STUMP).

Leiomiossarcoma epitelióide e mixóide são duas variantes que podem ser difíceis de serem reconhecidas microscopicamente, devido as suas características histopatológicas diferirem daquelas dos leiomiossarcomas de células fusiformes habituais. Atipia nuclear é branda em ambos os tipos tumorais e o índice mitótico é frequentemente menor do que 3 M/10 CGA. Nos leiomiossarcomas epitelióides, necrose pode estar ausente e leiomiossarcomas mixóides são frequentemente hipocelulares. Na ausência de atipia celular severa e atividade mitótica alta, ambos os tumores são

diagnosticado como sarcoma baseado em suas bordas infiltrativas (ATKINS et al. 2001; REED et al. 2003; GADDUCCI 2011).

REED et al. (2003) relatam que os leiomiossarcomas geralmente expressam marcadores de músculo liso, tais como desmina, h-caldesmon, e actina de músculo liso. Porém, leiomiossarcomas epitelióides e mixóides podem mostrar graus menores de imunorreação para estes marcadores. Também expressam receptores de estrógeno, de progesterona e de andrógeno em 30 – 40% dos casos.

Os leiomiossarcomas uterinos apresentam níveis mais elevados de Ki67, comparados aos leiomiomas. Mutações do gene e hiperexpressão da proteína p53 têm sido descritas em 25 a 47% dos leiomiossarcomas uterinos e ausente nos leiomiomas (ZHAI et al. 1999; AKHAN et al. 2005; CHEN e YANG 2008). O proto-oncogene c-Kit tem sido identificado como alterado em leiomiossarcomas e em outros sarcomas uterinos (WANG et al. 2003; LEATH et al. 2004).

Ao contrário de leiomiomas e tecido miometrial normal, a maioria dos leiomiossarcomas uterinos mostram alteração na expressão de muitos genes envolvidos na proliferação celular e regulação do ciclo celular. Em particular, a expressão aumentada de p16 está mais frequentemente presente em leiomiossarcomas uterinos do que em leiomiomas e miométrio normal (ATKINS et al. 2008).

Segundo THWAY (2009), a sarcogênese não é claramente compreendida, mas os modelos de progressão gradual para malignidade a partir de lesões displásicas ou precursoras não foram demonstradas como

em outras neoplasias epiteliais. Em contraste com tumores epiteliais, sarcomas freqüentemente não surgem do tecido maduro correspondente e a sua célula progenitora ainda não está clara.

Leiomiossarcomas uterinos são tumores geneticamente instáveis caracterizados por anormalidades cromossômicas complexas e ampla desregulação gênica. Até o momento nenhuma translocação cromossômica ou mutação genética específica foi sido identificada (IP e CHEUNG 2011).

Embora a classificação dos tumores de partes moles ainda é em grande parte determinada no aspecto histológico, existe recentemente uma melhor caracterização de eventos genéticos específicos. Os recentes avanços na biologia molecular, incluindo perfis de expressão gênica, podem trazer uma contribuição significativa como histomorfologia (THWAY 2009).

1.2 PROGNÓSTICO E TRATAMENTO

Os leiomiossarcomas uterinos são tumores muito agressivos, mesmo quando confinados ao útero ou em estágio precoce. A taxa de recorrência tem variado de 53% a 71% (REED et al. 2003). A primeira recorrência ocorre no pulmão em 40% das pacientes e na pelve em 13%. A taxa de sobrevida global em 5 anos varia de 15% a 25%, com sobrevida mediana de 10 meses (REED et al. 2003; GIUNTOLI et al. 2003; TROPÉ et al. 2012).

O estágio da doença (Quadro 1) é o fator prognóstico mais importante e no caso dos leiomiossarcomas estágio I, tamanho do tumor e índice

mitótico foram correlacionados à sobrevida (D'ANGELO e PRAT 2010; TROPÉ et al. 2012).

Quadro 1 - Estadiamento do leiomiossarcoma uterino.

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

Fonte: Adaptado da *International Federation of Gynecology and Obstetrics* (FIGO) de 2009.

O tratamento primário do leiomiossarcoma do útero é cirúrgico, consistindo de laparotomia exploradora, histerectomia abdominal total, cuidadosa avaliação para disseminação peritoneal e *debulking* tumoral se houver disseminação peritoneal extra-uterina. Ooforectomia e linfadenectomia permanecem controversas, já que metástases para estes órgãos são eventos raros e a ressecção destas estruturas parece não mudar o prognóstico da paciente (REED et al. 2003; LEITÃO et al. 2003; SOLOMON et al. 2005; TROPÉ et al. 2012).

A influência do tratamento adjuvante na sobrevida é incerta. Para HARDMAN et al. (2007), alguns pacientes com leiomiossarcoma uterino

metastático podem responder a tratamento hormonal. REED et al. (2008) concluíram em seus estudos que radioterapia pode ser útil no controle da recorrência local, mas não mostra benefício na sobrevida global.

A quimioterapia com doxorubicina ou docetaxel/gemcitabina é usada para doença avançada ou recorrente, com taxas de resposta variando de 27% a 36% (HENSLEY et al. 2008; HENSLEY et al. 2009). No entanto, as informações sobre o papel da quimioterapia são limitadas em sarcomas uterinos. Extrapolação da literatura de sarcomas de partes moles em geral indica que a quimioterapia adjuvante com doxorubicina e ifosfamida atrasa a recorrência local e a distância, embora não pareça melhorar a sobrevida global (BLAY e LE 2009). HENSLEY (2011) cita em seu estudo que os agentes ativos em leiomiossarcoma uterino metastático incluem gencitabine associado ao docetaxel, doxorubicina e ifosfamida. Porém nenhuma terapia adjuvante tem provado prolongar a sobrevida global, incluindo os casos dos leiomiossarcomas restritos ao útero (HENSLEY 2011; TROPÉ et al. 2012).

Não está claro atualmente se a quimioterapia realmente não tem benefício ou se há benefício apenas para um subgrupo de pacientes (BLAY e LE 2009).

Devido às incertezas das informações disponíveis atualmente, há a necessidade de identificarmos subgrupos de pacientes que poderiam ser beneficiados com sistemas da quimioterapia.

1.3 TOPOISOMERASE II ALFA

O gene *Topoisomerase II alfa* (*TOP2A*) localiza-se no cromossomo 17 (17q21-q22) e codifica uma DNA-topoisomerase que é notavelmente supra-regulada em células em proliferação. Segundo o estudo de WANG (2002), DNA-topoisomerases são essenciais para as células porque controlam o estado topológico do DNA, o qual determina a função celular do material genético, através da quebra reversível das fitas do DNA. Topoisomerases do tipo I quebram as cadeias de DNA transitoriamente uma por vez, enquanto as enzimas do tipo II relaxam DNA super-enrolado por meio de quebras transitórias da dupla fita numa reação que é dependente de ATP (WANG 2002).

BERGER et al. (1996) mostram em seu estudo que Topoisomerases do tipo II são essenciais para a estrutura adequada e condensação/descondensação de cromossomos, durante a segregação dos cromossomos e em muitos outros processos do metabolismo do DNA, como reduzir o estresse da torção quando necessário.

DRAKE et al. (1989) revelaram que a atividade catalítica da topoisomerase II é mediada por duas isoenzimas diferentes, *TOP2A* e *TOP2B*. Estas enzimas são codificadas por diferentes genes em diferentes cromossomos e diferem tanto na concentração nuclear quanto na concentração relativa durante o ciclo celular. A expressão de *Top2A*, mas não a de *Top2B*, depende da fase da proliferação celular. Sua expressão aumenta na fase S e durante G2/M e diminui após a mitose (DRAKE et al. 1989; SANDRI et al. 1996; CHRISTENSEN et al. 2002).

Além do mais, CARPENTER e PORTER (2004) reportaram que células humanas onde a expressão de Top2A foi silenciada falham em completar a mitose porque a segregação celular é deficiente.

ROMERO et al. (2012) especulam que uma especialização funcional destas isoenzimas podem ter evoluído em células de mamíferos, de modo que as funções essenciais em proliferação celular podem ser realizadas por Top2A, enquanto Top2B não pode desempenhar um papel predominante na proliferação celular e pode estar principalmente envolvido na transcrição do gene.

A expressão aumentada de Top2A em linhagem celulares é deletéria e leva a apoptose. Aparentemente, o acúmulo de quebras de DNA, devido ao aumento da atividade da enzima, desencadeia vias apoptóticas (MCPHERSON e GOLDENBERG 1998). Em tumores humanos, expressão aumentada de Top2A tem sido correlacionada com proliferação celular, pior prognóstico e agressividade (FELIX 1998; WONG et al. 2009; CUNHA et al. 2012).

Topoisomerase II alfa pode auxiliar na classificação, determinação da patogênese e a terapia alvo. KOSARI et al. (2008) descreveram Top2A como um dos mais significativos marcadores para agressividade no câncer de próstata.

Em tumores de partes moles, o aumento da expressão do gene *TOP2A* foi observado naqueles com potencial metastático (CUNHA et al. 2010). Em sarcomas de partes moles, RUDOLPH et al. (1997) evidenciaram

que forte expressão de Top2A na imunohistoquímica está correlacionada com características tumorais de agressividade.

TOP2A é um alvo molecular direto da ação do grupo de droga antraciclinas (DRAKE et al. 1989; WANG 1996). Porém, antraciclinas podem induzir toxicidade celular através de outros mecanismos como, por exemplo, dano oxidativo nas células (MINOTTI et al. 2004).

Tem sido sugerido que a diminuição da expressão está correlacionada a resistência a antraciclinas e sua amplificação/hiperexpressão está associada a maior resposta a este quimioterápico (WANG 1996; BERGER et al. 1996; ROMERO et al. 2012).

O gene *TOP2A* tem recebido muito enfoque, principalmente nos estudos de câncer de mama. No passado, amplificação/*hiperexpressão* de *HER2* tinha sido relatada como marcador preditivo de benefício a tratamento adjuvante com antraciclinas, porém estudos mais recentes mostram que esta associação pode ser devido à freqüente coamplificação do *TOP2A* e *HER2* (KNOOP et al. 2005; Scandinavian Breast Group Trial 9401 et al. 2006; ARRIOLA et al. 2007). Há estudos sugerindo que amplificação de *TOP2A* está restrita a tumores com amplificação e/ou hiperexpressão de *HER2*, mas esta questão ainda permanece muito controversa (ARRIOLA et al. 2007).

ORLANDO et al. (2008) observaram que pacientes com tumores de mama hiperexpressores de *HER2* e não responsivos a tratamento hormonal apresentavam amplificação do *TOP2A* ou polissomia do cromossomo 17 e correlacionava-se com probabilidade significativamente alta de resposta

patológica completa após tratamento neoadjuvante com quimioterapia baseada em antraciclinas.

Em outro estudo, no qual se analisou pacientes com tumores de mama tratados com quimioterapia baseada em antraciclina neoadjuvante, a positividade do *HER2* indicou taxas mais altas de recorrência local e à distância. Já nos pacientes com positividade imunohistoquímica do Top2A, observou-se risco mais baixo de metástase e óbito. Neste estudo, a amplificação do gene *TOP2A* não teve valor significativo (SCHINDLBECK et al. 2010).

Em relação ao leiomiossarcoma de útero, não há nenhum estudo conhecido associando-o a alteração do gene *Topoisomerase II alfa*, apesar de antraciclinas serem muito utilizados no tratamento destes tumores, principalmente em casos metastáticos e recorrentes. Assim, temos por objetivo fazer uma análise retrospectiva do padrão de amplificação do gene *TOP2A* e da expressão de sua proteína em relação aos leiomiossarcomas uterinos.

2 OBJETIVOS

- 1) Avaliar a expressão da proteína *TOP2A* utilizando técnica de imunohistoquímica em uma série de pacientes portadora de leiomiossarcoma de uterino;
- 2) Avaliar o número de cópias do gene *TOP2A* utilizando da técnica de hibridização *in situ* fluorescente;
- 3) Comparar entre a expressão da proteína Top2A e o número de cópias do gene *TOP2A*;
- 4) Correlacionar os achados da expressão protéica do Top2A e o número de cópias do gene *TOP2A* com características clínicopatológicas;
- 5) Avaliar o papel da expressão proteica e do número de cópias do gene *TOP2A* como fator prognóstico para sobrevida livre de doença e sobrevida global.

3 METODOLOGIA

3.1 PACIENTES

As informações demográficas, do quadro clínico inicial, do tratamento e do seguimento de todas as mulheres diagnosticadas com leiomiossarcoma de útero entre 1982 e 2010 foram obtidas no Hospital A.C. Camargo, a partir da análise retrospectiva dos prontuários médicos.

Os critérios de inclusão foram aquelas pacientes com leiomiossarcoma uterino, que foram acompanhadas no Departamento de Ginecologia Oncológica do Hospital A.C. Camargo e que possuíam material anatomopatológico para estudo de imunoistoquímica e FISH. Os critérios de exclusão foram aquelas pacientes que não tinham informação clínica e nem material anatomopatológico disponível.

Os casos foram resgatados do arquivo de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo, revistos por dois patologistas (Isabela Werneck da Cunha e Roberto Falzoni) e reclassificados, quando necessário. Para cada caso foi avaliado a presença de necrose (presente ou ausente), celularidade (baixa, moderada, alta), atipia nuclear (leve, moderada, intensa) e índice mitótico (em 10 campos de grande aumento). Os casos de sarcoma de útero indiferenciados ou que geraram dúvidas, foram submetidos a estudo imunoistoquímico para esclarecimento do subtipo histológico e confirmação

de leiomiossarcoma. Foi selecionado uma área representativa do tumor para a montagem do TMA.

3.2 FICHA DE REGISTRO DE DADOS

Utilizado ficha de registro com itens para coleta de informações diversas, sobre o paciente, quadro clínico inicial, tratamento, seguimento e resultado da avaliação anatomopatológica. O modelo da ficha foi utilizado para levantamento dos casos de Sarcomas uterinos do Departamento de Ginecologia Oncologica do Hospital A.C. Camargo (Anexo 1).

3.3 CONSTRUÇÃO DO TISSUE MICROARRAY-TMA

O TMA é um bloco de parafina composto de múltiplos espécimes que podem ser simultaneamente investigados em diferentes técnicas *in situ*, resultando em significativas redução de tempo e custo, comparado com estudos histopatológicos convencionais. Foi escolhida duas áreas de cada tumor selecionado para confecção do TMA.

O TMA foi construído utilizando-se o dispositivo técnico chamado de “tissue microarrayer” (Beecher Instruments, Silver Springs, EUA). A área identificada no bloco de parafina do doador foi puncionada com agulha de 1mm e os cilindros obtidos transferidos para o bloco de parafina receptor.

Um mapa com identificação detalhada de cada cilindro foi construído em planilha de Excel®, permitindo a localização exata de cada caso. Um caso foi definido como adequado quando o corte resultante ocupava pelo

menos 20% da área total do cilindro. Realizados cortes seqüenciais de 4 μ m de espessura, que foram colhidos em lâminas convencionais polarizadas.

3.4 ANÁLISE DA PROTEÍNA

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

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

A peroxidase endógena foi bloqueada em solução de peróxido de hidrogênio a 3%, com a duração de 20 minutos, sendo 4 trocas de 5 minutos cada. As lâminas, a seguir, foram lavadas em água corrente e um banho de PBS de 5 min.

Em seguida os cortes foram incubados com bloqueador de proteínas (DAKO) por 5 minutos, à temperatura ambiente e em câmara úmida.

O excesso do bloqueador foi retirado com lavagem em PBS e os cortes incubados com anticorpo primário TOP2A da marca DAKO®, numa diluição de 1:400, por 60 minutos à temperatura ambiente.

As lâminas foram lavadas em tampão PBS (3 trocas de 5 minutos cada) e, em seguida, incubadas com o anticorpo secundário e com o

polímero HRP (Kit Advance-DAKO), durante 30 minutos cada reagente, em câmara úmida, à temperatura ambiente.

Após lavagem em PBS, os cortes foram incubados com o cromógeno Diaminobenzidina (DAB – DAKO), por 5 minutos, sendo as lâminas lavadas em água corrente e contracoradas com hematoxilina de Harris, por 2 segundos; lavadas em água corrente, desidratadas em álcool, xilol, e montadas em equipamento automatizado (Tissue-Tek film).

Para classificação da expressão protéica de Top2A, foram analisados por um patologista, em microscópio comum, dois níveis de TMA. Como a positividade observada era nuclear, levamos em consideração apenas o número de células positivas, que foi dividido em 0 (negativa), 1 (fraca: 1 a 25% de células positivas), 2 (moderada: 26 a 50% de células positivas) e 3 (forte: >50% de células positivas).

0 – negativo

- | | | |
|----|--------------------------------|----------|
| 1: | 1 a 25% de células positivas: | fraco |
| 2: | 26 a 50% de células positivas: | moderado |
| 3: | >50% de células positivas: | forte |

Foi então obtida uma média de expressão dos 2 níveis do TMA, sendo classificado como alta expressão quando a média encontrada foi maior ou igual a 2,0 e baixa expressão quando menor que 2,0.

3.5 ANÁLISE DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE

Foram utilizadas as sondas triplas *TOP2A*, *HER-2/neu* e região centromérica do cromossomo 17 (Kreatech Diagnostics, Amsterdam, NL) para os ensaios de FISH. Após a desparafinização em três lavagens com xilol 100% de 10 minutos cada, a lâmina foi reidratada por meio de três lavagens com etanol 100% de 5 minutos cada. Em seguida, as lâminas foram tratadas com 0,2 mmol/L de HCl por 20 minutos, a temperatura ambiente. As lâminas foram, então, incubadas em solução citrato pH 6,0 tampão por 60 minutos a 82°C em banho-maria. Na seqüência, as lâminas foram incubadas com pepsina (ready-to-use/DAKO) por 8 minutos para a digestão protéica. Finalmente, as lâminas foram lavadas em solução estrigente (2X SSC – DAKO) seguida de desidratação em etanol 70%, 85% e 100%. Foi aplicado 10 µl de sonda cobertas com lâminas seladas com coverslip sealant (DAKO) e incubadas em hibridizados para desnaturação a 90°C por 10 minutos, e hibridação a 37°C por 20 horas. Após hibridação, a lâmina foi retirada e incubada em solução de 1,5M UREA/0,1xSSC em banho maria a 45°C. Na sequêcia, lavada em solução 2X SSC por 2 minutos a temperatura ambiente, desidratada em álcool 70%, 85% e 100%, secagem ao ar e aplicado 15µl de DAPI counterstain (DAKO) e montagem com lamínula. As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência.

As lâminas foram analisadas utilizando-se o microscópio de fluorescência (BX61, Olympus, Center Valley, PA, USA), e as imagens

capturadas usando o programa Image Pro Plus[®]. Para cada caso, foram contadas 20 células e os resultados foram informados de acordo com o número de sinais obtidos tanto para a sonda centromérica quanto para o gene *TOP2A*. Um caso foi considerado normal, quando houve 2 sinais para a sonda centromérica e 2 sinais para *TOP2A*, amplificado ou ganho genômico quando houve mais de 4 sinais de *TOP2A* e 2 sinais de sonda centromérica, trissomia quando houve 3 sinais tanto para sonda centromérica quanto para sonda de *TOP2A* e polissomia quando houve mais de 4 sinais tanto para as sondas centroméricas quanto para a sonda de *TOP2A*.

Em relação ao número de cópias do gene *TOP2A* analisado pela técnica de hibridização in situ fluorescente, agrupamos as variáveis Amplificado, Ganho Genômico e Polissomia numa mesma categoria: Alterado.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados coletados dos prontuários foram transcritos para ficha padronizada e digitados em computador para gerenciamento do banco de dados e análise estatística. A confecção do banco de dados e as análises foram feitas no programa estatístico “*Statistical Package for Social Sciences*” versão 16.0 for Mac (SPSS, Inc., Chicago, IL).

Inicialmente foram calculadas freqüências simples de todas as variáveis. As associações entre as variáveis categóricas foram analisadas

pelo teste qui-quadrado bi-caudal ou pelo teste exato de Fisher quando pelo menos uma freqüência esperada foi menor do que 5.

Definimos como doença restrita ao útero os tumores com estadiamento I e como doença extra-uterina os tumores estadiamento II, III e IV.

Utilizou-se o método de Kaplan-Meier para os cálculos de probabilidade de sobrevida global e livre de doença aos 3 anos. A data da cirurgia foi considerada como o momento inicial do seguimento. Para o cálculo do intervalo livre de doença considerou-se como momento final a data da recorrência. Foram excluídas desta análise as mulheres com intervalo livre de doença menor do que 4 meses, por considerar que esta situação corresponde, na maioria das vezes, à persistência de doença e não à recorrência. Também foram excluídas aquelas nos estádios IV. Para o cálculo da sobrevida global considerou-se como momento final a data do óbito. Classificou-se como censura o caso em que não se registrou óbito ou recorrência e, nesta situação, o momento final da análise correspondeu a data da última informação clínica (KAPLAN e MEIER 1958).

Em ambas análises de sobrevida (global e livre de doença) foram excluídas as pacientes admitidas após 2009. Tal medida visou garantir que todas as mulheres tivessem, em teoria, a mesma possibilidade de tempo de seguimento e não inferior a 3 anos. Utilizou-se o teste de log-rank para se comparar as curvas de sobrevida entre os grupos.

Coletaram-se as informações acerca da expressão do Top2A e número cópias do gene *TOP2A* originalmente como variáveis numéricas.

Estas foram convertidas em variáveis dicotômicas para que fosse possível a análise de sobrevida. A expressão imunoistoquímica de Top2A e o número de cópias do gene *TOP2A* foram avaliados em modelo multivariado não exploratório. Para tanto, utilizou-se o modelo de riscos proporcionais de COX (1972). Foram adotadas como variáveis de ajuste compulsório: estadiamento (estádio I e II versus III e IV) e período do tratamento (1980-1995 e 1996-2009). A expressão imunoistoquímica de Top2A (baixa expressão ou alta expressão) e o número de cópias do gene *TOP2A* (normal ou alterado) foram inseridas no modelo multivariado como variáveis categóricas. Em todos os testes estatísticos o nível de significância foi igual a 5%.

3.7 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Não foi necessário o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido específico para o estudo, já que se realizou o estudo a partir de casos selecionados dos arquivos de anatomia patológica, não envolvendo experimentação ou entrevista com as pacientes. Garantiu-se o sigilo de todas as pacientes, não sendo divulgado publicamente o nome ou qualquer outra informação que pudesse identificar individualmente as mulheres envolvidas neste estudo. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em julho de 2011. Anexo 2.

3.8 DESCRIÇÃO DA CASUÍSTICA

Foram identificados 188 casos de pacientes com sarcoma uterino tratadas no Hospital A.C. Camargo no período de 1982 a 2010. Destes, 104 eram leiomiossarcomas uterinos. Apenas 76 pacientes com leiomiossarcoma uterino tratadas no Hospital A.C. Camargo tinham análise anatomopatológica realizada em nosso serviço. Dentre as 76 pacientes selecionadas para o estudo, excluíram-se inicialmente 33 devido a não localização do material anatomopatológico. Das 43 pacientes resultantes, outros 6 casos foram excluídos porque na revisão anatomopatológica e imunoistoquímica foram reclassificados como leiomioma com atipia ou STUMP. Assim, 37 pacientes com leiomiossarcoma tiveram seus casos incluídos neste estudo (Figura 1).

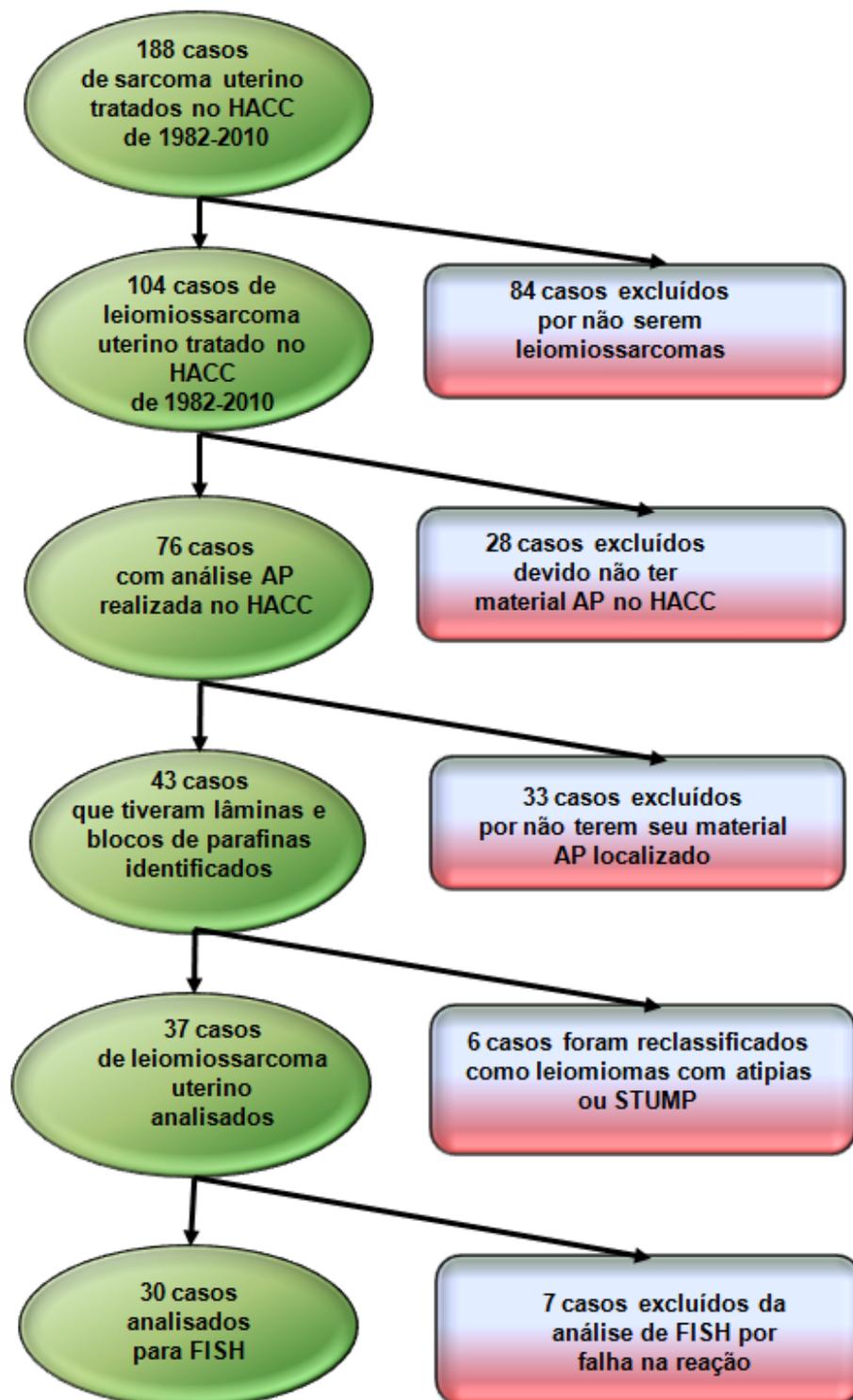


Figura 1 - Fluxograma demonstrando a descrição da casuística (AP anatomopatológico, HACC Hospital A.C. Camargo)

4 RESULTADOS

4.1 DADOS DEMOGRÁFICOS, CLÍNICOS E CIRÚRGICOS

A idade mediana das pacientes na amostra estudada foi de 50,2 anos, variando de 27 a 84 anos. O maior diâmetro do tumor tinha a mediana de 8 cm, sendo o menor de 1 cm e o maior de 60 cm. Não houve nenhuma paciente que recebeu radioterapia pélvica previamente. As 37 pacientes tinham apenas um único tumor maligno no útero.

O diagnóstico de leiomiosarcoma restrito ao útero foi em todos os casos feito após cirurgia primária para tratamento de suposto leiomioma. As cirurgias primárias foram histerectomia e miomectomia na maioria das pacientes.

As características demográficas, clínicas e dos achados intra-operatórios das pacientes com leiomiossarcoma estão descritas na Tabela 1.

A relação de estadiamento de pacientes com leiomiossarcoma uterino conforme o período do tratamento até 2009 está exposto na Tabela 2.

Tabela 1 - Características clínicas e de achados intra-operatórios das pacientes com leiomiossarcoma de útero (Hospital A.C. Camargo, 1982 – 2010).

Variáveis	Categorias	N (%)
Raça	Branca	22 (59,5)
	Negra	3 (8,1)
	Parda	2 (5,4)
	Amarela	2 (5,4)
	Ignorado	8 (21,6)
Menopausa	Não	17 (45,9)
	Sim	20 (54,1)
Forma de diagnóstico	Curetagem	7 (18,9)
	Histeroscopia	1 (2,7)
	Biópsia de colo	1 (2,7)
	Achados pós operatórios	26 (70,3)
	Ignorado	2 (5,4)
Sintomas iniciais	Assintomático	4 (10,8)
	Dor pélvica	10 (27,0)
	Sangramento vaginal	15 (40,5)
	Corrimento vaginal	1 (2,7)
	Massa pélvica	4 (10,8)
Local da cirurgia	Ignorado	3 (8,1)
	HAAC	16 (43,2)
Linfonomegalia no intraoperatório	fora	21 (56,8)
	Não	19 (51,4)
	Sim	4 (10,8)
Linfadenectomia	Ignorado	14 (37,8)
	Não	31 (86,1)
Estadiamento FIGO	Sim	5 (13,9)
	I	18 (48,6)
	II	6 (16,2)
	III	4 (10,8)
Quimioterapia*	IV	9 (24,3)
	Não	19 (54,3)
	Com antraciclina	6 (17,1)
Radioterapia externa* (cGy)	Sem antraciclina	10 (28,6)
	Não	29 (82,9)
Braquiterapia*	Sim	6 (17,1)
	Não	31 (88,6)
	Sim	4 (11,4)

* 02 casos não havia informação sobre tratamento adjuvante.

Tabela 2 - Análise da relação do estadiamento de pacientes com leiomiossarcoma uterino conforme período do tratamento até 2009 (Hospital A.C. Camargo, 1982 – 2009).

Estádio	Período do tratamento (%)		
	1982 – 1995	1986 – 2009	Total
I	7 (53,8)	6 (46,2)	13
II e III	1 (14,3)	6(85,7)	7
IV	4 (57,1)	3 (42,9)	7

4.2 DADOS ANATOMOPATOLÓGICOS

As características anatomopatológicas das pacientes estudadas estão relacionadas na Tabela 3. Exemplo de atipia citológica em leiomiossarcoma uterino está representado na Figura 2.

Tabela 3 - Características anatomopatológicas do tumor das pacientes com leiomiossarcoma (Hospital A.C. Camargo, 1982 – 2010) (M/10CGA: mitose por 10 campos de grande aumento).

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

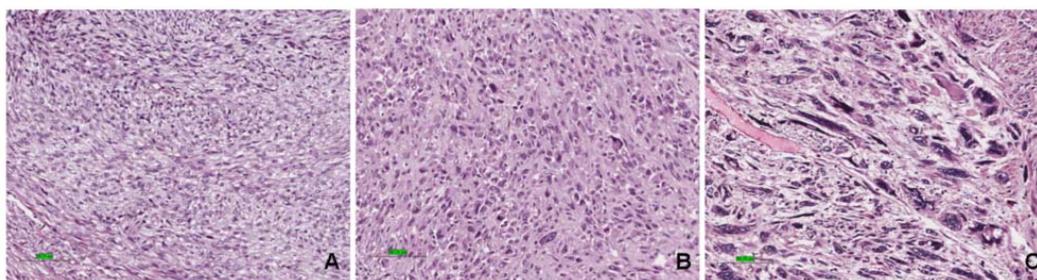


Figura 2 - Fotomicrografias mostrando leiomiossarcoma uterinos (HE) apresentando em A atipia leve, em B atipia moderada e em C atipia severa.

4.3 DADOS DE SEGUIMENTO

Das 37 pacientes do estudo, 32,4% não apresentaram recidiva, 43,2% apresentaram recidiva e 24% apresentaram persistência da doença por ser estágio clínico IV. Das pacientes que apresentaram recidiva, 42,1% foi local, 47,4% à distância e 10,5% apresentaram tanto recidiva local quanto à distância. O tempo médio para recidiva foi de 16 meses e a mediana, de 12 meses, variando de 4,6 a 69 meses. A situação final dos pacientes está resumida na Tabela 4.

Tabela 4 - Situação final das 37 pacientes com leiomiossarcoma (Hospital A.C. Camargo, 1982 – 2010).

Variáveis	Categorias	N (%)
Situação	Vivo sem doença	7 (18,9)
	Vivo com doença	3 (8,1)
	Morte pela doença	22 (59,5)
	Morte pelo tratamento	2 (5,4)
	Morte por outras causas	2 (5,4)
	Perdido de seguimento	1 (3,7)

4.4 ANÁLISE DA RELAÇÃO ENTRE ESTÁDIO E TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO E RADIOTERÁPICO

Daquelas pacientes com leiomiossarcoma estágio I, 25,0% realizaram quimioterapia e 18,7% radioterapia adjuvante. Quando a neoplasia era estágio II, III ou IV, 63,1% realizaram quimioterapia e 15,7% realizaram radioterapia.

A relação entre pacientes que realizaram quimioterapia e radioterapia conforme o estágio clínico está mostrada nas Tabelas 5 e 6.

Tabela 5 - Relação entre estadiamento e quimioterapia (Hospital A.C. Camargo, 1982 – 2010).

Estádio FIGO	Quimioterapia* (%)			Total
	Não	QT sem antraciclinas	QT com antraciclinas	
I	12 (75,0)	4 (25,0)	0 (0)	16
II	3 (50,0)	1 (16,7)	2 (33,3)	6
III	2 (50,0)	2 (50,0)	0	4
IV	2 (22,2)	3 (33,3)	4 (44,4)	9

* 02 pacientes não apresentavam dados sobre tratamento quimioterápico.

Tabela 6 - Relação entre estadiamento e radioterapia (Hospital A.C. Camargo, 1982 – 2010).

Estádio FIGO	Radioterapia* (%)		Total
	Não	Sim	
I	13 (81,3)	3 (18,8)	16
II	4 (66,7)	2 (33,3)	6
III	3 (75,0)	1 (25,0)	4
IV	9 (100,0)	0 (0)	9

* 02 pacientes não apresentavam dados sobre tratamento radioterápico

4.5 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA TOP2A

A partir desta classificação, fizemos a média de 2 níveis de TMA, cuja distribuição está mostrada nas Figuras 3 e 4.

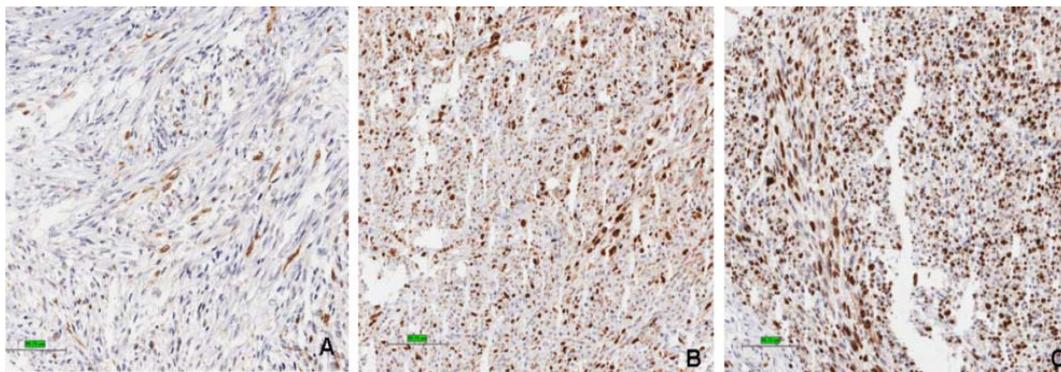


Figura 3 – Fotomicrografia ilustrando a expressão protéica do Top2A em leiomiossarcomas uterinos. Em A, expressão fraca (1 a 25% das células positivas). Em B, expressão moderada (26 a 50% das células positivas). Em C, expressão forte (mais de 50% das células positivas).

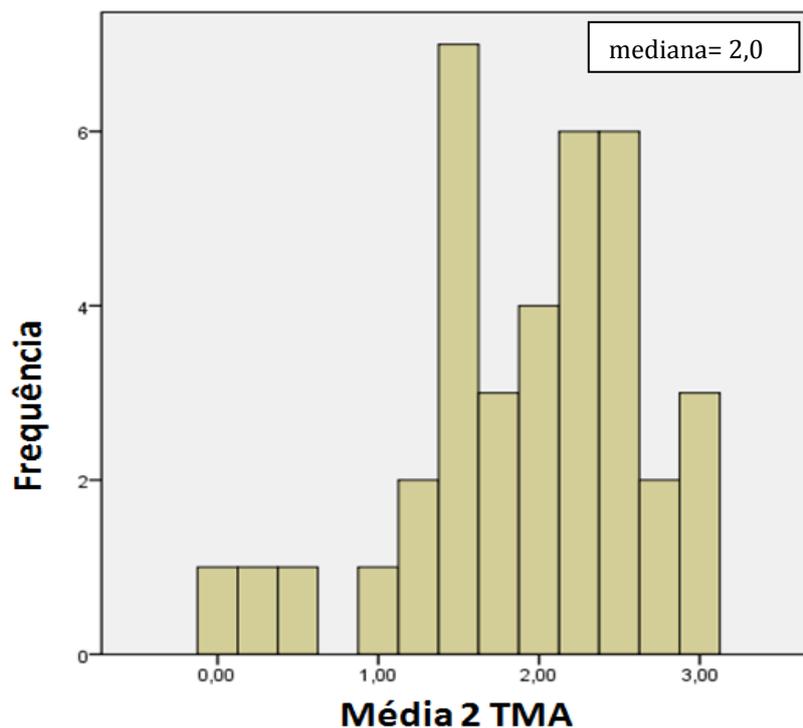


Figura 4 - Histograma com a distribuição das médias do número de células que expressavam a proteína Top2A em 2 níveis de TMA.

Na amostra, 43,2% apresentavam baixa expressão, enquanto 56,8%, apresentavam alta expressão da proteína Top2A.

Das pacientes com leiomiossarcoma estágio I, 61,1% apresentavam baixa expressão da proteína Top2A. Aquelas com neoplasia com estágio II, III e IV apresentavam alta expressão da proteína em 73,7%, com diferença estatisticamente significativa ($p=0,033$).

Sessenta e nove por cento das pacientes com leiomiossarcoma que tinham índice mitótico menor ou igual a 20 por 10 CGA apresentavam baixa expressão da proteína Top2A e 70,8% dos pacientes com índice mitótico maior do que 20 possuíam alta expressão de Top2A, sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p= 0,036$).

Não houve diferença estatisticamente significativa quando analisadas as expressões de proteínas Top2A com idade, maior diâmetro do tumor, com presença de atipia celular e com celularidade (Tabela 7).

Tabela 7 - Expressão da proteína Top2A com variáveis demográficas, clínicas e anatomopatológicas e idade (Hospital A.C. Camargo, 1982 – 2010).

Variáveis	Categorias	Expressão de Top2A (%)		Valor de p
		Baixa	Alta	
Estádio	I	11 (61,1)	7 (38,9)	0,03
	II, III e IV	5 (26,3)	14 (73,7)	
Índice mitótico (M/10CGA)	<= 20	9 (69,2)	4 (30,8)	0,03
	> 20	7 (29,2)	17 (70,8)	
Idade (anos)	<= 50	7 (38,9)	11 (61,1)	0,29
	>50	10 (52,6)	9 (47,4)	
Maior diâmetro da neoplasia* (cm)	<=8	7 (53,8)	6 (46,2)	0,84
	>8	6 (50,0)	6 (50,0)	
Celularidade	Baixa/moderada	7 (58,3)	5 (41,7)	0,19
	Alta	9 (36,0)	16 (64,0)	
Atipia celular	Leve/moderada	9 (50,0)	9 (50,0)	0,41
	Intensa	7 (36,8)	12 (63,2)	
Necrose	Ausente	1 (33,3)	2 (66,7)	1,0
	Presente	15 (44,1)	19 (55,9)	

* 12 pacientes não apresentavam dados sobre tamanho da neoplasia.

4.6 AVALIAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE TOP2A

Dos 37 casos presente no TMA, a avaliação do número de cópias do gene *TOP2A* foi possível em 30 casos. Destes, 19 (63,3%) apresentam número de cópias normal do gene *TOP2A*, enquanto 11 (36,7%) apresentaram número de cópias alterado, sendo 8 (72,7%) amplificado ou ganho, 2 (18,1%) polissomia e 1(9,1%) trissomia. Figura 5.

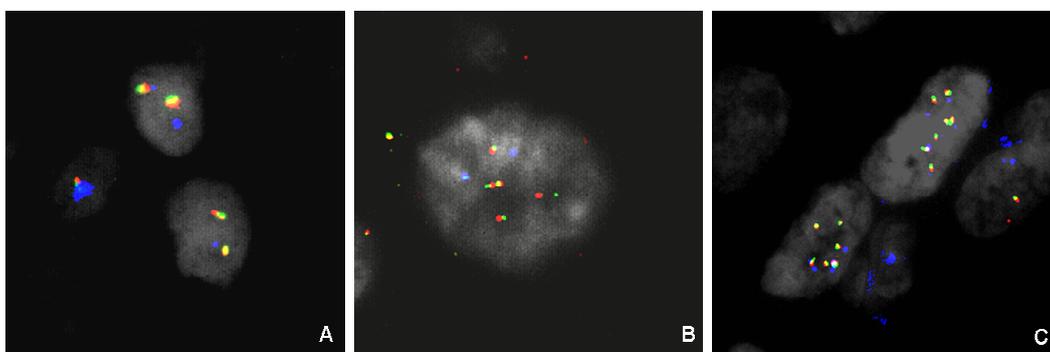


Figura 5 - Fotomicrografias mostrando reações de Hibridização in situ fluorescente (FISH) onde estão marcados em verde o gene *TOP2A*, em vermelho o gene *HER2* e em azul o centrômero do cromossomo 17. Em A, caso de leiomiossarcoma sem amplificação de *TOP2A*; em B, caso de leiomiossarcoma com amplificação de *TOP2A* e em C, caso de leiomiossarcoma com polissomia do cromossomo 17.

Não houve diferença estatisticamente significativa quando comparado o número de cópias do gene *TOP2A* com as variáveis analisadas neste estudo. O número de cópias do gene *TOP2A* não mostrou associação estatisticamente significativa com estadiamento clínico, tamanho do tumor, índice mitótico, celularidade, atipia celular e necrose, como demonstrado na Tabela 8.

Tabela 8 - Número de cópias do gene *TOP2A* com variáveis demográficas, clínicas e anatomopatológicas e idade (Hospital A.C. Camargo, 1982 – 2010).

Variáveis	Categorias	Número de cópias		valor de p
		Normal	Alterado	
Idade (anos)	<= 50	8 (50,0)	8 (50,0)	0,10
	>50	11 (78,6)	3 (21,4)	
Maior diâmetro da neoplasia (cm)	<=8	7 (70,0)	3 (30,0)	1,0
	>8	7 (63,6)	4 (36,4)	
Estadiamento FIGO	I	10 (66,7)	5 (33,3)	0,70
	II, III e IV	9 (60,0)	6 (40,0)	
Índice mitótico	<=20	6 (60,0)	4 (40,0)	1,0
	>20	13 (65,0)	7 (35,0)	
Celularidade	Baixa/moderada	6 (50,0)	6 (50,0)	0,26
	Alta	13 (72,2)	5 (27,8)	
Atipia celular	Leve/moderada	11 (78,6)	3 (21,4)	0,10
	Intensa	8 (50,0)	8 (50,0)	
Necrose	Ausente	1 (33,3)	2 (66,7)	0,53
	Presente	18 (66,7)	9 (33,3)	

4.7 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA TOP2A EM RELAÇÃO AO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE

Não foi observada associação estatisticamente significativa entre o número de cópias do gene *TOP2A* e a expressão imunoistoquímica como mostrado na Tabela 9 e na Tabela 10.

Tabela 9 - Expressão da proteína Top2A de acordo com o número de cópias do gene *TOP2A*, variáveis nominais (Hospital A.C. Camargo, 1982 – 2010).

Variáveis	Expressão da proteína Top2A (%)	
	baixa	Alta
FISH normal	9 (47,4)	10 (52,6)
FISH amplificado/ganho genômico	3 (37,5)	5 (62,5)
FISH polissomia	0 (0)	2 (100)
FISH trissomia	0 (0)	1(100)

Tabela 10 - Expressão da proteína Top2A de acordo com o número de cópias do gene *TOP2A*, variável dicotomizada, (Hospital A.C. Camargo, 1982 – 2010).

Variáveis	Expressão da proteína Top2A (%)		Valor de p
	baixa	Alta	
FISH normal	9 (47,4)	10 (52,6)	
FISH alterado	3 (27,3)	8 (72,7)	0,44

4.8 ANÁLISE DA SOBREVIDA GLOBAL

O seguimento mediano das pacientes foi de 21 meses, variando de 1 a 238 meses.

Para análise de sobrevida global consideramos aqueles pacientes tratados no Hospital A.C. Camargo no período de 1982 a 2009, totalizando 27 pacientes.

A taxa de sobrevida global em 2 e 5 anos para pacientes portadoras de leiomiossarcoma uterino foi de 47,6% e 23%, respectivamente. A sobrevida mediana destas pacientes foi de 21,6 meses. Figura 6.

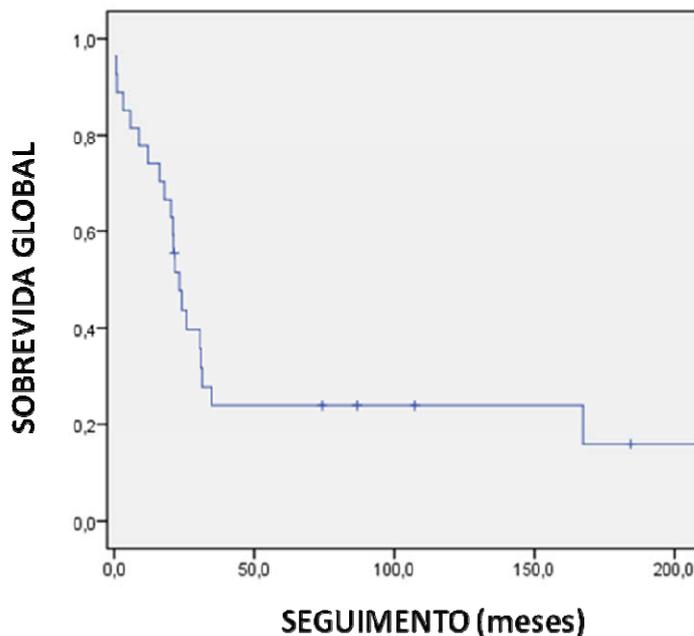


Figura 6 - Gráfico de sobrevida global (Hospital A.C. Camargo, 1982 – 2009).

Dentre as variáveis anatomoclínicas estudadas, apenas 2 tiveram impacto negativo em sobrevida global em análise univariada: estágio e tamanho da neoplasia.

As pacientes com leiomiossarcoma estágio I tiveram sobrevida mediana (SM) de 31,4 meses e em 2 anos (SG-2anos) de 76,9%. Quando agrupados os estádios II e III, foi encontrada SM de 21,0 meses. As pacientes com estágio IV apresentavam SM de 11,8 meses. Houve diferença significativa em sobrevida entre as pacientes com estágio I quando comparadas aos estádios II e III agrupados ($p=0,04$), assim como entre os estádios I e IV ($p=0,002$). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os estádio II e III agrupados em relação ao estágio IV ($p=0,44$). Figura 7.

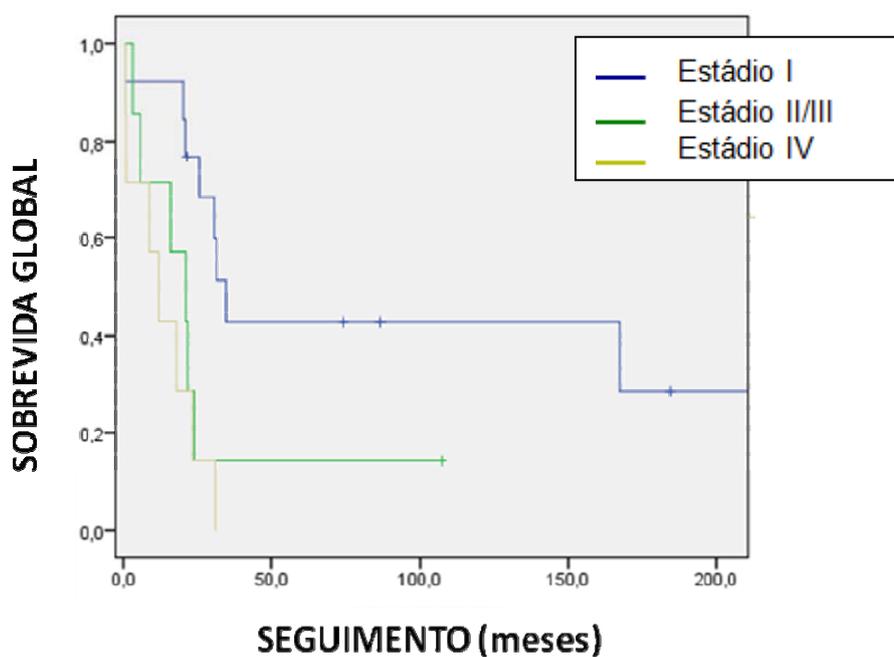


Figura 7 - Sobrevida global de acordo com estadiamento da neoplasia (Hospital A.C. Camargo, 1982 – 2009).

Quando agrupados os estádios II, III e IV (doença extra-uterina + metástase visceral), a sobrevida mediana foi de 15,9 meses e sobrevida global de 2 anos foi de 21,4%, com diferença estatisticamente significativa em relação ao estágio I ($p= 0,04$). Figura 8.

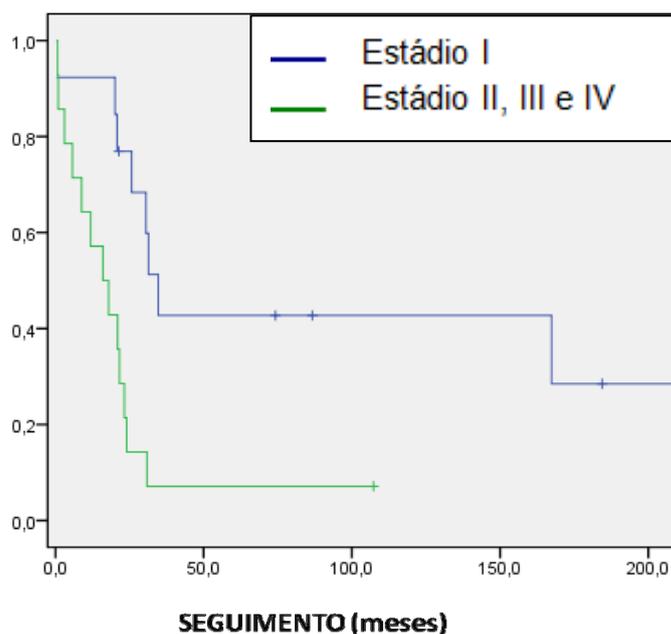


Figura 8 - Gráfico de sobrevida global entre pacientes com leiomiossarcoma estágio I e estágio II, III e IV, $p=0,04$ (Hospital A.C. Camargo, 1982 – 2009).

As taxas de sobrevida de acordo com o estágio da neoplasia estão apresentadas na Tabela 11.

Tabela 11 - Taxa de sobrevida mediana e global de acordo com estágio do leiomiossarcoma, (Hospital A.C. Camargo, 1982 – 2009).

Variáveis	Sobrevida global em 2	Sobrevida mediana	Valor de p
Estádio I	76,9	167,4	
Estádio II, III e IV	17,2	15,8	0,04

Aquelas pacientes que tinham leiomiossarcoma uterino com mais de 8,0cm em seu maior diâmetro tinham sobrevida mediana de 17,96 meses. Pacientes cujo tumor era de até 8,0cm tinham sobrevida mediana de 31,41 meses, com valos de p estatisticamente significativo ($p=0,015$). Figura 9.

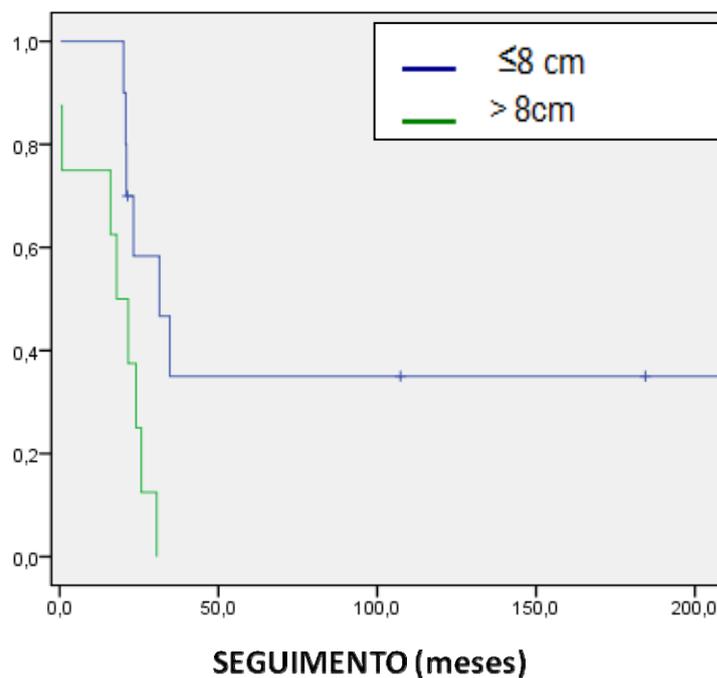


Figura 9 - Sobrevida global de acordo com o maior diâmetro da neoplasia, $p=0,015$ (Hospital A.C. Camargo, 1982 – 2009).

Não houve diferença na sobrevida global e mediana de acordo com índice mitótico, atipia celular, celularidade e idade. Não houve diferença significativa na sobrevida global para aquelas pacientes que realizaram tratamento com quimio ou radioterapia, mesmo entre aquelas que já tinham metástases ao diagnóstico inicial.

Em relação a expressão da proteína Top2A, a diferença na sobrevida global não foi estatisticamente significativa entre aqueles que apresentavam baixa e alta expressão ($p=0,67$). Figura 10.

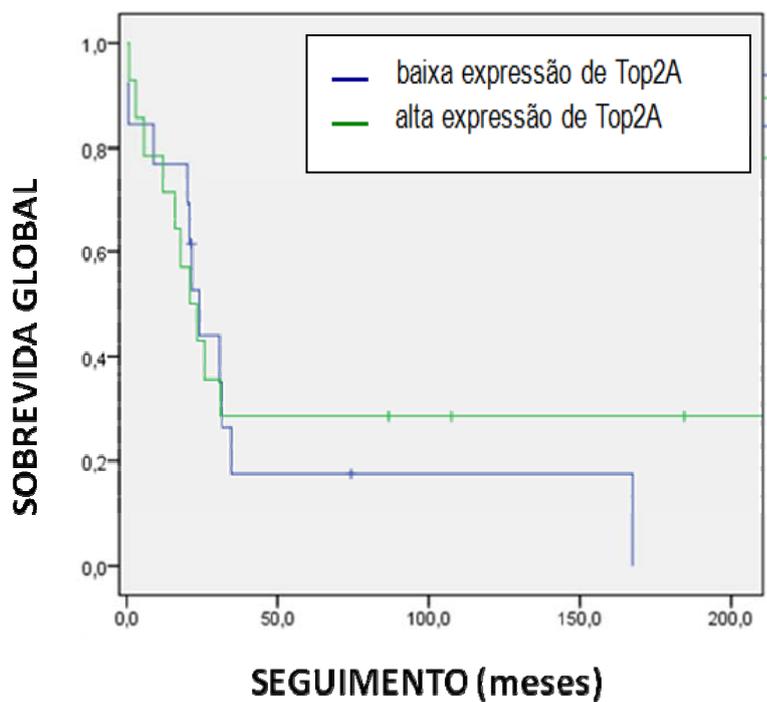


Figura 10 - Sobrevida global em relação a baixa e alta expressão da proteína Top2A, $p=0,67$ (Hospital A.C. Camargo, 1982 – 2009).

Em relação ao número de cópias do gene *TOP2A*, não houve diferença estatisticamente significativa na sobrevida mediana entre normal e alterado, $p=0,34$. Figura 11.

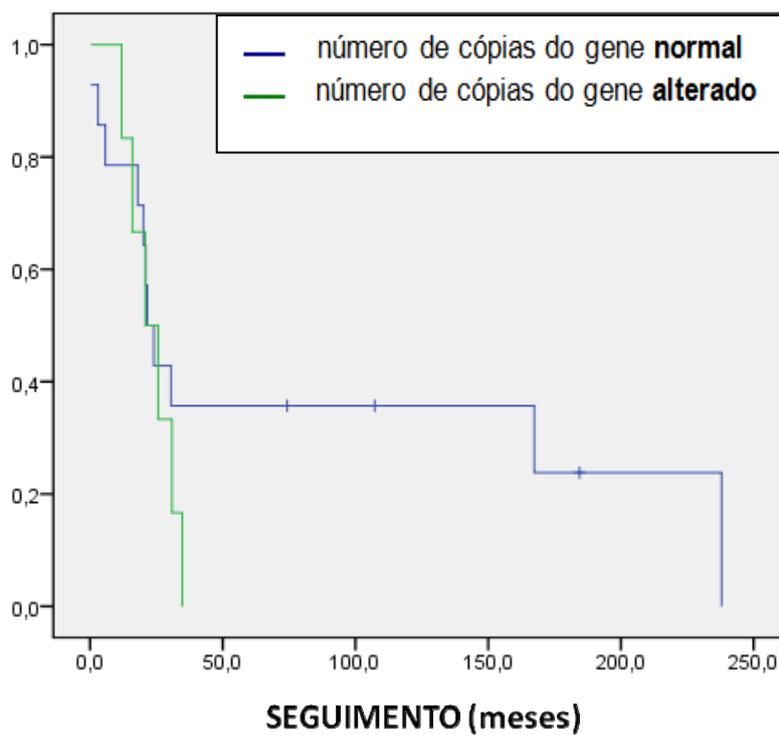


Figura 11 - Sobrevida global conforme o número de cópias do gene *TOP2A*, $p=0,34$ (Hospital A.C. Camargo, 1982 – 2009).

A relação da sobrevida mediana em relação a variáveis clinicopatológicas está resumida na Tabela 12.

Tabela 12 - Análise da sobrevida mediana em relação a variáveis clinicopatológicas (SM: Sobrevida mediana) (Hospital A.C. Camargo, 1982 – 2009).

Variável	Categoria	SM (meses)	p
Estádio do tumor	I	31,4	0,04
	II, III e IV	15,9	
Índice mitótico(M/10CGA)	≤20	21,6	0,78
	>20	24,0	
Atipia celular	Leve/moderada	21,61	0,45
	Intensa	25,69	
Celularidade	Baixa/moderada	30,8	0,54
	Alta	20,82	
Expressão de Top2A	Baixa	24,04	0,67
	Alta	21,02	
Número de cópia do gene <i>TOP2A</i>	Normal	21,6	0,34
	Alterado	20,8	
Maior diâmetro (cm)	≤8,0	31,4	0,015
	>8,0	17,9	
Idade (anos)	≤50	21,0	0,87
	>50	23,22	
Quimioterapia	Sem QT	25,6	0,46
	Com QT	21,0	
Radioterapia	Sem RT	21,6	0,46
	Com RT	24,0	
Período do tratamento	1982 - 1995	30,5	0,230
	1996 - 2009	21,0	
Local da cirurgia	HACC*	20,8	0,56
	outro	25,6	

* HACC= Hospital A.C. Camargo

4.9 ANÁLISE DA SOBREVIDA LIVRE DE DOENÇA

Foram excluídas nesta avaliação as pacientes com leiomiossarcoma com metástase visceral inicial, totalizando 18 tratados no período de 1982 a 2009. A taxa de sobrevida livre de doença em 2 e 5 anos foi de 32,4 e 17,3%, respectivamente. A sobrevida livre de doença mediana foi de 14,27 meses. Figura 12.

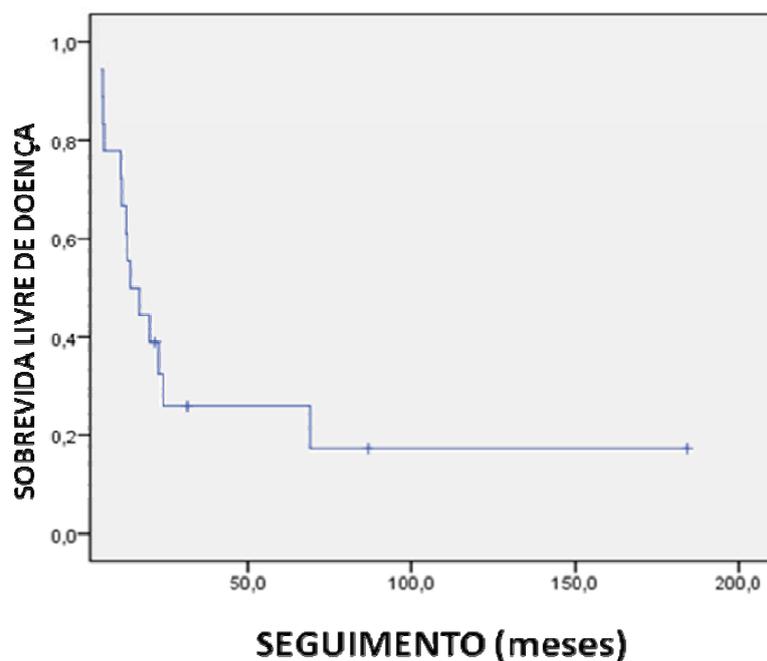


Figura 12 - Sobrevida livre de doença (Hospital A.C. Camargo, 1982 - 2009).

Um dos fatores relacionado com a sobrevida livre de doença mediana foi o estágio do tumor. As pacientes com leiomiossarcoma estágio I tiveram sobrevida livre de doença mediana de 21,4 meses e sobrevida livre de doença em 2 anos de 48,6%. No caso dos estádios II e III a sobrevida livre

de doença mediana foi de 11 meses e nenhuma paciente apresentou-se livre de doença em 2 anos ($p= 0,009$). Figura 13.

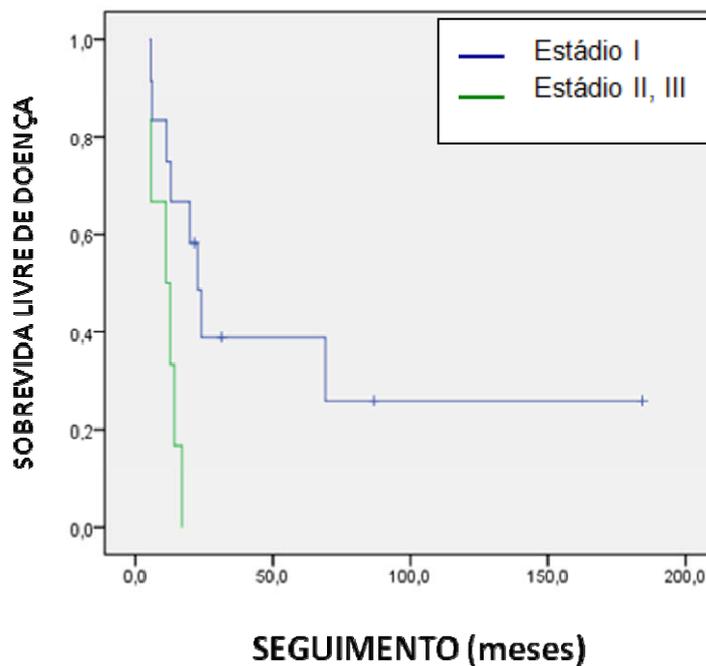


Figura 13 - Sobrevida livre de doença em relação ao estadiamento da neoplasia, $p= 0,009$ (Hospital A.C. Camargo, 1982 – 2009).

Em relação ao período em que a paciente realizou o tratamento de leiomiossarcoma uterino, aquelas tratadas no período entre 1982 a 1995 tiveram sobrevida livre de doença em 2 anos de 60% e mediana de 31,4 meses. Aquelas tratadas no período de 1996 a 2009 tiveram sobrevida livre de doença em 2 anos de 10% com mediana de 12,6 meses, sendo essa diferença estatisticamente significativa ($p=0,007$). Figura 14.

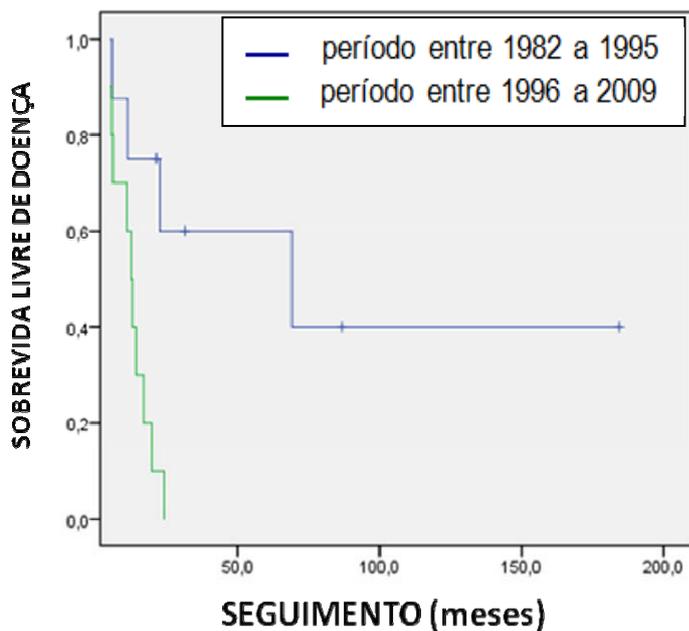


Figura 14 - Sobrevida livre de doença conforme período de tratamento da neoplasia, $p=0,007$ (Hospital A.C. Camargo, 1982 – 2009)

Não houve diferença significativa na sobrevida livre de doença para aquelas pacientes que realizaram tratamento com quimioterapia ou radioterapia adjuvantes. Figuras 15 e 16

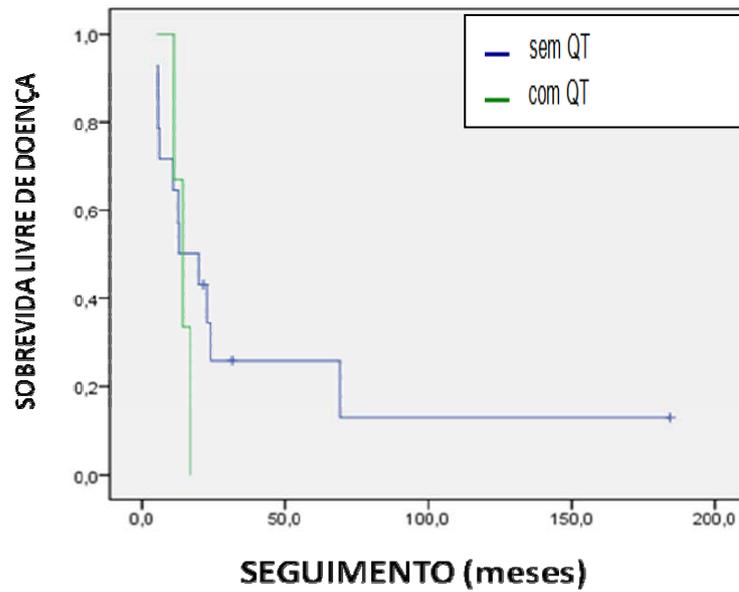


Figura 15 - Sobrevida livre de doença conforme realização da quimioterapia adjuvante, $p=0,42$ (Hospital A.C. Camargo, 1982 – 2009).

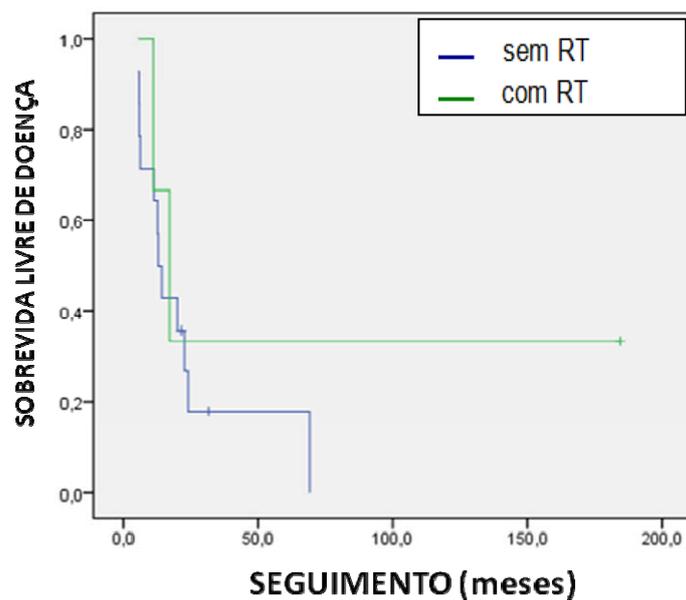


Figura 16 - Sobrevida livre de doença quanto a realização da radioterapia adjuvante, $p=0,46$ (Hospital A.C. Camargo, 1982 – 2009).

Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa em relação à sobrevida livre de doença para a expressão da proteína Top2A e para o número de cópias do gene *TOP2A* Figuras 17 e 18.

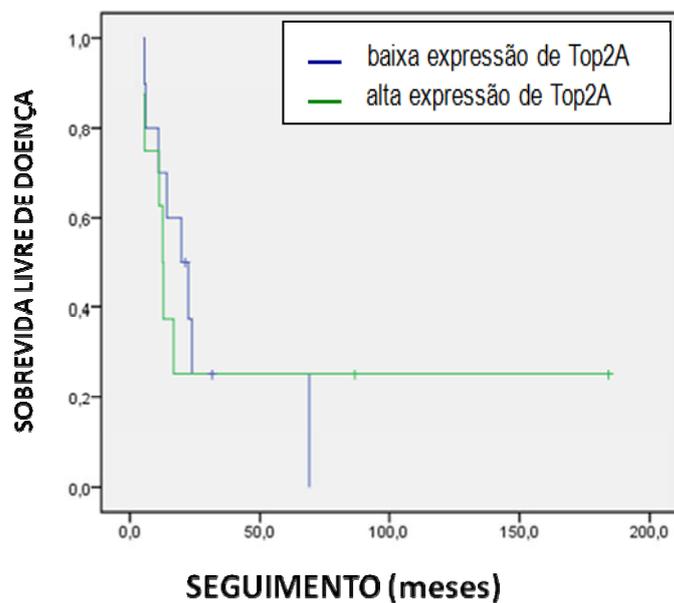


Figura 17 - Sobrevida livre de doença quanto a expressão da proteína Top2A, $p=0,84$ (Hospital A.C. Camargo, 1982 – 2009).

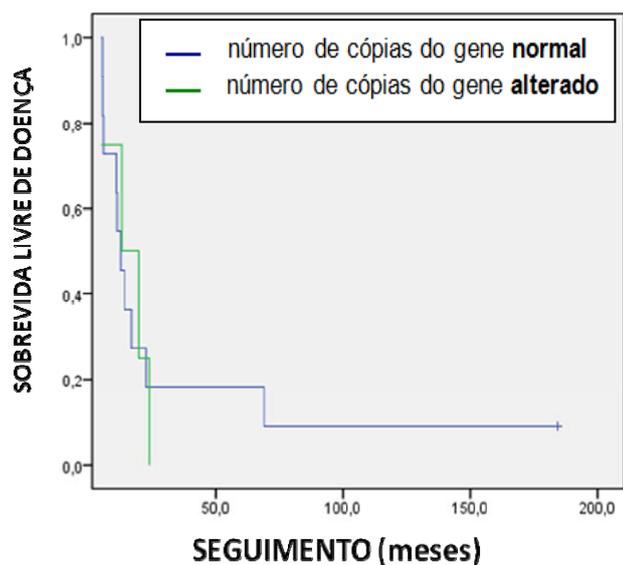


Figura 18 - Sobrevida livre de doença em relação ao número de cópias do gene *TOP2A*, $p=0,92$ (Hospital A.C. Camargo, 1982 – 2009).

Em relação ao local da cirurgia, pacientes que se submeteram a cirurgia no Hospital A.C. Camargo tiveram sobrevida livre de doença em 2 anos de 57,1%, com mediana de 19,9 meses. Aquelas que realizaram cirurgia em outro serviço, tiveram sobrevida livre de doença em 2 anos de 9,1%, com mediana de 12,9 meses, sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p=0,04$). Figura 19.

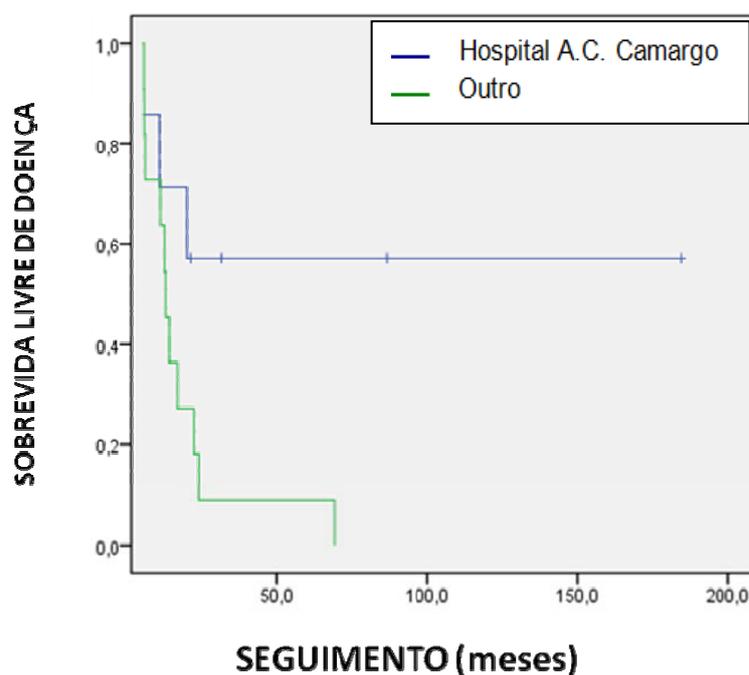


Figura 19 - Sobrevida livre de doença de acordo com local da cirurgia, $p=0,04$ (Hospital A.C. Camargo, 1982 – 2009).

Não houve diferença nas taxas de sobrevida livre de doença em relação a idade, tamanho do maior diâmetro do tumor, índice mitótico, atipia celular e celularidade.

A correlação entre sobrevida livre de doença e as características demográficas, clínicas e anatomopatológicas está exposta na Tabela 13.

Tabela 13 - Análise da sobrevida livre de doença mediana em relação a variáveis demográficas, clínicas e anatomopatológicas (SLM: Sobrevida livre de doença mediana) (Hospital A.C. Camargo, 1982 – 2009).

Variável	Categoria	SLD 2anos	SLM	p
Extensão do tumor (estádio)	I	48,6	21,4	0,009
	II, III e IV	0	11,0	
Índice mitótico (M/10CGA)	<=20	40,0	6,0	0,95
	>20	28,8	12,9	
Atipia celular	Leve/moderada	29,6	16,9	0,57
	Intensa	33,3	11,3	
Celularidade	Baixa/moderada	40,0	11,0	0,59
	Alta	28,8	12,9	
Expressão de Top2A	Baixa	37,5	19,9	0,84
	Alta	25,0	12,6	
Número de cópias do gene TOP2A	Normal	18,0	12,6	0,92
	Alterado	25,0	12,9	
Maior diâmetro (cm)	<=8,0	44,4	16,9	0,10
	>8,0	0	11,0	
Idade (anos)	<=50	33,3	16,9	0,10
	>50	29,6	11,0	
Radioterapia externa	Não	26,8	12,9	0,46
	Sim	33,3	11,0	
Quimioterapia	Não	34,3	12,9	0,42
	Sim	0	11,3	
Local da cirurgia	HACC	57,1	19,9	0,04
	outro	9,1	12,9	
Período do tratamento	1982 a 1995	60,0	31,4	0,007
	1996 a 2009	10,0	12,6	

4.10 ANÁLISE MULTIVARIADA

Na análise multivariada, tanto a expressão da proteína Top2A, quanto o número de cópias do gene *TOP2A* não mostraram-se como fator prognóstico, já que ambos não tiveram influência no risco de óbito ou recidiva (Tabelas 14 e 15).

Tabela 14 - Modelo multivariado de avaliação da expressão imunohistoquímica de Top2A como possível fator de risco para óbito e recidiva nos leiomiossarcomas uterinos (Hospital A.C. Camargo, 1982-2009).

Variável	Categoria	Óbito ^a				Recidiva ^b			
		n	HR	IC 95%	p	n	RR	IC 95%	p
Expressão Top2A	Alta	14	1,00	Referência		8	1,03	0,31-3,33	0,95
	Baixa	13	2,20	0,85-5,66	0,10	10	1,00	Referência	
Estádio	I	13	1,00	Referência		12	1,00	Referência	
	II, III e IV	14	5,82	1,74-19,44	0,004	6 ^c	2,48	0,58-10,59	0,22
Período tratamento	1982-	12	1,00	Referência		8	1,00	Referência	
	1996-	15	1,19	0,41-3,45	0,74	10	3,96	0,86-18,09	0,07

^a Número de óbitos considerados na análise: 22; ^b Número de recidivas consideradas na análise: 14; ^c Excluído estágio IV (HR: Hazard ratio; IC 95%: Intervalo de confiança 95%).

Tabela 15 - Modelo multivariado de avaliação do número de cópias do gene *TOP2A* como possível fator de risco para óbito e recidiva nos leiomiossarcomas uterinos (Hospital A.C. Camargo, 1982-2009).

Variável	Categoria	Óbito ^a				Recidiva ^b			
		n	HR	IC 95%	p	n	RR	IC 95%	p
Número de cópia do gene	Normal	14	1,00	Referência		11	1,00	Referência	
	Alterado	6	1,33	0,42-4,22	0,62	4	1,05	0,07-15,28	0,96
Estádio	I	13	1,00	Referência		12	1,00	Referência	
	II, III e IV	14	2,02	0,60-6,83	0,25	6 ^c	2,56	0,19-33,40	0,47
Período tratamento	1982-1995	12	1,00	Referência		8	1,00	Referência	
	1996-2009	15	2,06	0,33-12,77	0,43	10	2,09	0,14-30,51	0,58

^a Número de óbitos considerados na análise: 17; ^b Número de recidivas consideradas na análise: 14; ^c Excluído estágio IV (HR: Hazard ratio; IC 95%: Intervalo de confiança 95%).

5 DISCUSSÃO

Este estudo foi retrospectivo, uni institucional, tendo analisado todos casos de leiomiossarcoma uterino que continham material anatomopatológico da instituição no período de 1982 até 2012.

Ressaltamos como dificuldade do estudo a casuística. Apesar de termos grande número de pacientes tratados de leiomiossarcoma de útero em nosso serviço, neste estudo tivemos significativa redução da amostra devido a não localização de material anatomopatológico para análises. Mesmo estando em uma instituição altamente especializada em oncologia e de cunho de pesquisa, para o estudo de tumores raros como o leiomiossarcoma uterino, recomenda-se a pesquisa em nível multiinstitucional.

Nessa série, verificou-se que leiomiossarcomas são diagnosticados em pacientes com idade média de 52,9 anos e mediana de 50,2 anos. Em outros estudos, idade similar tem sido achado, variando de 47,5 a 52 anos (GIUNTOLI et al. 2003; PARK et al. 2008; KOIVISTO-KORANDER et al. 2008; BENITO et al. 2009; DURNALI et al. 2012).

A cirurgia tem sido o método de tratamento primário, com histerectomia total abdominal (HTA) e salpingo-ooforectomia bilateral (SOB) sendo o procedimento padrão, apesar de que SOB pode não ser necessário em pacientes na menacme, a menos que os ovários estejam comprometidos. Ainda permanece controversa a relação da SOB e a

sobrevida em pacientes com leiomiossarcoma, com vários estudos mostrando nenhuma melhora da sobrevida (GIUNTOLI et al. 2003; D'ANGELO e PRAT 2010).

A incidência de comprometimento linfático nas pacientes com leiomiossarcoma é raro, portanto a linfadenectomia não é recomendada. Em nosso estudo, como alguns outros na literatura, pequena parcela das pacientes foi submetida a este procedimento e em nenhuma delas havia metástase linfonodal (BOOKS et al. 2004; PARK et al. 2008; BENITO et al. 2009; DURNALI et al. 2012). No estudo de KOIVISTO-KORANDER et al. (2008), 38% realizaram linfadenectomia e/ou biópsia linfonodal e em nenhum havia comprometimento linfonodal. No estudo de KOKAWA et al. (2006), linfadenectomia foi realizada em 42% das pacientes, mas a análise de sobrevida não mostrou significância estatística. Nesses estudos, não foi evidenciado qualquer efeito significativo da linfadenectomia nas taxas de sobrevida (KOKAWA et al. 2006; PARK et al. 2008; KOIVISTO-KORANDER et al. 2008; BENITO et al. 2009; DURNALI et al. 2012).

Em relação à quimioterapia adjuvante, há poucos e conflitantes estudos disponíveis na literatura e a maioria deles trata-se de sarcomas de útero de forma generalizada. SLEIJFER et al. (2007) concluíram em seu estudo que não há lugar para terapia sistêmica adjuvante em leiomiossarcomas uterinos.

PARK et al. (2008) apresentam em seus estudos resultados que não mostram diferença significativa na sobrevida global e livre de doença entre pacientes com sarcoma de útero que receberam ou não tratamento

adjuvante, assim como também, quando comparado entre diferentes modalidades de tratamento e diferentes esquemas de quimioterapia.

No estudo de KOIVISTO-KORANDER et al. (2008), não houve melhora da sobrevida doença específica nas pacientes com sarcoma uterino tratadas com quimioterapia adjuvante.

No estudo de DURNALI et al. (2012), houve uma melhora na sobrevida global de pacientes com leiomiossarcoma que se submeteram a tratamento adjuvante com quimioterapia e radioterapia seqüencial.

PAUTIER et al. (2004) compararam em seus estudos retrospectivos, caso-controle, pacientes com leiomiossarcoma que tinham sido tratadas com doxorubicina, cisplatina e radiação pélvica adjuvante com aquelas que receberam apenas radioterapia adjuvante. Concluiu que o grupo radio-quimioterapia tinha taxa de recorrência menor comparada aquelas com radioterapia apenas.

Na análise retrospectiva de GIUNTOLI et al. (2003), pacientes que se submeteram a quimioterapia adjuvante tiveram sobrevida doença específica significativamente pior do que aquelas que não receberam quimioterapia.

Para doença metastática, terapia sistêmica paliativa está indicada. Doxorubicina tem sido um tratamento de primeira linha padrão para sarcoma do tecido mole avançado. OMURA et al. (1983) mostraram em seus estudo que pacientes com leiomiossarcoma uterino apresentavam taxa de resposta de 25% com uso de doxorubicina (58). SUTTON et al. (1996) mostraram que a combinação de doxorubicina com ifosfamida alcançava resposta objetiva em 30% das mulheres com sarcoma uterino. PARK et al.

(2008) mostraram que, para especificamente aquelas pacientes com leiomiossarcoma uterino avançado ao diagnóstico, quimioterapia aumentou a sobrevida global das pacientes.

Tratamento biomolecular e agentes alvos para leiomiossarcoma uterino estão sob investigação, porém ainda nenhum mostrou taxa de resposta significativa (HENSLEY 2011).

No presente estudo, não houve diferença na sobrevida global e livre de doença de pacientes submetidos a tratamento adjuvante, independente do estadiamento, da modalidade de tratamento adjuvante e esquema de quimioterapia. Das 37 pacientes analisadas, apenas 6 receberam tratamento quimioterápico com antraciclinas, sem melhora da sobrevida em relação àquelas que receberam outros esquemas de quimioterapia.

Não tem havido consistência entre vários estudos em relação à sobrevida e tratamento adjuvante. Até o momento não há estudo prospectivo e randomizado que analisou o impacto da quimioterapia adjuvante na sobrevida para doença estágio I. Porém, radioterapia pélvica tem sido amplamente empregada como tratamento adjuvante de sarcomas uterinos, devido alguns autores acreditarem que esta terapia pode melhorar o controle local. Como a maioria das pacientes apresenta recidiva à distância, a radioterapia pélvica não mostra impacto na sobrevida global.

Neste estudo, a radioterapia adjuvante não melhorou a sobrevida global das pacientes com leiomiossarcoma uterino, nem a sobrevida livre de doença.

Há na literatura um único estudo fase III que comparou radioterapia adjuvante versus seguimento para sarcomas uterinos estádios I e II, e este não encontrou melhora na sobrevida nem no controle local da doença no subgrupo de pacientes com leiomiossarcoma (REED et al. 2003). No estudo de GIUNTOLI et al. (2003), a radioterapia adjuvante também não mostrou diferença na sobrevida livre de doença em relação aquelas que não fizeram radioterapia. É importante ressaltar que a radioterapia pode ainda ser usada no tratamento paliativo de lesões à distância, tais como metástases de cérebro e ossos.

A taxa de recorrência para leiomiossarcoma uterino tem sido relatada na literatura entre 53 a 71% (KOIVISTO-KORANDER et al. 2008; BENITO et al. 2009; D'ANGELO e PRAT 2010; DURNALI et al. 2012). Neste estudo, a taxa de recidiva foi de 57,1%, sendo os sítios mais comuns: recidiva local de 42,1%, recidiva a distância (pulmonar e hepática) de 47,4%. Em um estudo prévio sobre leiomiossarcoma uterino, os locais de recorrência foram: recorrência pélvica (14-30%), recorrência a distância (33-44%) e pélvica e a distância (25-53%) (DURNALI et al. 2012).

Em nosso estudo e também na literatura, o prognóstico de leiomiossarcoma uterino não tem mudado nas últimas décadas e permanece ruim. Geralmente apresentam comportamento clínico agressivo, com forte tendência a recorrência local e, ainda mais, a disseminação à distância. A sobrevida global em 5 anos em outros estudos foi de 27 a 57% (BROOKS et al. 2004; KOIVISTO-KORANDER et al. 2008; DURNALI et al. 2012). Na nossa análise a sobrevida foi de apenas 47% dos pacientes vivos em 2

anos. Atribuímos a pior sobrevida global de nossos pacientes, por sermos hospital referenciado em oncologia, vindo ao nosso serviço mais casos avançados e recorrentes. Mais da metade de nossos pacientes já tinham doença avançada.

Não há consenso nos fatores prognósticos de leiomiossarcoma uterino. Estes fatores são importantes porque a partir deles, podemos individualizar e traçar o melhor esquema terapêutico para o paciente, evitando super-tratar um paciente com baixo risco de recorrência e deixar de ser agressivo para aqueles de alto risco.

Alguns estudos mostram que a idade pode ser significativa e que pacientes mais jovens teriam sobrevida livre de doença e sobrevida global significativamente mais longa (KOIVISTO-KORANDER et al. 2008; DURNALI et al. 2012). Já outros estudos não encontraram diferença significativa em relação a idade, nem na sobrevida global nem da livre de doença (GIUNTOLI et al. 2003; PARK et al. 2008). Assim como o nosso, a idade não mostrou diferença significativa na sobrevida.

Como relatado em estudos epidemiológicos, a maioria dos casos é diagnosticada em estádios iniciais, estágio I e II perfazendo mais de 50% dos casos (PARK et al. 2008; KOIVISTO-KORANDER et al. 2008; DURNALI et al. 2012). O presente estudo sugere, assim como outros, que o estadiamento é variável prognóstica importante para leiomiossarcomas uterinos (PARK et al. 2008; KOIVISTO-KORANDER et al. 2008; BENITO et al. 2009; D'ANGELO e PRAT 2010).

Neste estudo pode-se observar que as pacientes com leiomiossarcoma uterino estágio II e III tiveram sobrevida tão ruim quanto àquelas com estágio IV. Assim, a disseminação da neoplasia além do útero já acarreta prognóstico ruim, independente se esta disseminação for local ou à distância.

Utilizamos o valor 8cm para a dicotomia do maior diâmetro da neoplasia para as análises da expressão da proteína, do número de cópias do gene e das sobrevidas, porque este foi a mediana encontrada e porque houve apenas 3 casos com maior diâmetro do tumor menor do que 5 cm, que seria o valor utilizado na divisão do estágio I da FIGO para leiomiossarcomas uterinos.

No estudo de GIUNTOLI et al. (2003) e KOIVISTO-KORANDER et al. (2008), tumores menores do que 5cm apresentavam sobrevida doença específica significativamente melhor. Nos trabalhos de DURNALI et al. (2012) e PARK et al. (2008), o tamanho do tumor não teve qualquer impacto na sobrevida global das pacientes. Nossos resultados mostram que mulheres com leiomiossarcoma maior do que 8,0 cm tiveram impacto negativo na sobrevida global.

Pacientes com radioterapia pélvica prévia, a qual tem sido relatada como fator de risco para leiomiossarcoma de útero (BROOKS et al. 2004; D'ANGELO e PRAT 2010), não foram observados no presente estudo.

A diferença de sobrevida livre de doença em relação ao período de tratamento inicial e ao local da cirurgia justifica-se pela maior proporção de

casos com doença extra-uterina (estádios II e III) operados tanto inicialmente fora do Hospital A.C. Camargo, quanto no período de 1996 a 2009.

Quanto ao índice mitótico, este não apresentou diferença estatística em relação à sobrevida em nosso estudo. Em um estudo que analisou leiomiossarcoma uterino em estágio precoce, o índice mitótico também não mostrou correlação estatisticamente significativa com sobrevida (WANG et al. 2011). Em outros estudos mais antigos, que também analisaram leiomiossarcomas em estágio precoce, o índice mitótico foi uma variável prognóstica relacionada à sobrevida global (MAJOR et al. 1993; GADDUCCI et al. 1995; ABELER et al. 2009).

DURNALI et al. (2012) evidenciaram que grau, tamanho do tumor, profundidade da invasão miometrial, invasão angiolinfática e perineural tinham efeito significativo no prognóstico das pacientes. Em nosso estudo, apenas o tamanho do tumor e o estágio da neoplásica tiveram impacto significativo no prognóstico da paciente.

Do ponto de vista biológico, ainda são poucos os estudos que mostram alguma característica molecular relacionada ao prognóstico. Agrupá-los em subtipos de acordo com características moleculares, permitiria-nos correlacionar com características do comportamento tumoral e resposta a tratamento oncológico.

BLOM et al. (1998) mostraram que o aumento da expressão de p53 em leiomiossarcomas uterinos estádios I e II esteve significativamente associado a prognóstico adverso.

No estudo de GIUNTOLI et al. (2003), mostrou-se que grau histológico era fator prognóstico independente, porém, a classificação histológica de leiomiossarcoma ainda é controversa e não há sistema de graduação globalmente aceito.

Neste estudo, procuramos estudar a expressão e o número de cópias do gene TOP2A em uma série de leiomiossarcomas uterinos.

Nosso estudo mostra que a expressão aumentada desta proteína associa-se ao maior índice mitótico e a estágio mais avançado da neoplasia, talvez mostrando-se como um marcador de agressividade. Porém, na análise multivariada, nem a expressão da proteína Top2A, nem o número de cópias do gene mostraram-se fatores de risco para óbito ou de recorrência.

Em um estudo prévio de nossa instituição, os pacientes com tumores mesenquimais que superexpressavam o gene *TOP2A*, apresentavam maior potencial metastático (CUNHA et al. 2010). Em um outro estudo também de nossa instituição, em pacientes com sarcoma de tecidos moles, a expressão da proteína Top2A mostrava-se um preditor independente de prognóstico desfavorável (CUNHA et al. 2012).

CHEVILLE et al. (2008) mostram em suas pesquisa sobre adenocarcinoma de próstata, que pacientes com alta expressão da proteína Top2A têm prognóstico pior, com grande risco de progressão sistêmica e sugere que a alteração do *TOP2A* pode refletir um componente de instabilidade genética com envolvimento de mecanismos de reparo de DNA.

SONG et al. (2012) estudaram proteínas de reparo e replicação do DNA em melanoma e concluíram que alta expressão da proteína Top2A e

XRCC5 (Ku80), requerido para reparo da quebra da dupla fita, foram associados com sobrevida significativamente pior.

SHVERO et al. (2008) estudaram a relação da expressão Top2A e carcinoma de laringe e sugeriu que a expressão da proteína estava relacionada com alto grau tumoral, estágio mais avançado e sobrevida menor.

O potencial papel terapêutico da proteína Top2A expande os tipos de terapias adjuvantes disponíveis. *TOP2A* é um alvo quimioterápico de antraciclinas, incluindo doxorubicina, epirubicina, etoposide e mitoxantrone. Além disso, CHEVILLE et al. (2008) referem em seu trabalho que estudos *in vitro* têm demonstrado que a sensibilidade das células tumorais a antraciclinas é dependente do nível de expressão da proteína Top2A.

Além de seu valor como um marcador de prognóstico, atividade do *TOP2A* também poderia aumentar a sensibilidade do tumor à quimioterapia citotóxica e, como tal, ser um preditor de resposta à droga. O papel do *TOP2* em resposta aos agentes antracíclicos tem sido mais extensivamente estudado em pacientes com câncer de mama metastático, e sugere-se que a associação de *HER2* com resposta a antraciclina pode estar relacionada com a amplificação do gene e superexpressão da proteína Top2A (DEPOWSKI et al. 2000; KARNES et al. 2010; O'MALLEY et al. 2011).

Em hepatocarcinomas, WONG et al. (2009) têm mostrado que além da expressão de Top2A correlacionar-se com grau histológico avançado, invasão microvascular e idade de diagnóstico precoce, correlacionou-se também com taxa de resposta a quimioterapia. Porém a associação foi

inversa ao comumente visto na literatura. Pacientes que apresentavam alta expressão da proteína Top2A tinham maior taxa de resistência a quimioterapia. Também evidenciou que aqueles que tinham maior expressão apresentavam sobrevida menor.

Em um estudo com pacientes com sarcomas do tecido mole avançado, não foi achado correlação significativa entre expressão da proteína Top2A e anormalidades no número de cópias do gene TOP2A (RUIZ-SOTO et al. 2008). Assim como em sarcomas de tecido mole, em leiomiossarcomas de útero o número de cópias do gene não é o único evento biológico que influencia a expressão da proteína.

No atual estudo, não foi achado correlação significativa entre número de cópias do gene *TOP2A* e níveis de proteína Top2A. Estes achados reforçam informações de estudos de adenocarcinoma de mama que sugerem que a expressão da proteína Top2A não é regulada em nível do número de cópias do gene, mas sim controlada no nível pós-transcricional ou pós-traducionais (MO e BECK 1997; CAMPIGLIO et al. 2003; DURBECQ et al. 2004; BRASE et al. 2010; O'MALLEY et al. 2011).

Em leiomiossarcoma uterino, temos que a expressão proteica de Top2A está aumentada em 56% das vezes, o que o insere no complexo da tumorigênese. Porém, ainda não está claro se está alteração é causa ou consequência.

A expressão aumentada da proteína pode causar número demasiado de quebras no DNA e, associada a falha nos genes de reparo do DNA, levar a anormalidades genômicas complexas e ampla desregulação gênica. Para

maior elucidação, pode-se pesquisar genes de reparo em pacientes com leiomiossarcomas uterinos e sua associação com o gene *TOP2A* e sua proteína.

De outro modo, a expressão aumentada da proteína Top2A pode resultar de hiperatividade do gene *TOP2A* ao localizar-se próximo a outro gene/promotor hiperativo após rearranjos cromossômicos gerados pela instabilidade genética, que é característica desta neoplasia. Neste ponto, estudos adicionais de genes localizados no braço longo do cromossomo 17 seriam esclarecedores.

Assim, temos neste estudo que leiomiossarcoma uterino é uma neoplasia mesenquimal com prognóstico ruim, sendo que sua sobrevida mediana é menor do que 2 anos. O estadiamento avançado e o maior tamanho do tumor foram os únicos fatores relacionados à pior sobrevida. Fazendo a análise da expressão da proteína Top2A com índice mitótico e estágio do tumor, observamos que a expressão aumentada da proteína mostrou-se como marcador de agressividade. Porém, ao analisar a expressão protéica de Top2A e o número de cópias do gene *TOP2A*, observamos que nenhum deles altera a sobrevida. Apesar da presença de alterações no número de cópias de gene *TOP2A* e da presença de diferentes expressões da proteína Top2A, nos leiomiossarcomas uterinos não houve diferença de sobrevida entre aquelas pacientes que receberam ou não tratamento quimioterápico. Outros eventos além do número de cópias do gene devem influenciar a expressão da proteína Top2A.

6 CONCLUSÕES

- 1) A alta expressão imunoistoquímica da proteína Top2A está presente nos leiomiossarcomas uterinos em 56,8% dos casos.
- 2) O número de cópias do gene *TOP2A* está alterado em 36,7% dos leiomiossarcomas uterinos, sendo a amplificação do gene a alteração mais comum (72,7%).
- 3) O número de cópias do gene *TOP2A* não se correlacionou com a expressão imunoistoquímica da proteína Top2A.
- 4) A amplificação do gene *TOP2A* não se correlacionou com características clinico-patológicas de pacientes com leiomiossarcomas uterinos. A alta expressão imunoistoquímica da proteína Top2A correlacionou-se com maior índice mitótico e com estadiamento neoplásico mais avançado.
- 5) A expressão protéica e o número de cópias do gene *TOP2A* não tiveram impacto no risco de recidiva ou óbito.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

Akhan SE, Yavuz E, Tecer A, et al. The expression of Ki-67, p53, estrogen and progesterone receptors affecting survival in uterine leiomyosarcomas. A clinicopathologic study. **Gynecol Oncol** 2005; 99:36-42.

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

Arriola E, Rodriguez-Pinilla SM, Lambros MBK, et al. Topoisomerase II alpha amplification may predict benefit from adjuvant anthracyclines in HER2 positive early breast cancer. **Breast Cancer Res Treat** 2007, 106:181-9.

Atkins K, Bell S, Kempson M, et al. Myxoid smooth muscle tumors of the uterus. **Modern Pathol** 2001; 132A:14.

Atkins KA, Arronte N, Darus CJ, Rice LW. The use of p16 in enhancing the histologic classification of uterine smooth muscle tumors. **Am J Surg Pathol** 2008; 32: 98-102.

Bell SW, Kempson RL, Hendrickson MR. Problematic uterine smooth muscle neoplasms. A clinicopathologic study of 213 cases. **Am J Surg Pathol** 1994; 18:535-58.

Benito V, Lubrano A, Arencibia O, et al. Clinicopathologic analysis of uterine sarcomas from a single institution in the Canary Islands. **Int J Gynaecol Obstet** 2009; 107:44-9.

Berger JM, Gamblin SJ, Harrison SC, Wang JC. Structure and mechanism of DNA topoisomerase II. **Nature** 1996; 379:225-32.

Blay JY, Le CA. Adjuvant chemotherapy in localized soft tissue sarcomas: still not proven. **Oncologist** 2009; 14:1013-20.

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

Brase JC, Schmidt M, Fischbach T et al. Erb B2 and TOP2A in breast cancer: a comprehensive analysis of gene amplification, RNA levels and protein expression and their influence on prognosis and prediction. **Clin Cancer Res** 2010; 16:2391-401.

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

Campiglio M, Somenzi G, Olgiati C, et al. Role of proliferation in HER2 status predicted response to doxorubicin. **Int J Cancer** 2003; 105:568-73.

Carpenter AJ, Porter AC. Construction, characterization, and complementation of a conditional- lethal DNA topoisomerase IIalpha mutant human cell line. **Mol Biol Cell** 2004; 15:5700-11.

Chen L, Yang B. Immunohistochemical analysis of p16, p53, and Ki-67 expression in uterine smooth muscle tumors. **Int J Gynecol Pathol** 2008; 27:326-32.

Cheville JC, Karnes RJ, Therneau TM, et al. Gene panel model predictive of outcome in men at high-risk of systemic progression and death from prostate cancer after radical retropubic prostatectomy. **J Clin Oncol** 2008; 26:3930-6.

Christensen MO, Larsen MK, Barthelmes HU, et al. Dynamics of human DNA topoisomerases IIalpha and IIbeta in living cells. **J Cell Biol** 2002; 157:31-44.

Cox DR. Regression models and life tables. **J R Stat Soc Br** 1972; 34:187-220.

Cunha IW, Carvalho KC, Martins WK, et al. Identification of genes associated with local aggressiveness and metastatic behavior in soft tissue tumors. **Transl Oncol** 2010; 3:23-32.

Cunha IW, De Brot L, Carvalho KC, et al. Prognostication of soft tissue sarcomas based on chromosome 17q gene and protein status: evaluation of TOP2A, HER-2/neu, and survivin. **Ann Surg Oncol** 2012; 19:1790-9.

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

Depowski PL, Rosenthal SI, Brien TP, Stylos S, Johnson RL, Ross JS. Topoisomerase IIalpha expression in breast cancer: correlation with outcome variables. **Mod Pathol** 2000; 13:542-7.

Drake FH, Hofmann GA, Bartus HF, Mattern MR, Crooke ST, Mirabelli CK. Biochemical and pharmacological properties of p170 and p180 forms of topoisomerase II. **Biochemistry** 1989; 28:8154-60.

Durbecq V, Paesmans M, Cardoso F et al. Topoisomerase-II alpha expression as a predictive marker in a population of advanced breast cancer patients randomly treated either with single-agent doxorubicin or single-agent docetaxel. **Mol Cancer Ther** 2004; 3:1207-14.

Durnali A, Tokluoğlu S, Özdemir N, et al. Prognostic factors and treatment outcomes in 93 patients with uterine sarcoma from 4 centers in Turkey. **Asian Pac J Cancer Prev** 2012; 13:1935-41.

Felix CA. Secondary leukemias induced by topoisomerase targeted drugs. **Biochim BioPhys Acta** 1998; 1400:233-55.

Gadducci A, Fabrini MG, Bonuccelli A, et al. Analysis of treatment failures in patients with early-stage uterine leiomyosarcoma. **Anticancer Res** 1995; 15:485-8.

Gadducci A. Prognostic factors in uterine sarcoma. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol** 2011; 25:783-95.

Giuntoli RL 2nd, Metzinger DS, DiMarco CS, et al. Retrospective review of 208 patients with leiomyosarcoma of the uterus: prognostic indicators, surgical management, and adjuvant therapy. **Gynecol Oncol** 2003; 89:460-9.

Hardman MP, Roman JJ, Burnett AF, Santin AD. Metastatic uterine leiomyosarcoma regression using an aromatase inhibitor. **Obstet Gynecol** 2007; 110:518-20.

Hensley ML, Blessing JA, Mannel R, Rose PG. Fixed-dose rate gemcitabine plus docetaxel as first-line therapy for metastatic uterine leiomyosarcoma: a Gynecologic Oncology Group phase II trial. **Gynecol Oncol** 2008; 109:329-34.

Hensley ML, Ishill N, Soslow R, et al. Adjuvant gemcitabine plus docetaxel for completely resected stages I-IV high grade uterine leiomyosarcoma: results of a prospective study. **Gynecol Oncol** 2009; 112:563-7.

Hensley ML. Role of chemotherapy and biomolecular therapy in the treatment of uterine sarcomas. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol** 2011; 25:773-82.

Ip PP, Cheung AN. Pathology of uterine leiomyosarcomas and smooth muscle tumours of uncertain malignant potential. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol** 2011; 25:691-704.

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

Karnes RJ, Cheville JC, Ida CM, et al. The ability of biomarkers to predict systemic progression in men with high-risk prostate cancer treated surgically is dependent on *ERG* status. **Cancer Res** 2010; 70:8994-8.

Knoop AS, Knudsen H, Balslev E, et al. Retrospective analysis of topoisomerase IIa amplifications and deletions as predictive markers in primary breast cancer patients randomly assigned to cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil or cyclophosphamide, epirubicin, and fluorouracil: Danish Breast Cancer Cooperative Group. **J Clin Oncol** 2005; 23:7483-90.

Koivisto-Korander R, Butzow R, Koivisto AM, Leminen A. Clinical outcome and prognostic factors in 100 cases of uterine sarcoma: experience in Helsinki University Central Hospital 1990–2001. **Gynecol Oncol** 2008; 111:74-81.

Kokawa K, Nishiyama K, Ikeuchi M, et al. Clinical outcomes of uterine sarcomas: results from 14 years worth of experience in the Kinki district in Japan (1990–2003). **Int J Gynecol Cancer** 2006; 16:1358-63.

Kosari F, Munz JM, Savci-Heijink CD, et al. Identification of prognostic biomarkers for prostate cancer. **Clin Cancer Res** 2008; 14:1734-43.

Leath CA 3rd, Straughn JM Jr, Conner MG, et al. Immunohistochemical evaluation of the c-kit proto-oncogene in sarcomas of the uterus: a case series. **J Reprod Med** 2004; 49:71-5.

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

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

McPherson JP, Goldenberg GJ. Induction of apoptosis by deregulated expression of DNA topoisomerase II alpha. **Cancer Res** 1998; 58:4519-24.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa/2012 Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2011.

Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. **Pharmacol Rev** 2004; 56:185-229.

Mo YY, Beck WT. Heterogeneous expression of DNA topoisomerase II alpha isoforms in tumor cell lines. **Oncol Res** 1997; 9:193-204.

O'Malley FPO, Chia S, Tu D, et al. Topoisomerase II alpha protein and responsiveness of breast cancer to adjuvant chemotherapy with CEF compared to CMF in the NCIC CTG randomized MA.5 adjuvant trial. **Breast Cancer Res Treat** 2011; 128:401-9.

Omura GA, Major FJ, Blessing JA, et al. A randomized study of adriamycin with and without dimethyl triazenoimidazole carboxamide in advanced uterine sarcomas. **Cancer** 1983; 52:626-32.

Orlando L, Del Curto B, Gandini S, et al. Topoisomerase IIa gene status and prediction of pathological complete remission after anthracycline-based neoadjuvant chemotherapy in endocrine non-responsive Her2/neu-positive breast cancer. **Breast** 2008; 17:506-11.

Park JY, Kim DY, Suh DS, et al. Prognostic factors and treatment outcomes of patients with uterine sarcoma: analysis of 127 patients at a single institution, 1989-2007. **J Cancer Res Clin Oncol** 2008; 134:1277-87.

Pautier P, Rey A, Haie-Meder C, et al. Adjuvant chemotherapy with cisplatin, ifosfamide, and doxorubicin followed by radiotherapy in localized uterine sarcomas: results of a case-control study with radiotherapy alone. **Int J Gynecol Cancer** 2004; 14:1112-7.

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

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

Reed NS, Mangioni C, Malmstrom H, et al. Phase III randomised study to evaluate the role of adjuvant pelvic radiotherapy in the treatment of uterine sarcomas stages I and II: an European Organisation for Research and Treatment of Cancer Gynaecological Cancer Group study (protocol 55874). **Eur J Cancer** 2008; 44:808-18.

Romero A, Caldés T, Díaz-Rubio E, Martín M. Topoisomerase 2 alpha: a real predictor of anthracycline efficacy?. **Clin Transl Oncol** 2012; 14:163-8.

Rudolph P, Kellner U, Chassevent A, et al. Prognostic relevance of a novel proliferation marker, Ki-S11, for soft tissue sarcoma. A multivariate study. **Am J Pathol** 1997; 150:1997-2007.

Ruiz-Soto R, Auger N, Terrier P, et al. Topoisomerase II-alpha (Top2A) and chromosome 17 abnormalities in locally advanced soft tissue sarcomas (LASTS) [abstract]. **J Clin Oncol** 2008; 26:(15 suppl):A10584. [Presented at 2008 ASCO 44th Annual Meeting; 2008 May 30 - June 3; Chicago, Illinois].

Sandri MI, Hochhauser D, Ayton P, et al. Differential expression of the topoisomerase II alpha and beta genes in human breast cancers. **Br J Cancer** 1996; 73:1518-24.

Scandinavian Breast Group Trial 9401, Tanner M, Isola J, et al. Topoisomerase IIalpha gene amplification predicts favorable treatment response to tailored and dose-escalated anthracycline-based adjuvant chemotherapy in HER-2/neu-amplified breast cancer: Scandinavian Breast Group Trial 9401. **J Clin Oncol** 2006; 24:2428-36.

Schindlbeck C, Mayr D, Olivier C, et al. Topoisomerase II *alfa* expression rather than gene amplification predicts responsiveness of adjuvant anthracycline-based chemotherapy in women with primary breast cancer. **J Cancer Res Clin Oncol** 2010; 136:1029-37.

Shvero J, Koren R, Shvili I, Yaniv E, Sadov R, Hadar T. Expression of human DNA topoisomerase II- α in squamous cell carcinoma of the larynx and its correlation with clinicopathologic variables. **Am J Clin Pathol** 2008; 130:934-9.

Sleijfer S, Seynaeve C, Verweij J. Gynaecological sarcomas. **Curr Opin Oncol** 2007; 19:492-6.

Solomon LA, Schimp VL, Ali-Fehmi R, Diamond MP, Munkarah AR. Clinical update of smooth muscle tumors of the uterus. **J Minim Invasive Gynecol** 2005; 12:401-8.

Song L, Robson T, Doig T, et al. DNA repair and replication proteins as prognostic markers in melanoma. **Histopathology** 2012 Sep 28. [Epub ahead of print].

Sutton G, Blessing JA, Malfetano JH. Ifosfamide and doxorubicin in the treatment of advanced leiomyosarcomas of the uterus: a Gynecologic Oncology Group study. **Gynecol Oncol** 1996; 62:226-9.

Sutton G, Kavanagh J, Wolfson A, Tornos C. Corpus: mesenchymal tumors. In: Hoskins WJ, Perez CA, Young RC, Barakat RR, Markman M, Randall ME, editors. **Principles and practice of gynecologic oncology**. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004. p.873-94.

Tavassoli FA, Devilee P. **Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs**. Lyon: IARC Press, 2003. (IARC WHO Classification of Tumours, No 4).

Thway K. Pathology of soft tissue sarcomas. **Clin Oncol (R Coll Radiol)** 2009; 21:695-705.

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

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

Valentin L. Imaging in gynecology. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol** 2006; 20:881-906.

Wang JC. DNA topoisomerases. **Annu Rev Biochem** 1996; 65:635-92.

Wang JC. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2002; 3:430-40.

Wang L, Felix JC, Lee JL, et al. The proto-oncogene c-kit is expressed in leiomyosarcomas of the uterus. **Gynecol Oncol** 2003; 90:402-6.

Wang WL, Soslow R, Hensley M, et al. Histopathologic prognostic factors in stage I leiomyosarcoma of the uterus: a detailed analysis of 27 cases. **Am J Surg Pathol** 2011; 35:522-9.

Wong N, Yeo W, Wong WL, et al. TOP2A overexpression in hepatocellular carcinoma correlates with early age onset, shorter patients survival and chemoresistance. **Int J Cancer** 2009; 124:644-52.

Zhai YL, Kobayashi Y, Mori A, et al. Expression of steroid receptors, Ki-67, and p53 in uterine leiomyosarcomas. **Int J Gynecol Pathol** 1999; 18:20-8.

Anexo 1 - Protocolo sarcoma uterino

PROTOCOLO SARCOMA UTERINO

PACIENTE

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

SINTOMAS/EXAMES

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

TRATAMENTO

15. LOCAL CIRURGIA INICIAL- (0) ACC (1) fora|_____|1ª cir
16. TIPO DE TRATAMENTO INICIAL (quando não HTA): (0) não (1) miomectomia via aberta (2) miomectomia via laparoscopia (3) ressecção pólipos (3) outro – qual?|_____|tipo_tratapré
17. DATA DO TRATAMENTO INICIAL (quando não HTA)._/___/___
18. 1ª CIRURGIA (qdo HTA) - DATA--....._/___/___ 1ª cir_data
19. TIPO DE CIRURGIA— (1) HTA (2) HTA+SOB (3) HTA+SOB+linf pelvica (4) HTA+SOB+linf pélvica+retrop (5) exenteração anterior (6) exenteração posterior (7) exenteração total (8) linfadenectomia pélvica +retroperitoneal|_____|tipo_1ª cir
20. 2ª CIRURGIA- DATA--....._/___/___ 2ª cir_data
21. TIPO DE CIRURGIA—|_____|tipo_2acir

ACHADOS OPERATORIO:

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

TRATAMENTO ADJUVANTE

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

ANATOMIA PATOLOGICA

31. TAMANHO(CM)|_____|tamanho
32. LOCALIDADE- (0) FUNDO (1) CORPO (2) CERVIX (3) FUNDO-CORPO (4) FUNDO-CORPO-CERVIX (5) CORPO-CERVIX.....|_____|local
33. TIPO LESAO-(1) VEGETANTE (2) SESSIL (se carcinosarcoma).....|_____|

Anexo 2 - Parecer final do Comitê de Ética em Pesquisa

São Paulo, 21 de Julho de 2011.

À
Dra. Isabela Werneck da Cunha

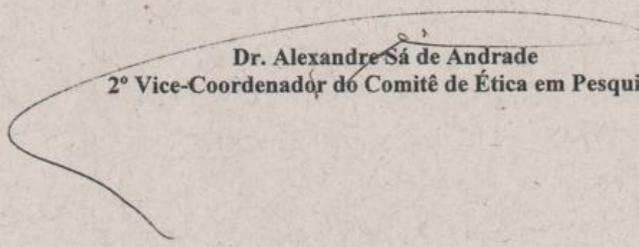
Ref.: Projeto de Pesquisa n°. 1544/11
“Avaliação do gene e da proteína TOP2A em sarcomas uterinos através de técnicas imunoistoquímicas e de FISH”.

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 28/06/2011, após analisarem as respostas aos questionamentos realizados em reunião de 12/04/2011, **aprovaram** a realização do estudo em referência e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Termo de Dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido;
- Declaração sobre os Dados Coletados, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Orçamento Financeiro detalhado;
- Declaração de Infraestrutura e Instalações do Departamento de Anatomia Patológica;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Ginecologia.

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

Atenciosamente,


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

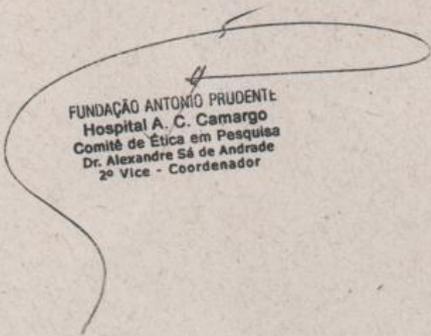
1/1

Comentários Finais:

Os questionamentos apontados pelo CEP e pela Comissão de Pesquisa foram devidamente respondidos. A carta de Ciência e Comprometimento do Departamento de Ginecologia foi apresentada e o projeto alterado.

Parecer Final:

Projeto Aprovado.



FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE
Hospital A. C. Camargo
Comitê de Ética em Pesquisa
Dr. Alexandre Sá de Andrade
2º Vice - Coordenador