

**AVALIAÇÃO PROTÉICA E GÊNICA DOS
RECEPTORES DA FAMÍLIA EGF/HER E SEU
PROGNÓSTICO EM PACIENTES COM CÂNCER
DE ENDOMÉTRIO TIPO I**

THIAGO BORGES MARQUES SANTANA

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do título de mestre**

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Gustavo Cardoso Guimarães

Co-Orientadora: Dr^a. Isabela Werneck da Cunha

São Paulo

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Santana, Thiago Borges Marques

Avaliação proteica e gênica da família dos receptores EGF/HER e seu prognóstico em pacientes com câncer de endométrio tipo I /

Thiago Borges Marques Santana – São Paulo, 2012.

80p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Gustavo Cardoso Guimarães

Descritores: 1. NEOPLASIA DO ENDOMÉTRIO. 2. EXPRESSÃO GÊNICA. 3. IMUNOISTOQUÍMICA. 3. PROGNÓSTICO. 4. HIBRIDIZAÇÃO IN SITU. FLUORESCENTE. 5. FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO

DEDICATÓRIA

À minha querida esposa **Fabiana** e meu filho **Raul**, pelo **amor**, que é a fonte da minha força e minha inspiração todos os dias, e que me estimulam a buscar o melhor, e a ser uma pessoa melhor todos os dias.

Aos meus pais **Albertino Maurício Marques Santana e Olga Maria Borges Santana**, pelo exemplo de vida, carinho, incentivo.

Ao meu amigo **Carlos Chaves Faloppa**, com quem aprendi muito, e que me abriu o caminho para esta grande oportunidade, e primeiro me estimulou nesta caminhada.

Ao Hospital do Câncer e seus pacientes, responsáveis diretos pela minha formação e principal objetivo deste trabalho.

"Mais que de máquinas, precisamos de humanidade."

[Charles Chaplin](#)

AGRADECIMENTOS

Ao **Dr. Gustavo Cardoso Guimarães**, meus agradecimentos por sua orientação cuidadosa em todas as etapas deste trabalho, e por ter me dado a” oportunidade. Grande chefe, grande caráter e humanidade acima de tudo.

À **Dra. Isabela Werneck da Cunha**, pela sua coorientação, eficiência, dedicação e disponibilidade, indispensáveis para a elaboração desta dissertação. E também a todo o Departamento de Patologia do Hospital A. C. Camargo.

Ao **Dr. Glauco Baiocchi Neto**, Diretor do Departamento de Ginecologia Oncológica, pelo incentivo e ajuda na realização dessa dissertação, assim como pela amizade.

Aos meus amigos de **Departamento de Ginecologia do A.C. Camargo**, pela amizade e incentivo na realização deste trabalho, e sem os quais este trabalho não poderia ser realizado.

A **Sra. Hirde Contesini**, pela colaboração, dedicação e ajuda no levantamento dos prontuários por meio do Serviço de Arquivo Médico e Estatístico (SAME).

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

Às **Sra. Ana Maria Rodrigues**, e **Sra. Luciana Costa Pitombeira**, pela indispensável ajuda durante a pós-graduação.

RESUMO

Santana TBM. **Avaliação protéica e gênica dos receptores da família EGF/HER e seu prognóstico em pacientes com câncer de endométrio tipo I.** São Paulo; 2012. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Introdução: O câncer de endométrio é a terceira neoplasia ginecológica mais frequente, sendo diagnosticados cerca de 287.000 casos no ano de 2011 e responsável por cerca de 33.000 óbitos nos países desenvolvidos. Apresenta heterogeneidade clínica, epidemiológica e genética, e pode ser classificada em tipo 1- adenocarcinomas endometrióides (estrogênio dependente) e tipo 2- adenocarcinomas não endometrióides. Os receptores da família EGF/HER, são proteínas transmembrana responsáveis pelo controle de importantes vias da carcinogênese e são compostos pelo EGFR, HER-2, HER-3 e HER-4. Esses receptores encontram-se com expressão aumentada em várias neoplasias malignas e tem ganhado destaque por serem potenciais alvos para novas drogas de combate ao câncer.

Objetivos: O presente estudo tem como objetivos: 1) Avaliar a expressão protéica de EGFR, HER-2, HER-3 e HER-4 através de imunistoquímica, avaliar e o número de cópias dos genes *EGFR*, *HER-2*, *HER-3* e *HER-4* através de FISH (fluorescent in situ hybridization); 2) Correlacionar a expressão protéica dos receptores e a avaliação do número de cópias dos genes de *EGFR*, *HER-2*, *HER-3* e *HER-4* com as variáveis clínico-patológicas; 3) Correlacionar a expressão proteica dos receptores e a avaliação do número de cópias dos genes de *EGFR*, *HER-2*, *HER-3* e *HER-4* com sobrevida livre de doença, sobrevida câncer-específica e sobrevida.

Material e método: Foi avaliada uma série retrospectiva de 218 pacientes admitidas no Departamento de Ginecologia do Hospital do Câncer A.C. Camargo, no período de 1990 à 2008, com diagnóstico de adenocarcinoma endometrióide do endométrio. Realizou-se a construção de *tissue microarray*, teste de FISH (hibridação *in situ* fluorescente), e estudo imunistoquímico. **Resultados:** Houve expressão imunistoquímica para EGFR, HER-2, HER-4 em 0,9%, 1,4%, 6,3% dos casos. No caso do HER-3,

houve expressão em citoplasma e núcleo em 60,2% e 37,2% dos casos, respectivamente. O número de cópias dos genes *EGFR*, *HER-2*, *HER-3* e *HER-4* através de FISH foram encontrados alterados em 12,6%, 7,6%, 10,7% e 3,0% dos casos, respectivamente. A expressão imunoistoquímica de EGFR correlacionou-se com presença invasão perineural. Não houve associação entre as expressões de HER-2, HER-3 e HER-4 com as variáveis clínico-patológicas. A presença de alteração do número de cópias do gene *HER-2* apresentou associação com a presença de invasão vascular sanguínea e invasão $\geq 50\%$ do miométrio. A alteração do número de cópias do gene *HER-3* apresentou associação com: IMC ≥ 30 , presença de invasão vascular linfática e tamanho do tumor $\geq 2\text{cm}$. As alterações no número de cópias de *EGFR* e *HER-4* não tiveram associação com as variáveis clínico-patológicas. A expressão imunoistoquímica positiva de EGFR apresentou associação com pior sobrevida livre de doença ($p < 0,001$) na análise univariada. As expressões imunoistoquímicas positivas de HER-2, HER-3 e HER-4 não tiveram impacto estatisticamente significativo em sobrevida global, sobrevida câncer-específica e sobrevida livre de doença na análise univariada. A presença de alterações dos números de cópias dos genes dos receptores da família EGF não tiveram impacto nas sobrevida global, sobrevida câncer-específica e sobrevida livre de doença na análise univariada. Porém, a alteração do número de cópias de *HER-2* mostrou-se fator de risco independente para recidiva na análise multivariada.

Conclusões: Houve expressão imunoistoquímica para EGFR, HER-2, HER-4 em 0,9%, 1,4%, 6,3% dos casos. No caso do HER-3, houve expressão em citoplasma e núcleo em 60,2% e 37,2% dos casos, respectivamente. A expressão imunoistoquímica positiva de EGFR apresentou associação com pior sobrevida livre de doença na análise univariada. O número de cópias dos genes *EGFR*, *HER-2*, *HER-3* e *HER-4* através de FISH foram encontrados alterados em 12,6%, 7,6%, 10,7% e 3,0% dos casos, respectivamente. A alteração do número de cópias de *HER-2* mostrou-se fator de risco independente para recidiva na análise multivariada.

SUMMARY

Santana TBM. [Immunohistochemical expression and gene status of EGF/HER family as prognostic factors in type I endometrial cancer]. São Paulo; 2012. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Introduction: Endometrial cancer is the third more common gynecologic cancer in women. About 287,000 cases were diagnosed in 2011 and it was responsible for 33,000 deaths in the western world. It may be classified as type I – endometrioid endometrial cancer, estrogen related; and type II – non-endometrioid endometrial cancer. EGF/HER family receptors are transmembrane proteins responsible for important carcinogenic and are divided by: EGFR, HER-2, HER-3 e HER-4. These receptors are overexpressed in various malignant neoplasms and are potential molecular targets. **Objectives:** 1) Evaluate the immunohistochemical expression of EGFR, HER-2, HER-3 and HER-4, and gene status of *EGFR*, *HER-2*, *HER-3* and *HER-4* using FISH (fluorescent in situ hybridization); 2) Correlate the immunohistochemical expression and gene status of EGFR, HER-2, HER-3 and HER-4 with clinical-pathological variables. 3) Evaluate the immunohistochemical expression and gene status of EGFR, HER-2, HER-3 and HER-4 as prognostic factors. **Materials and methods:** A retrospective analysis was performed in a series of 218 patients with endometrioid endometrial cancer, admitted in the Gynecologic Department of Hospital do Câncer A.C. Camargo, between 1990 to 2008. **Results:** The immunohistochemical expression of EGFR, HER-2, and HER-4 were found in 0,9%, 1,4%, 6,3% of cases, respectively. For HER-3, there were cytoplasmic and nuclear expression in 60,2% and 37,2% of cases, respectively. The gene status of *EGFR*, *HER-2*, *HER-3* e *HER-4* by FISH were altered in 12,6%, 7,6%, 10,7%, and 3,0% of cases, respectively. The immunohistochemical expression of EGFR correlated with the presence of perineural invasion. There was no correlation between the immunohistochemical expression of

HER-2, HER-3, HER-4 and clinical-pathological variables. The altered number of *HER-2* gene copies correlated with the presence of vascular invasion and deep miometrial invasion. The presence of *HER-3* altered gene copies correlated with BMI \geq 30, presence of lymphatic invasion and tumor size of \geq 2cm. The altered number of *EGFR* and *HER-4* gene copies did not correlate with the clinical-pathological variables. The immunohistochemical expression of EGFR correlated with worse disease free survival in univariate analysis ($p < 0,001$). The immunohistochemical expressions of HER-2, HER-3 and HER-4 had no impact in survival. The presence of EGF family altered gene copies did not correlate with survival in univariate analysis. However, the presence of *HER-2* altered gene copies correlated with the increase risk of recurrence in multivariate analysis. **Conclusions:** The immunohistochemical expression of EGFR, HER-2, and HER-4 were found in 0,9%, 1,4%, 6,3% of cases, respectively. For HER-3, there were cytoplasmic and nuclear expression in 60,2% and 37,2% of cases, respectively. The immunohistochemical expression of EGFR correlated with worse disease free survival in univariate analysis. The gene status of *EGFR*, *HER-2*, *HER-3* e *HER-4* by FISH were altered in 12,6%, 7,6%, 10,7%, and 3,0% of cases, respectively. The presence of *HER-2* altered gene copies correlated with the increase risk of recurrence in multivariate analysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Via de sinalização da família EGF/HER.....	14
Figura 2	Curva de sobrevida global das pacientes portadoras de adenocarcinoma endometrióide (Hospital A.C. Camargo, 1990-2005).....	35
Figura 3	Curva de sobrevida câncer específica das pacientes portadoras de adenocarcinoma endometrióide (Hospital A.C. Camargo, 1990-2005).....	36
Figura 4	Curva de sobrevida livre de doença das pacientes portadoras de adenocarcinoma endometrióide (Hospital A.C. Camargo, 1990-2005).....	36
Figura 5	Fotomicrografias ilustrando as reações imunoistoquímicas para os marcadores pesquisados.....	38
Figura 6	Fotomicrografia ilustrando os genes pesquisados.....	41
Figura 7	Sobrevida global em função de expressão imunoistoquímica de HER-3.....	52
Figura 8	Sobrevida livre de doença em função da alteração do número de cópias de HER-2.....	53

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Anticorpos utilizados.....	26
Quadro 2	Sondas para FISH.....	28
Tabela 1	Sobrevida relativa em 5 anos por estadio ao diagnóstico no período de 1999-2006, para pacientes com câncer do endométrio.....	2
Tabela 2	Comparação entre as características clínico-patológicas, genéticas e moleculares dos cânceres de endométrio tipo I e tipo II.....	5
Tabela 3	Comparação entre os Sistemas de Estadiamento do Carcinoma do Endométrio da FIGO de 1988 e 2009.....	8
Tabela 4	Características demográficas e clínicas dos pacientes com adenocarcinoma do endométrio tipo I (Hospital A.C. Camargo, 1990-2008).....	31
Tabela 5	Características dos achados intra-operatórios das pacientes com adenocarcinoma endometrióide de endométrio. (Hospital A.C. Camargo, 1990-2008).....	31
Tabela 6	Tratamento adjuvante realizado. (Hospital A.C. Camargo, 1990-2008).....	32
Tabela 7	Características anatomo-patológicas das pacientes com adenocarcinoma endometrióide do endométrio. (Hospital A.C. Camargo, 1990-2008).....	33

Tabela 8	Distribuição dos 217 pacientes com adenocarcinoma endometrióide de endométrio de acordo com o estadiamento FIGO 2009. (Hospital A.C. Camargo, 1990-2008).....	34
Tabela 9	Status da paciente ao final do seguimento. (Hospital A.C. Camargo, 1990-2008).....	35
Tabela 10	Frequências das expressões imunoistoquímicas de EGFR, HER-2, HER-3 e HER-4 (Hospital A.C. Camargo, 1990-2008).....	39
Tabela 11	Associação entre as expressões imunoistoquímicas de EGFR, HER-2, HER-3 e HER-4.....	40
Tabela 12	Frequências das alterações dos genes dos receptores <i>EGFR</i> , <i>HER-2</i> , <i>HER-3</i> e <i>HER-4</i> – teste de FISH.....	42
Tabela 13	Frequências de alterações do número de cópias dos genes dos receptores <i>EGFR</i> , <i>HER-2</i> , <i>HER-3</i> e <i>HER-4</i> – teste de FISH.....	42
Tabela 14	Associação entre as variáveis clínico-patológicas e alteração do número de cópias de <i>HER-2</i>	44
Tabela 15	Associação entre as variáveis clínico-patológicas e alteração do número de cópias de <i>HER-3</i>	45
Tabela 16	Associação entre alteração do número de cópias do gene <i>EGFR</i> e expressão imunoistoquímica para EGFR.....	46
Tabela 17	Associação entre alteração do número de cópias do gene <i>HER-2</i> e expressão imunoistoquímica para HER-2.....	46

Tabela 18	Associação entre alteração do número de cópias do gene <i>HER-3</i> e expressão imunoistoquímica para <i>HER-3</i> no citoplasma.....	46
Tabela 19	Associação entre alteração do número de cópias do gene <i>HER-3</i> e expressão imunoistoquímica para <i>HER-3</i> no núcleo.....	46
Tabela 20	Associação entre alteração do número de cópias do gene <i>HER-4</i> e expressão imunoistoquímica para <i>HER-4</i>	47
Tabela 21	Taxas de sobrevida global (SG), Sobrevida câncer-específica (SCE) e Sobrevida livre de doença (SLD), em 5 anos, em função do estágio da FIGO 2009. (Hospital A.C. Camargo, 1990-2008).....	48
Tabela 22	Taxas de sobrevida global (SG) em função das variáveis clinico-patológicas – Análise univariada. (Hospital A.C. Camargo, 1990-2008).....	48
Tabela 23	Taxas de sobrevida câncer específica (SCE) em função das variáveis clinico-patológicas – Análise univariada. (Hospital A.C. Camargo, 1990-2008).....	49
Tabela 24	Taxas de sobrevida livre de doença (SLD) em função das variáveis clinico-patológicas – Análise univariada. (Hospital A.C. Camargo, 1990-2008).....	50
Tabela 25	Taxas de sobrevida global (SG), câncer-específica (SCE), e sobrevida livre de doença (SLD), em 5 anos, em função das expressões imunoistoquímicas do EGFR, <i>HER-2</i> , <i>HER-3</i> e <i>HER-4</i> – Análise univariada. (Hospital A.C. Camargo, 1990-2008).....	51

Tabela 26	Taxas de sobrevida global (SG), câncer-específica (SCE), e sobrevida livre de doença (SLD), em 5 anos, em função de alteração do número de cópias dos genes de <i>EGFR</i> , <i>HER-2</i> , <i>HER-3</i> e <i>HER-4</i> analisados pelo teste de FISH – Análise univariada. (Hospital A.C. Camargo, 1990-2008)...	53
Tabela 27	Associação entre as variáveis clínico-patológicas e o risco de óbito – Análise multivariada.....	54
Tabela 28	Associação entre as variáveis clínico-patológicas e o risco de óbito por câncer – Análise multivariada.....	55
Tabela 29	Associação entre as variáveis clínico-patológicas e o risco de recidiva – Análise multivariada.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS

EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
EGFR	Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico
HER-2	Receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano.
HER-3	Receptor tipo 3 do fator de crescimento epidérmico humano.
HER-4	Receptor tipo 4 do fator de crescimento epidérmico humano.
PI3K	Fosfatidilinositol -3- fosfato
AKT	Proteína quinase B
HNPCC	Câncer colorretal hereditário não polipóide
JNK	Quinase (c-Jun N-terminal kinases) relacionada a apoptose, liga e fosforila c-Jun.
MAPK	Proteína quinase específica serina/treonina
NF-κB	Fator nuclear kappa B
K-RAS	Gene responsável pelo controle do ciclo celular
PTEN	Gene supressor tumoral (Phosphatase and tensin homolog)
STATS	Ativador de transcrição (signal transducer and activator of transcription)
JAK	Janus quinase
TMA	Tissue Micro-Array
Src	Proto-oncogene quinase proteína-tirosina

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Epidemiologia	1
1.2	Classificação dos carcinomas do endométrio e fatores de risco	3
1.3	Estadiamento e fatores prognósticos	6
1.4	Tratamento	9
1.5	Família EGF/HER.....	11
1.6	Expressão da família EGF/HER no câncer de endométrio.....	17
2	OBJETIVOS	19
3	CASUÍSTICA E MÉTODO	20
3.1	Tipo de estudo.....	20
3.2	Métodos.....	20
3.2.1	Coleta de Dados	20
3.2.2	Critérios de Inclusão	20
3.2.3	Critérios de Exclusão.....	20
3.2.4	Variáveis Coletadas.....	21
3.3	Análise estatística.....	22
3.4	Composição da amostra.....	24
3.5	Métodos de análise e processamento de material	24
3.5.1	Técnica de TMA	24
3.5.2	Protocolo de Imunoistoquímica	25
3.5.3	Avaliação da Expressão Imunoistoquímica	26
3.5.4	Protocolo de hibridação in situ fluorescente (FISH).....	27
3.5.5	Avaliação do teste de FISH	28
4	RESULTADOS	29
4.1	Descrição da casuística.....	29
4.1.1	Dados demográficos, clínicos e cirúrgicos.....	29

4.1.2	Dados de Seguimento	34
4.2	Avaliação da expressão imunoistoquímica e do número de cópias dos genes dos receptores da família EGF	37
4.3	Testes de associação entre as variáveis clínico-patológicas, a expressão imunoistoquímica e o número de cópias dos genes dos receptores da família EGF	43
4.4	Associação entre sobrevida e as variáveis clínico-patológicas	47
4.5	Associação entre expressão imunoistoquímica, número de cópias dos genes dos receptores da família EGF e sobrevida.....	50
4.6	Análise multivariada.....	54
5	DISCUSSÃO	56
6	CONCLUSÕES	70
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

ANEXO

Anexo 1 Ficha de coleta de dados

1 INTRODUÇÃO

1.1 EPIDEMIOLOGIA

O câncer do endométrio é a 6ª neoplasia mais incidente em mulheres em todo o mundo, com cerca de 287.000 casos. Em países desenvolvidos, sua incidência ocupa o 4º lugar, e nos países em desenvolvimento, ocupa o 7º lugar, porém com números muito próximos em ambos os grupos, chegando ao redor dos 142.000 casos/ano. Nos países desenvolvidos é a 10ª causa de morte por neoplasias entre as mulheres, com cerca de 33.000 mortes ao ano. No mundo o câncer do endométrio é a terceira neoplasia ginecológica, ficando atrás do câncer de mama e do colo uterino em frequência (JEMAL et al. 2011).

A incidência é maior nas mulheres de raça branca quando comparado com as negras, hispânicas e asiáticas, no entanto, a mortalidade é cerca de duas vezes maior na raça negra do que na raça branca (7,1 versus 3,9 por 100.000 mulheres) (HICKS et al. 1997; ALTEKRUSE et al. 2010). Mulheres negras tendem a apresentar neoplasias de alto grau, alterações no p53, tipo histológico seroso papilífero e células claras (BARRETT et al. 1995).

O carcinoma do endométrio ocorre mais frequentemente entre a sexta e sétima décadas de vida, com média de aparecimento aos 60 anos. A estimativa é de 75% a 85% dos casos ocorram em paciente com 50 anos ou

mais, e 95% dos casos ocorram em pacientes acima dos 40 anos de idade. Raramente ocorre em pacientes antes do 30 anos.

Na maioria dos casos o carcinoma do endométrio é confinado ao útero quando diagnosticado. Dados do *National Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology, and End Results* (SEER) mostram doença em Estadio I em 69% dos casos, e Estadio II em 19% (ALTEKRUSE et al. 2010).

O prognóstico dessas pacientes é bastante favorável, pelo fato de o diagnóstico ser feito em estádios precoces na maioria dos casos. Resultados de sobrevida da FIGO, mostram sobrevida em 5 anos de 85% a 91% para pacientes com doença Estadio I, e os dados do SEER mostram sobrevida em 5 anos de 96% para doença (Tabela 1).

Tabela 1 - Sobrevida Relativa em 5 anos por Estadio ao Diagnóstico no período de 1999-2006

Estadio ao Diagnóstico	Distribuição por Estadio	Sobrevida Relativa em 5
	(%)	anos (%)
Localizado (confinada ao útero)	69	95.5
Regional (metástases para linfonodos regionais)	19	67.5
Metástases à distancia	8	17.1
Desconhecidos (não estadiados)	4	55.5

Fonte: ALTEKRUSE (2010)

1.2 CLASSIFICAÇÃO DOS CARCINOMAS DO ENDOMÉTRIO E FATORES DE RISCO

Existe um modelo dualístico de classificação dos cânceres do endométrio, que inicialmente foi proposto por BOKHMAN em 1983, baseado em critérios clínico-patológicos, que classifica os tumores em tipo I e tipo II. Este sistema é útil, pois divide os tumores do endométrio quanto à sua etiologia e comportamento clínico.

Os cânceres de endométrio tipo I, representam cerca de 70 a 80% dos casos novos de cânceres esporádicos do endométrio. Os tumores do tipo I são do tipo histológico endometrióide, e portanto primariamente associados com ação de estrogênio sem oposição da progesterona. A lesão precursora dos tumores do tipo I é a hiperplasia endometrial, e os fatores de risco são obesidade, anovulação, diabetes, ovários policísticos, menopausa tardia, nuliparidade e exposição a estrogênios exógenos. A maioria dos tumores tipo I tem expressão de receptores de estrógeno e progesterona, são de grau baixo grau histológico e possuem prognóstico favorável, com altas taxas de sobrevida.

Os tumores do tipo II representam aproximadamente 10 a 20% dos cânceres de endométrio e são do tipo não-endometrióide. São os tipos histológicos serosos e células claras, possuem alto grau histológico, e não têm relação com exposição estrogênica. Os fatores hormonais não possuem implicação na sua patogênese, e os tumores tipo II geralmente se originam de um endométrio atrófico. Clinicamente possuem comportamento mais

agressivo, e associados com aparecimento de metástases mais precocemente, portanto apresentam mau prognóstico.

Além de características morfológicas e clínicas distintas, os cânceres do endométrio tipo I e tipo II possuem características moleculares e genéticas também distintas (Tabela 2). Os tumores tipo I são associados com mutações em PTEN, K-ras, β -catenina e com defeitos no sistema de reparo do DNA. Os tumores do tipo II estão frequentemente associados com aneuploidia e mutação do p53 (DOLL et al. 2008; SAMARNTHAI et al. 2010). Essas características genéticas e moleculares distintas sugerem que os dois tipos de câncer de endométrio apresentem vias de carcinogênese distintas.

Cerca de 90% dos casos de câncer do endométrio são esporádicos, e os 10% restantes são hereditários. Dentre estes, a Síndrome de Lynch ou *Hereditary Nonpolyposis Colon Cancer* (HNPCC) é responsável pela grande maioria desses casos. É uma doença autossômica dominante, causada por uma mutação germinativa de genes de reparo de danos do DNA (MLH1, MSH2, MSH6 ou PMS2). Há predisposição para o aparecimento de câncer colorretal, e em mulheres o carcinoma do endométrio é o sítio extra-colônico mais comum de tumor, ocorrendo em mais de 50% dos casos (DOLL et al. 2008; OKUDA et al. 2010).

Tabela 2 - Comparação entre as características clínico-patológicas, genéticas e moleculares dos cânceres de endométrio tipo I e tipo II.

	Tipo I	Tipo II
Características Clínicas		
Associação com Estrógeno	Sim	Não
Presença de Distúrbio Metabólico	Sim	Não
Status Menstrual	Pré e Peri-menopausa	Pós-menopausa
Endométrio precursor	Hiperplásico	Atrófico
Grau Tumoral	Baixo	Alto
Tipo Histológico	Endometrióide	Não-endometrióide (seroso, células claras)
Profundidade de Invasão	Superficial	Profunda
Prognóstico/Comportamento	Favorável/Indolente	Desfavorável/Agressivo
Características Moleculares		
Inativação <i>PTEN</i>	> 83%	11%
Mutação <i>PIK3CA</i>	26 – 36%	5%
Mutação <i>KRAS</i>	10 – 30%	0 - 10%
Mutação <i>β-catenina/CTNNB1</i>	14 - 44%	0 – 5%
Amplificação <i>HER-2</i>	10 – 30%	18 – 80%
Mutação <i>P53</i>	10 – 20%	90%
Inativação <i>p16</i>	10%	40 – 45%
Instabilidade de <i>Microsatélites</i>	20 – 45%	0 – 11%

Fonte: modificado de SAMARNTHAI et al. (2010)

1.3 ESTADIAMENTO E FATORES PROGNÓSTICOS

O principal fator de prognóstico do câncer do endométrio é a presença de acometimento linfonodal. As primeiras publicações a darem importância ao comprometimento linfonodal no câncer de endométrio, são dos anos de 1970. MORROW et al. (1973) revisaram a literatura e notaram que em uma série de 369 pacientes considerados inicialmente como estágio clínico I, 39 pacientes apresentavam doença linfonodal pélvica. CREASMAN et al. (1976) estudaram 140 pacientes dentre os quais 16 apresentavam comprometimento de linfonodos pélvicos. Reportando os dados do GOG 33, CREASMAN et al. (1976) relataram que dos 621 pacientes considerados estágio clínico I, 58 (9%) pacientes apresentavam linfonodos pélvicos comprometidos, e 34 pacientes possuíam linfonodos paraórticos comprometidos, e ainda 11% das pacientes apresentavam doença linfonodal em ambas as regiões (CREASMAN et al. 1987). A partir dessa publicação, o comprometimento linfonodal passou a determinar mudança no estadiamento (estadio III), pelo fato de ter impacto negativo na sobrevida.

Assim como o comprometimento linfonodal, ocorreu a solidificação de outros fatores de risco no câncer do endométrio. Esses fatores foram divididos em dois grupos: fatores de risco intrauterinos e fatores extrauterinos. Os fatores de risco intrauterinos são: (1) grau histológico, (2) invasão profunda do miométrio, (3) extensão cervical, e (4) invasão vascular-linfática. Os fatores de risco extrauterinos são: (1) metástases para os anexos uterinos, (2) invasão de serosa do útero, (3) citologia peritoneal

positiva, (4) além do comprometimento linfonodal pélvico ou paraórtico (BORONOW et al. 1984; DISAIA et al. 1984; CREASMAN et al. 1987).

Após a publicação do protocolo do *Gynecologic Oncology Group* (GOG) 33, houve uma mudança de paradigma em relação ao estadiamento e tratamento do câncer de endométrio. Até então, o estadiamento era baseado em critérios clínicos e biópsia do endométrio, e a radioterapia tinha o papel central do tratamento desta neoplasia. A partir de então, a cirurgia passou a ser a principal modalidade de tratamento, e ainda ter papel fundamental no estadiamento. O estágio cirúrgico possui melhor acurácia para avaliar a presença de doença extrauterina em relação à avaliação clínica (CREASMAN et al. 1987; MORROW et al. 1991).

Em 1988, a *Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstetrique* (FIGO) determinou que o estadiamento da neoplasia endometrial passasse a ser cirúrgico-patológico, preconizando a realização de histerectomia abdominal total com salpingooforectomia bilateral, citologia peritoneal, e linfadenectomia pélvica e retroperitoneal, e avaliação do andar superior de abdome, assim como a superfície peritoneal.

Em 2009 o Comitê da FIGO realizou mudanças no sistema de estadiamento do câncer do endométrio (CREASMAN et al. 2009; PECORELLI et al. 2009) que foram: fusão dos IA e IB do sistema de 1988, que no sistema atual são o estágio IA; invasão de mucosa cervical e citologia peritoneal deixaram de ser critérios para estadiamento; comprometimento peritoneal e parametrial passaram a ser critérios para

estadiamento; e subdivisão do estágio IIIC em IIIC1 e IIIC2, levando em conta o respectivo comprometimento de linfonodos pélvicos e para-aórticos.

O novo sistema de estadiamento é alvo de críticas por parte dos especialistas, principalmente por não reportar as diretrizes para realização da linfadenectomia, deixando-a ao critério dos cirurgiões. Esse novo sistema deverá ser validado por estudos subsequentes, no que diz respeito à sobrevida em seus grupos (MARIANI et al. 2009).

Tabela 3 - Comparação entre os Sistemas de Estadiamento do Carcinoma do Endométrio da FIGO.

FIGO 1988		FIGO 2009	
Estádio I – Doença Restrita ao Útero			
IA	Limitado ao endométrio		Limitado ao endométrio ou invasão ≤ 50% do miométrio
IB	Invasão ≤ 50% do miométrio		Invasão > 50% do miométrio
IC	Invasão > 50% do miométrio		
Estádio II – Extensão para Colo Uterino			
IIA	Invasão de mucosa cervical	II	Invasão de estroma cervical
IIB	Invasão de estroma cervical		
Estádio III – Extensão Locorregional			
IIIA	Extensão para serosa do útero e/ou anexos; ou citologia positiva		Extensão para serosa do útero e/ou anexos
IIIB	Extensão vaginal		Extensão vaginal e/ou parametrial e/ou peritôneo pélvico
IIIC	Metástases para linfonodos pélvicos e/ou para-aórticos	IIIC1	Metástases para linfonodos pélvicos
		IIIC2	Metástases para linfonodos para-aórticos
Estádio IV			
IVA	Extensão para bexiga e/ou mucosa retal		
IVB	Metástases à distância incluindo intra-abdominal e/ou linfonodos inguinais		

Notas para o Sistema FIGO 2009:

- Independe do Grau Histológico – G1, G2 ou G3
- Envolvimento endocervical deve ser considerado Estadio I, e não mais Estadio II
- Citologia positiva deve ser reportada separadamente, sem modificar estadiamento

1.4 TRATAMENTO

O tratamento cirúrgico por laparotomia, com realização de histerectomia, é considerado o tratamento padrão para as pacientes com diagnóstico de câncer do endométrio, que não tenham sinais de doença extra-uterina. A laparoscopia tem o seu lugar no tratamento cirúrgico, e vem, cada vez mais, sendo consolidada como alternativa à laparotomia (SERACCHIOLI et al. 2010; MASCIULLO et al. 2010).

A principal controvérsia atual do tratamento do câncer do endométrio, é o papel da linfadenectomia (SERACCHIOLI et al. 2010; MASCIULLO et al. 2010). O comprometimento linfonodal é um dos fatores prognósticos do carcinoma do endométrio. Os critérios de risco para o acometimento linfonodal são definidos por achados do exame patológico da peça cirúrgica, realizado de maneira definitiva no pós-operatório. Portanto, os pacientes de baixo risco acabam sendo submetidos à linfadenectomia, sem haver real necessidade. A linfadenectomia pélvica e retroperitoneal para-aórtica são procedimentos associados a riscos e morbidades, sendo a principal complicação, o linfedema dos membros inferiores.

Dois estudos importantes foram recentemente publicados, ambos buscando estudar e estabelecer o papel da linfadenectomia. Ambos mostraram que a linfadenectomia melhora o estadiamento da doença, porém não mostraram melhora da sobrevida. Os dois estudos são alvos de críticas com relação à seleção de pacientes, controle cirúrgico da linfadenectomia e

tratamentos adjuvantes que influenciaram em seus resultados finais (BENEDETTI et al. 2008; KITCHENER et al. 2009).

O tratamento adjuvante mais comum para os carcinomas do endométrio nos estádios iniciais é a radioterapia (WÁRLÁM-RODENHUIS et al. 2000; CREUTZBERG et al. 2000). A radioterapia diminui taxas de recorrência local, porém não aumenta sobrevida. O estudo PORTEC-2, comparou as 2 modalidades empregadas no tratamento adjuvante (Radioterapia Pélvica versus Braquiterapia de Cúpula Vaginal), e mostrou que as taxas de controle locorregional são semelhantes. A vantagem da braquiterapia é a menor intensidade dos efeitos colaterais gastrintestinais (NOUT et al. 2010).

As pacientes estágio I/II com fatores de alto risco, possuem sobrevida comprometida pelo desenvolvimento de doença metastática extra-pélvica, sugerindo a necessidade de terapia adjuvante sistêmica eficaz. Alguns estudos mostraram indício de benefício da quimioterapia adjuvante nesses casos, porém papel da quimioterapia no cenário adjuvante aguarda mais estudos, para melhor definição (BENEDETTI et al. 2008; KITCHENER et al. 2009).

Em estádios avançados (III e IV) e doença recidivada, está indicada a quimioterapia baseada em agentes derivados da platina. Há consenso em se usar esquemas com mais de uma droga, sendo que as drogas com maior taxa de resposta são doxorubicina, paclitaxel, cisplatina e carboplatina (DIZON 2010).

Há algumas lacunas para se preencher no tratamento do câncer do endométrio, e a busca atual é por novos agentes que possam colaborar nessa batalha. A terapia alvo é um desses campos promissores, e entre os agentes promissores estão os anticorpos monoclonais, que já vem sendo testados, porém ainda há um longo caminho a ser percorrido nessa direção (LEITAO e BARAKAT 2011).

1.5 FAMÍLIA EGF/HER

O *Epidermal Growth Factor Receptor* – Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR) foi identificado em 1978, e descrito como uma proteína de 170kDa. Mostrou-se nos anos subsequentes, que o EGFR é uma proteína com atividade de tirosina quinase, que é ativada quando ligada ao EGF, e em 1984 o seu cDNA foi isolado e caracterizado. Posteriormente, usando-se um probe de EGFR, foi identificada uma família de proteínas semelhantes ao EGFR, também conhecido como ERBB, devido à homologia com produto gênico da eritroblastose viral (v-erbB). Essa família se constitui do EGFR, também conhecido como ERBB1/HER1, e também dos receptores ERBB2/HER2/NEU, ERBB3/HER3, e ERBB4/HER4 (CIARDIELLO et al. 2001; ZACZEK et al. 2005; SERGINA e MOASSER 2007; HYNES e MACDONALD 2009).

Estruturalmente os receptores da família EGF/HER são formados por um domínio extracelular, um domínio transmembrana único, e um domínio intracelular do tipo tirosina-quinase. O domínio extracelular possui 4

subunidades, e o domínio tirosina-quinase consiste em duas subunidades (lobos), N e C, que formam uma fenda na qual se liga o ATP. Apesar da família ErbB ser considerada um protótipo no que se refere a atividade tirosina-quinase, um de seus membros da família (ErbB3) não têm atividade autônoma de fosforilação, portanto necessita acoplamento com outros receptores para que ocorra a fosforilação (TSUJIOKA et al. 2010; YARDEN e PINES 2012).

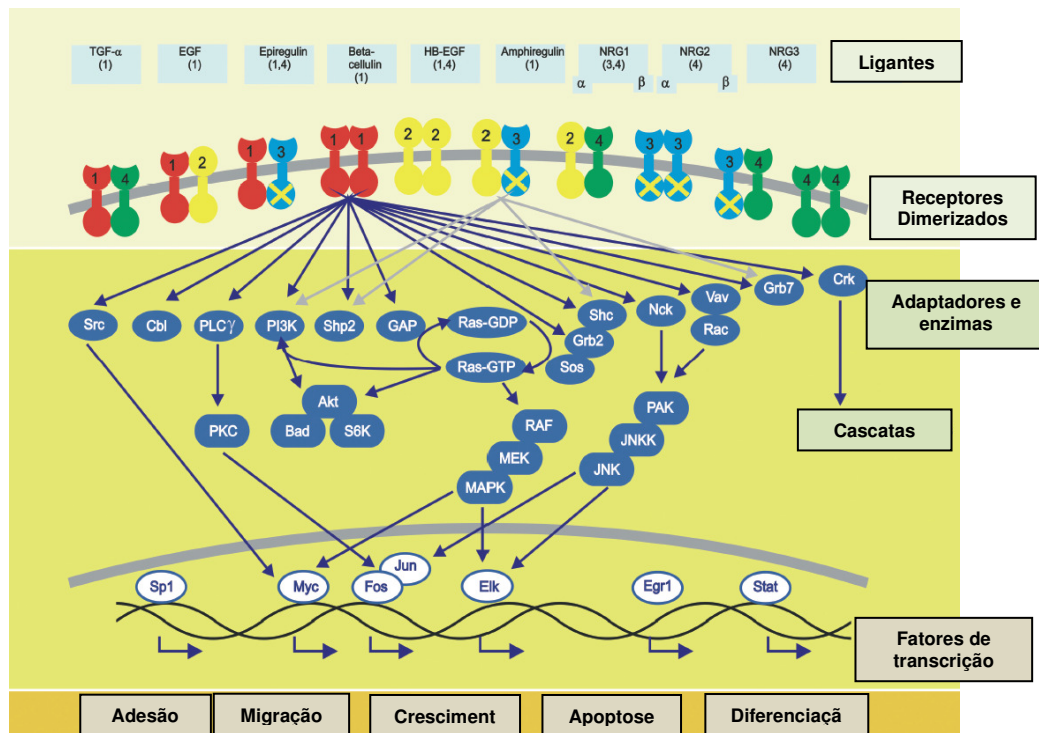
Os receptores da família EGF/HER são ativados por seus ligantes, chamados fatores de crescimento, que podem ser produzidos pela mesma célula (autócrinos), ou pelas células ao redor (parácrinos). Os ligantes dos receptores podem ser separados em três grupos: (a) ligantes específicos do EGFR, tais com EGF, amphiregulina (AF) e TGF- α ; (b) ligantes de EGFR e ERBB-4, tais como betacelulina, fator de crescimento ligado à heparina (HB-EGF) e epiregulina (EPR); (c) e neuregulinas ou heregulinas (NRG), que se ligam à ERBB-3 e ERBB-4. Não são conhecidos ligantes para ERBB-2, apesar disso, ERBB-2, juntamente com ERBB-3, são os principais parceiros de heterodimerização dos receptores da família (HYNES e LANE 2005; TSUJIOKA et al. 2010).

Quando acoplados aos seus ligantes, ocorre mudança de conformação do domínio extracelular do receptor, permitindo homo ou heterodimerização dos receptores, iniciando uma complexa cascata de tradução de sinal intracelular responsável pela morte, crescimento, metabolismo e mobilidade celular. A seleção de parceiros para dimerização

determina a atividade sinalizadora entre as proteínas ErbB (HYNES e LANE 2005; YARDEN e SLIWKOWSKI 2006; SERGINA e MOASSER 2007).

A potência de sinalização dos dímeros parece responder a uma hierarquia, onde os heterodímeros são mais potentes que os homodímeros, e os heterodímeros contendo HER-2 são mais ativos deles. Em particular o heterodímero HER-3/HER-2 possui a maior potência de sinalização entre todos (ZACZEK et al. 2005; SERGINA e MOASSER 2007).

As principais vias de sinalização dos receptores da família EGF/HER estão representadas na **Figura 1**, sendo elas: via Ras-Raf-MAPK (proteína quinase mitógeno ativada), que leva à ativação de ERK1, e ERK2, que regulam a transcrição de moléculas responsáveis pela proliferação e morte celular; via PI3K (fosfatidil-inositol-3-quinase) e Akt (serina/treonina quinase), que também é implicada em regulação da proliferação e sobrevivência celular, e via PKC e Jak/Stat (TAKEUCHI e ITO 2010).



Fonte: adaptado ZACZEK et al. (2005)

Figura 1 – Via de sinalização da família EGF/HER

Os receptores da família EGF são parte de um sistema de biológico complexo (**Figura 1**), onde seus componentes formam uma rede de interações que culminam com uma série de alterações que regulam a célula. Podemos dividir esse sistema em camadas, onde a primeira pode ser chamada de “input layer”, onde são capturados os estímulos, que são dados por interação entre as moléculas (fatores de crescimento) ligantes, e os receptores. A camada intermediária é formada pelos elementos processadores de sinal (“signal processing layer”), que são as vias de sinalização intracelular. Essas vias proporcionam interação entre as vias de entrada e de saída dos sistemas. A última camada é chamada de “output layer”, que é a via de saída. Ocorre no núcleo, e é constituída pela expressão dos genes através dos fatores de transcrição. O controle do

comportamento da célula é uma interação entre os fatores de transcrição e o contexto celular (YARDEN e SLIWKOWSKI 2006; CITRI e YARDEN 2006).

Nas células tumorais, a família de receptores EGF podem estar ativados por vários mecanismos, incluindo: amplificação do gene, que pode levar a uma expressão aumentada do receptor; a mutações no domínio quinase de ativação; co-expressão do receptor e do ligante, e deleções no domínio extracelular dos receptores (HYNES e LANE 2005; HYNES e MACDONALD 2009).

Existe associação entre os receptores da família EGF com vários tipos de neoplasias malignas, entre eles os tumores de SNC (gliomas), pulmão, mama, cólon, cabeça e pescoço, ovário, estômago e esôfago.

O aumento de expressão de EGFR é uma alteração frequente nos tumores do SNC, e pode ser observada em até 40% dos gliomas, estando associada a alto grau histológico, alto índice de proliferação celular, e menor sobrevida (WIKSTRAND et al. 1998).

Em proporção significativa de neoplasias malignas, a amplificação do gene é acompanhada de rearranjo genético. A mutação mais freqüente é a deleção de parte do domínio extracelular do receptor de EGF, dando origem a um receptor constitutivamente ativo (mutação tipo III). Esse tipo de mutação foi descrito em carcinomas de pulmão, ovário e mama (MOSCATELLO et al. 1995).

Nos cânceres de pulmão não pequenas células (NSCLC) a ativação constitutiva do EGFR está associada à expressão aumentada do receptor, amplificação do gene ou mutação somática no domínio quinase do gene

EGFR (exons 18 - 21), resultando em sinalização intracelular independente de K-ras. A ativação aberrante do EGFR está associada com resposta clínica aos inibidores de tirosina quinase, como gefitinib e erlotinib (UBERALL et al. 2008).

O melhor exemplo de associação entre um dos receptores da família EGF e câncer, são os tumores de mama. Nestes, o aumento de expressão de HER-2, derivado da amplificação do gene HER-2, está descrito em cerca de 15 a 30% dos casos dos carcinomas ductais invasores. Aumento da expressão de HER-2 está associada ao tamanho do tumor, presença de acometimento linfonodal, maior grau histológico e aneuploidia, o que implica em pior prognóstico. O aumento de expressão de HER-2 também está associado a um pior prognóstico em tumores gástricos (UBERALL et al. 2008).

HER-3 possui expressão aumentada em várias neoplasias, entre elas tumores de mama e ovário, e possui também papel crucial na oncogênese de uma parte dos tumores de pulmão e de próstata. Nos tumores gástricos, BEGNAMI et al. (2011) mostraram que aumento de expressão nuclear de HER-3 teve associação com pior sobrevida global.

HER-4 possui papel importante no desenvolvimento do miocárdio, o que foi demonstrado em estudos de ablação de genes de roedores (YARDEN e PINES 2012). Possui expressão aumentada em uma série de tumores, porém sem um papel prognóstico definido.

1.6 EXPRESSÃO DA FAMÍLIA EGF/HER NO CÂNCER DE ENDOMÉTRIO

Há estudos avaliando a expressão da família EGF/HER e seus ligantes no câncer do endométrio. Esses estudos descrevem padrões de expressão diferentes no endométrio pré e pós-menopausa, e no carcinoma de endométrio.

Em estudo publicado em 1994, KHALIFA et al. relataram que a expressão imunistoquímica aumentada do EGFR é fator significativo preditor de menor sobrevida em 5 anos, mesmo após controle da variável por idade, tipo e grau histológico. Este estudo incluiu 45 pacientes tratados com diagnóstico de adenocarcinoma endometrióide, 24 com diagnóstico de carcinomas de endométrio tipo II. Em 1995 NIIKURA et al. publicaram estudo com 140 casos de tumores do tipo I, avaliando expressão imunistoquímica do EGFR, que apontou a expressão de EGFR como fator de pior prognóstico da doença em análise univariada, mas que não foi confirmado em análise multivariada.

EJSKJAER et al. publicaram em 2007 um estudo em que descrevem a expressão dos receptores do sistema EGF/HER em carcinomas de endométrio tipo I. O autor pesquisou a expressão do mRNA, juntamente com perfil imunistoquímico, em material de biópsias, e verificou a expressão diminuída de mRNA HER1 e HER3 nos carcinomas de endométrio, em contraste com aumento significativo da expressão de HER4, AR, TGF- α e HB-EGF.

A expressão do HER-2 tem sido alvo de muitos estudos, sendo sua expressão nos carcinomas tipo I relatada entre 10 a 30% dos casos. Nos tumores do tipo II é descrito aumento de expressão em taxas que vão de 18 a 80%, sendo nestes casos, associado à doença de pior prognóstico (ENGELSEN et al. 2008; GRUSHKO et al. 2008; KONECNY et al. 2009). Acredita-se que a amplificação do gene HER-2 tenha papel na carcinogênese dos carcinomas endometrióides pouco diferenciados, e principalmente câncer endometrial do tipo II (SAMARNTHAI et al. 2010; OKUDA et al. 2010).

A expressão de HER3 e HER4 foi pouco estudada isoladamente nos carcinomas do endométrio. SRINIVASAN et al. (1999) mostraram ambos com expressão imunoistoquímica aumentada em tecido tumoral, quando comparados ao endométrio normal.

Nos carcinomas do endométrio, assim como em outros tipos de câncer, a terapia alvo é o presente e o futuro, no que se refere ao tratamento anti-neoplásico. Embora já existam estudos avaliando anticorpos monoclonais anti-receptores de tirosina-quinase, mais especificamente o HER-2, eles representam o início de um longo caminho, e estudos que avaliam a expressão molecular dos receptores da família EGF/HER podem contribuir para o melhor entendimento da patogênese tumoral, assim como contribuir para o desenvolvimento de novas drogas para ampliar e aprimorar o arsenal terapêutico disponível atualmente.

2 OBJETIVOS

- 1 Avaliar a expressão protéica de EGFR, HER-2, HER-3 e HER-4 através de imunohistoquímica e o número de cópias dos genes *EGFR*, *HER-2*, *HER-3* e *HER-4* através de FISH (fluorescent in situ hybridization) em carcinomas de endométrio do tipo I.
- 2 Correlacionar a expressão protéica dos receptores e a avaliação do número de cópias dos genes de *EGFR*, *HER-2*, *HER-3* e *HER-4* com as variáveis clínico-patológicas.
- 3 Correlacionar a expressão protéica dos receptores e a avaliação do número de cópias dos genes de *EGFR*, *HER-2*, *HER-3* e *HER-4* com sobrevida livre de doença, sobrevida câncer-específica e sobrevida global.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO

Estudo retrospectivo longitudinal.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Coleta de Dados

Os dados clínicos e alguns dados anatomopatológicos foram obtidos a partir dos prontuários médicos arquivados no Serviço de Arquivo Médico e Estatística (SAME) do Hospital do Câncer A.C. Camargo. A maioria dos dados anatomopatológicos foram obtidos do relatório patológico pós-cirúrgico. Todos os dados foram transcritos para as fichas de coleta de dados padronizadas (Anexo 1).

3.2.2 Critérios de Inclusão

Foram selecionadas as pacientes admitidas para tratamento no Hospital A.C. Camargo, no período de Janeiro de 1990 à Dezembro de 2008, com diagnóstico de adenocarcinoma endometrióide do endométrio.

3.2.3 Critérios de Exclusão

Foram considerados inelegíveis para o estudo os pacientes com:

- a) Câncer do endométrio Tipo II;
- b) Segunda neoplasia primária sincrônica;
- c) História prévia de radioterapia pélvica;
- d) História prévia de quimioterapia;
- e) Pacientes que já tenham recebido qualquer tratamento neoadjuvante para o câncer do endométrio;
- f) Paciente cujo material anatomopatológico não possibilitasse a análise imunohistoquímica.

3.2.4 Variáveis Coletadas

Entre as variáveis demográficas e clínicas coletadas estão: idade, raça, peso, altura, menopausa, uso de reposição hormonal pós-menopausa, primeiro sintoma, informações a respeito do diagnóstico, tipo de cirurgia realizada para tratamento, realização tratamento adjuvante, modalidades de tratamento adjuvante.

Entre as variáveis anatomopatológicas coletadas estão: estadiamento, grau de diferenciação histológica, tamanho do tumor e sua localização no útero, presença de invasão estruturas e órgãos pélvicos, presença de invasão perineural, presença de invasão vascular linfática, presença de invasão vascular sanguínea, presença de metástases linfonodais, número de linfonodos dissecados por localização anatômica (pélvica ou paraórtica).

Também foram coletados dados de seguimento, relativos à mortalidade, presença de recidiva de doença, e tempo de livre de recidiva. A ficha de padronizada de coleta de dados pode ser vista no Anexo 1.

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram coletados de prontuário e transcritos para ficha padronizada, e então 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 for Mac” versão 16.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL).

Inicialmente foram calculadas freqüências simples de todas as variáveis. (clínicas e anatomopatológicas). As variáveis quantitativas foram expressas pelas médias e/ou medianas. As variáveis clínico-patológicas foram: idade, IMC, estágio da FIGO 2009, comprometimento linfonodal, grau de diferenciação histológica da FIGO, invasão vascular sanguínea, invasão vascular linfática, invasão perineural, tamanho do tumor, profundidade de invasão do tumor, citologia peritoneal.

As associações das variáveis qualitativas com expressões imunohistoquímicas de HER-1, HER-2, HER-3 e HER-4, e o número de cópias dos genes de *HER-1*, *HER-2*, *HER-3* e *HER-4* verificados pelo teste de FISH, foram realizadas através do teste do qui-quadrado bi-caudal. Quando as freqüências esperadas foram inferiores ao valor 5, utilizou-se o teste exato de Fischer.

Utilizou-se o método de Kaplan-Meier para os cálculos de probabilidade de sobrevida global e livre de doença (KAPLAN e MEIER 1958). 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. 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. Utilizou-se o teste de log-rank para se comparar as curvas de sobrevida entre os grupos.

Coletaram-se as informações acerca das expressões imunohistoquímicas de HER-1, HER-2, HER-3 e HER-4, e o número de cópias dos genes de *HER-1*, *HER-2*, *HER-3* e *HER-4*, originalmente como variáveis numéricas. Estas foram convertidas em variáveis dicotômicas para que fosse possível a análise de sobrevida. As expressões imunohistoquímicas de HER-1, HER-2, HER-3 e HER-4, e o número de cópias dos genes de *HER-1*, *HER-2*, *HER-3* e *HER-4*, foram avaliadas em modelo multivariado exploratório. Para tanto, utilizou-se o modelo de regressão de Cox (COX 1972). As variáveis selecionadas para modelo multivariado foram as que atingiram significância estatística na análise univariada, bem como aquelas que atingiram valores de p de até 0,20. Em todos os testes estatísticos o nível de significância foi igual a 5%.

3.4 COMPOSIÇÃO DA AMOSTRA

Dentre 290 pacientes tratados no Hospital do Câncer A. C. Camargo por câncer de endométrio tipo I no período de janeiro de 1990 a dezembro de 2008, 217 casos foram elegíveis para o estudo.

3.5 MÉTODOS DE ANÁLISE E PROCESSAMENTO DE MATERIAL

Os casos foram resgatados do arquivo de anatomia Patológica do hospital A.C. Camargo, revistos e reclassificados por dois patologistas. (IWC e CABTO). Foi selecionada uma área representativa do tumor para a montagem do TMA).

3.5.1 Técnica de TMA

Foi escolhida uma área de cada tumor selecionado para confecção do TMA. O TMA foi construído conforme técnica descrita por ANDRADE et al. em 2007, 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 ocupou pelo menos 20% da área

total do cilindro. Foram realizados cortes sequenciais de 4 µm de espessura, que foram colhidos em lâminas adesivas oriundas da Instrumedics (Hackensack NJ, EUA).

3.5.2 Protocolo de Imunoistoquímica

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

A recuperação antigênica por calor foi realizada utilizando-se 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 min cada.

A peroxidase endógena foi bloqueada em solução de peróxido de hidrogênio a 3%, com a duração de 20 minutos, sendo as lâminas, a seguir, 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 os anticorpos primários anti-HER1, anti-HER2, anti-HER3 e anti-HER4 (Quadro 1) por 90 min 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).

Quadro 1 - Anticorpos utilizados.

Anticorpo	Marca	Clone	Código
EGFR/HER	Novocastra®	EGFR 25	NCL-egfr
HER-2	DAKO®	Policlonal	cod. A0485
HER-3	Neomarkers®	Policlonal	cod. rb-9211
HER-4	Zytovision®	Policlonal	cod. rb 9045

3.5.3 Avaliação da Expressão Imunoistoquímica

Para as proteínas HER-1 e HER-2, as reações foram avaliadas de acordo com o Guideline ASCO/CAP 2007 para HER-2 (WOLFF 2007).

Para as proteínas HER-3 e HER-4, os casos foram classificados em negativos, positivo fraco, moderado e forte de acordo com a intensidade da reação citoplasmática. Não foram considerados número de células positivas, uma vez que quando a marcação estava presente, ela se dava de forma homogênea em todas as células tumorais representadas. Como em alguns casos de HER-3 observamos também a marcação nuclear, este dado também foi relatado, e classificado conforme sua expressão em marcação positiva, onde ocorreu a marcação nuclear, e marcação negativa onde não houve a marcação nuclear de HER-3.

Para fins de análise estatística as expressões consideradas negativo e positivo fraco foram agrupadas em marcação negativa, e as expressões moderada e forte foram consideradas positivas.

3.5.4 Protocolo de hibridação *in situ* fluorescente (FISH)

Foram utilizadas as sondas descritas no Quadro 2 para os ensaios de FISH. Após a desparafinização em duas lavagens com xilol 100% de 5 minutos cada, as lâminas foram reidratadas por meio de duas lavagens com etanol 100% de 5 minutos cada. Em seguida, foram tratadas com 0,2mmol/L de HCl por 20 minutos, água destilada por 2 minutos e 2X tampão citrato (SSC; NaCl 0,3mmol/L e citrato de sódio 0,03mmol/L) por 3 minutos. As lâminas foram, então, incubadas nesse mesmo tampão por 30 minutos a 82°C em banho-maria e em seguida incubadas por 36 minutos a 37°C em tampão de protease (0,05mmol/L Tris-HCl pH 7,8, 0,01mmol/L ácido etileno diamino tetracético, e 0,01mmol/L NaCl) para a digestão protéica. Finalmente, as lâminas foram levadas a formalina 10% em tampão salina fosfato por 10 minutos. Tanto a sonda para o FISH quanto o DNA alvo foram denaturados juntamente por 5 minutos a 75°C e incubados “*overnight*” a 37°C. Em seguida as lâminas foram lavadas em tampão pós-hibridação (SSC e NP40) por 3 minutos a 74°C e montadas com contraste DAPI (SSC 2X/0,03 ug/mL 4',6-diaminido-2-fenilindoleidrodicloreto) para a identificação dos núcleos.

Quadro 2 - Sondas para FISH

Sonda	Marca	Código
EGFR/CEN7	Zytovision®	cod. Z2033-200
HER-2/neu/CEN17	DAKO®	cod. K5331
HER3/CEN12	Zytovision®	cod. Z2056-200
HER4/CEN2q11	Zytovision®	cod. Z2057-200

As lamínas 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 informados de acordo com o número de sinais obtidos tanto para a sonda centromérica quanto para os genes alvos (*EGFR*, *HER-2*, *HER-3* e *HER-4*). Um caso foi considerado normal, quando houve 2 sinais para a sonda centromérica e 2 sinais para a sonda alvo, amplificado ou ganho genômico quando houve mais de 4 sinais da sonda alvo e 2 sinais de sonda centromérica, trissomia quando houve 3 sinais para a sonda centromérica e 3 sinais para a sonda alvo, e polissomia quando houve mais de 4 sinais tanto para as sondas centroméricas quanto para as sondas alvos.

3.5.5 Avaliação do teste de FISH

Para fins estatísticos, o estado dos genes foi classificado em normal e alterado, sendo que na categoria alterado foram incluídas as ampliações, ganhos genômicos e as polissomias. Não houve perda de cromossomos na amostra analisada.

4 RESULTADOS

4.1 DESCRIÇÃO DA CASUÍSTICA

Dentre as 290 pacientes tratadas no Hospital do Câncer A.C. Camargo com diagnóstico de neoplasia endometrial, inicialmente 57 foram excluídas do estudo devido a não localização do bloco de parafina do caso selecionado, apresentar outros tipos histológicos que não o endometrióide, ou ausência de representação de tumor nos blocos de parafina.

Dos 233 casos selecionados para confecção do TMA, 16 casos foram excluídos por não apresentarem tecido neoplásico no TMA. Dessa forma, foram elegíveis para o estudo 217 mulheres com diagnóstico de neoplasia endometrial do tipo endometrióide.

4.1.1 Dados Demográficos, Clínicos e Cirúrgicos

As características demográficas e clínicas das pacientes com câncer de endométrio estão descritas na Tabela 4. A média de idade das pacientes ao diagnóstico foi 63 anos, variando de 25 a 90 anos. O principal sintoma foi o sangramento vaginal (73,3%), e os métodos diagnósticos mais utilizados foram: curetagem uterina (46,5%) e a histeroscopia (30,9%). A primeira cirurgia foi realizada no Hospital A.C. Camargo em 94,9% dos casos, enquanto que 5,1% realizaram a primeira cirurgia em outra instituição.

Os procedimentos cirúrgicos realizados foram: histerectomia total com salpingooforectomia bilateral (24,4%), histerectomia total com salpingooforectomia bilateral e linfadenectomia pélvica (44,2%); histerectomia total com salpingooforectomia bilateral e linfadenectomia pélvica e paraaórtica (31,4%).

Nas pacientes com doença avançada, os achados intra-operatórios foram: 07 (3,3%) pacientes apresentavam ascite, 05 (2,4%) apresentavam sinais de carcinomatose peritoneal e 41 (19,3%) apresentavam linfonodomegalias palpáveis no ato cirúrgico (Tabela 5).

Com relação à dissecação linfonodal no ato cirúrgico, das pacientes que foram submetidas à linfadenectomia pélvica, 9,5% apresentaram comprometimento linfonodal, e dentre as pacientes que foram submetidas à linfadenectomia pélvica e paraaórtica, 12,5% apresentaram comprometimento linfonodal.

As modalidades de tratamento adjuvante mais utilizadas foram a radioterapia externa (45,8%) e a braquiterapia (61,9%) (Tabela 6).

Tabela 4 - Características demográficas e clínicas dos pacientes com adenocarcinoma do endométrio tipo I (Hospital A.C. Camargo, 1990-2008).

Variável	Categoria	n	(%)
Idade	< 65 anos	113	(52,1)
	≥ 65 anos	104	(47,9)
Menopausa	Sim	206	(96,3)
	Não	8	(3,7)
IMC	< 30	105	(57,4)
	≥ 30	78	(42,6)
Terapia Hormonal	Sim	30	(21,7)
	Não	108	(78,3)
Raça	Branca	193	(88,9)
	Negra	2	(0,9)
	Parda	3	(1,4)
	Amarela	19	(8,8)

Tabela 5 - Características dos achados intra-operatórios das pacientes com adenocarcinoma endometrióide de endométrio. (Hospital A.C. Camargo, 1990-2008).

Variável	Categoria	n	(%)
Ascite	Sim	7	(3,3)
	Não	204	(96,7)
Carcinomatose	Sim	5	(2,4)
	Não	206	(97,6)
Linfadenomegalia	Sim	41	(19,3)
	Não	171	(80,7)
Aderência tumoral	Sim	9	(4,3)
	Não	202	(95,7)

Tabela 6 - Tratamento adjuvante realizado. (Hospital A.C. Camargo, 1990-2008).

Variável	Categoria	n	(%)
Radioterapia Externa	Sim	99	(45,8)
	Não	117	(54,2)
Braquiterapia	Sim	133	(61,9)
	Não	82	(38,1)
Quimioterapia	Sim	14	(6,5)
	Não	202	(93,5)

Os dados anatomopatológicos das pacientes tratadas no Hospital A.C. Camargo podem ser vistos na Tabela 7, e a Tabela 8 mostra a distribuição das pacientes em relação ao estágio da FIGO 2009.

Tabela 7 - Características anatomo-patológicas das pacientes com adenocarcinoma endometrióide do endométrio. (Hospital A.C. Camargo, 1990-2008).

Variáveis	Categorias	n	(%)
Tamanho	< 2 cm	36	(22,2)
	≥ 2 cm	126	(77,8)
Localização	Fundo	13	(6)
	Corpo	123	(56,7)
	Fundo-Corpo	38	(17,5)
	Fundo-Corpo-Cérvice	1	(0,5)
	Corpo-Cérvice	39	(18)
Embolização Linfática	Ausente	181	(85,4)
	Presente	31	(14,6)
Embolização Sanguínea	Ausente	196	(92,5)
	Presente	16	(7,5)
Invasão Perineural	Ausente	204	(98,1)
	Presente	4	(1,9)
Grau Arquitetural	G1	100	(47,2)
	G2	85	(40,1)
	G3	27	(12,7)
Grau Nuclear	G1	35	(16,8)
	G2	120	(57,7)
	G3	53	(25,5)
Grau FIGO	G1+G2	160	(75,5)
	G3	52	(24,5)
Invasão do Miométrio	< 50%	125	(58,7)
	≥ 50%	88	(41,3)
Paramétrio	Não Comprometido	202	(95,3)
	Comprometido	10	(4,7)
Istmo	Não Comprometido	148	(75,5)
	Comprometido	48	(24,5)
Anexos	Não Comprometido	204	(94,9)
	Comprometido	11	(5,1)
Status Linfonodal	Não Comprometido	143	(88,3)
	Comprometido	19	(11,7)
Citologia Peritoneal	Negativa	141	(87)
	Positiva	21	(13)

Tabela 8 - Distribuição dos 217 pacientes com adenocarcinoma endometrióide de endométrio de acordo com o estadiamento FIGO 2009. (Hospital A.C. Camargo, 1990-2008).

Estadiamento FIGO 2009 (*)	n	(%)
Ia	119	(55,3)
Ib	48	(22,3)
II	8	(3,7)
IIIa	8	(3,7)
IIIb	6	(2,8)
IIIc1	8	(3,7)
IIIc2	7	(3,3)
IVa	3	(1,4)
IVb	8	(3,7)

(*) 2 casos não foram elegíveis para o estadiamento.

4.1.2 Dados de Seguimento

O status do seguimento das 217 pacientes com câncer do endométrio pode ser visto na Tabela 9, sendo que 162 (74,7%) estão vivas sem sinais de recidiva da doença. Ocorreu morte por câncer em 30 (13,8%) casos, e 4 pacientes perderam o seguimento.

Nesta casuística houve 45 casos de recidiva de doença, sendo 17 (37,8%) recidivas locais, 26 (57,8%) recidivas à distância, e 2 (4,4%) casos com recidivas pélvica e a distância.

A taxa de sobrevida global aos 5 anos para as mulheres portadoras de adenocarcinoma endometrióide foi 81,1% (Figura 2). A taxa de sobrevida câncer específica aos 5 anos foi 86,4% (Figura 3). A taxa de sobrevida livre de doença aos 5 anos foi 80,3% (Figura 4).

Tabela 9 - Status da paciente ao final do seguimento. (Hospital A.C. Camargo, 1990-2008).

Categoria	n	(%)
Vivo sem câncer	162	(74,7)
Vivo com câncer	3	(1,4)
Morte pelo tratamento	3	(1,4)
Morte pela doença	30	(13,8)
Morte por outras causas	15	(6,9)
Perdido de Vista	4	(1,8)
Total	217	(100)

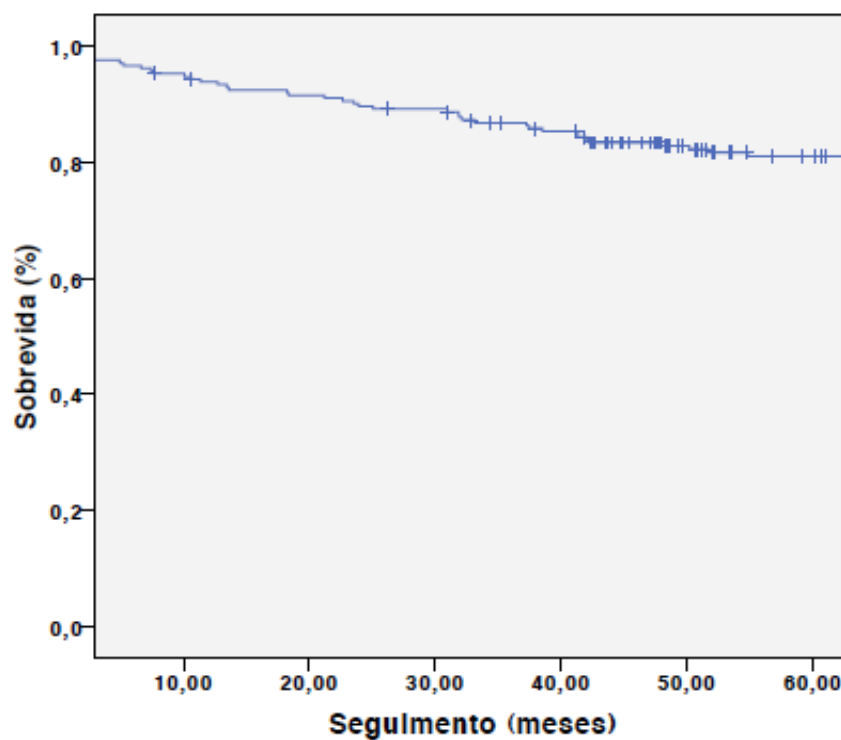


Figura 2 - Curva de sobrevivência global das pacientes portadoras de adenocarcinoma endometrióide (Hospital A.C. Camargo, 1990-2005).

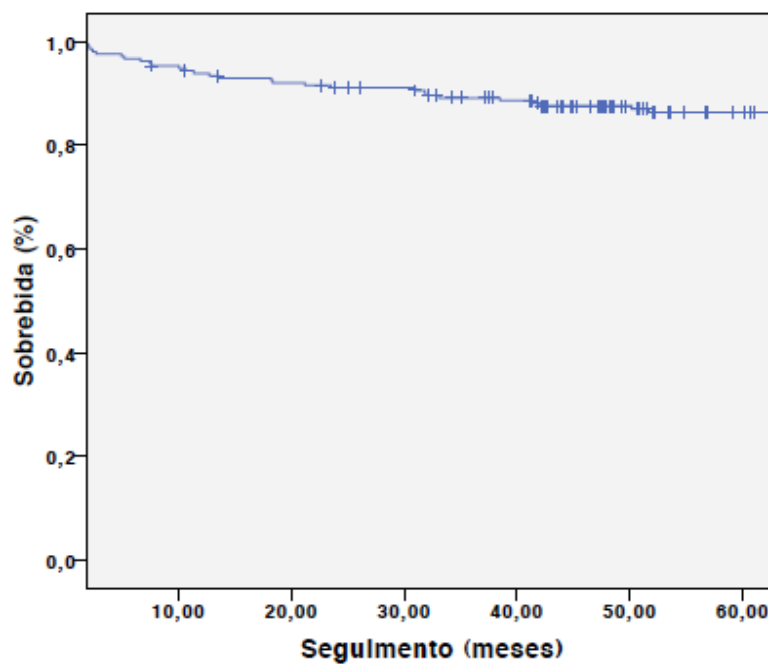


Figura 3 - Curva de sobrevida câncer específica das pacientes portadoras de adenocarcinoma endometrióide (Hospital A.C. Camargo, 1990-2005).

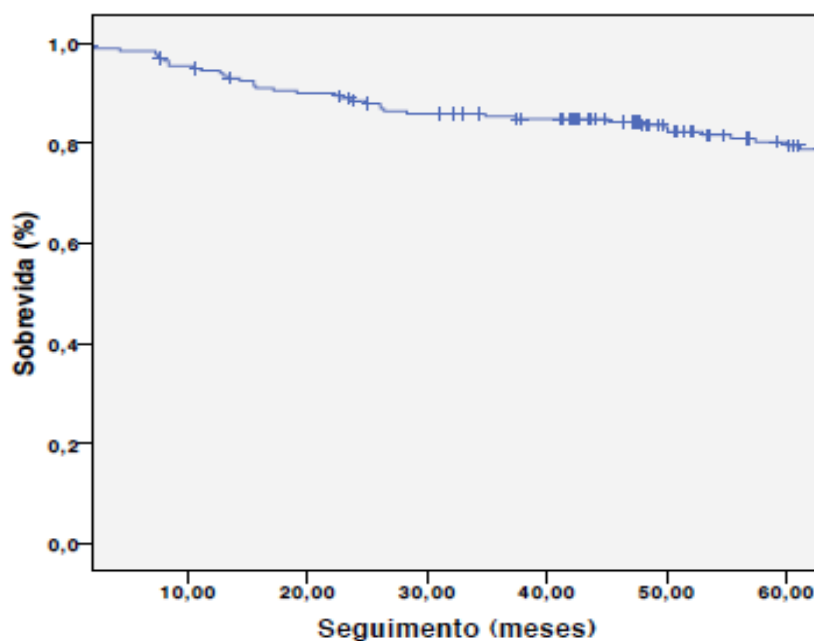


Figura 4 - Curva de sobrevida livre de doença das pacientes portadoras de adenocarcinoma endometrióide (Hospital A.C. Camargo, 1990-2005).

4.2 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA E DO NÚMERO DE CÓPIAS DOS GENES DOS RECEPTORES DA FAMÍLIA EGF

A frequência de expressão imunoistoquímica dos receptores da família EGF pode ser verificada na Tabela 10, e na Figura 5 podemos verificar os padrões de marcação dos anticorpos analisados.

Com relação à expressão imunoistoquímica de EGFR, das 217 pacientes analisadas, ocorreu expressão positiva da proteína em 2 (0,9%) casos. Quanto à expressão de HER-2, 214 pacientes (98,6%) apresentavam tumores com expressão negativa, enquanto que apenas 3 (1,4%) apresentavam expressão positiva de HER-2. A expressão de HER-3 foi verificada no núcleo e no citoplasma de formas distintas. Sua expressão foi agrupada para a análise estatística, conforme já mencionado. A expressão de HER-3 no citoplasma ocorreu da seguinte maneira: negativa em 72 pacientes (39,8%), e positiva em 109 pacientes (60,2%). A expressão do HER-3 no núcleo ocorreu seguinte forma: 113 (62,8%) pacientes com expressão negativa, e 67 (37,2%) pacientes expressão positiva. A expressão da proteína HER-4 foi negativa em 179 pacientes (93,7%), e positiva em 12 pacientes (6,3%).

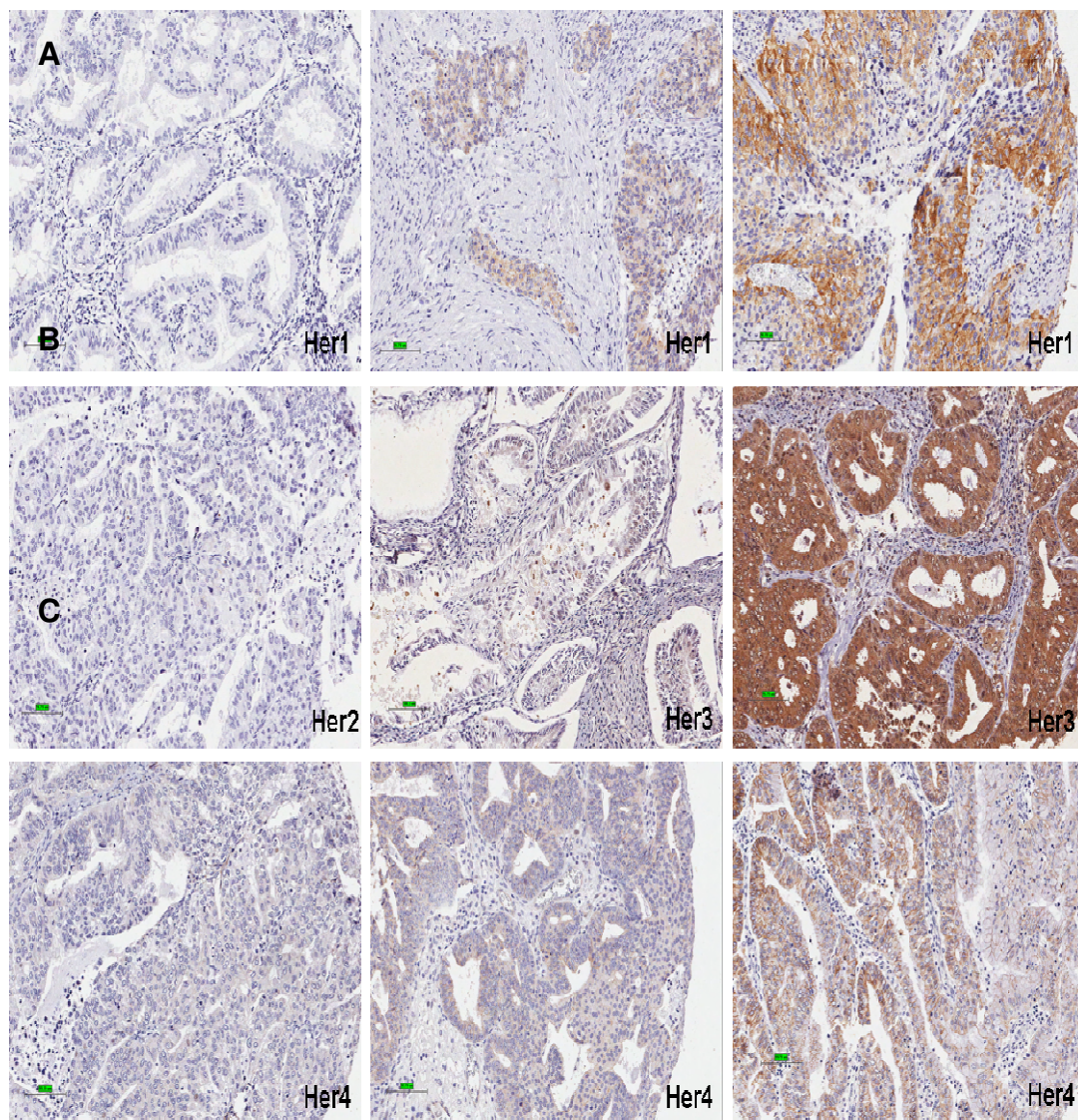


Figura 5 - Fotomicrografias ilustrando as reações imunoistoquímicas para os marcadores pesquisados. Acima (A), marcações negativas, positiva fraca (1+) e positiva moderada (2+) para HER-1. Ao meio (B), expressão negativa de HER-2 e HER-3 com positividade nuclear e positividade forte citoplasmática para HER-3, respectivamente. Abaixo (C) exemplos de marcação negativa, positiva fraca e positiva moderada para HER-4.

Tabela 10 - Frequências das expressões imunoistoquímicas de EGFR, HER-2, HER-3 e HER-4 (Hospital A.C. Camargo, 1990-2008).

Variável	Categoria	n	(%)
EGFR	Negativa	215	(99,1)
	Positiva	2	(0,9)
	Total	217	(100)
HER-2	Negativa	214	(98,6)
	Positiva	3	(1,4)
	Total	217	(100)
HER-3 citoplasma	Negativa	72	(39,8)
	Positiva	109	(60,2)
	Total	181	(100)
HER-3 nuclear	Negativa	113	(62,8)
	Positiva	67	(37,2)
	Total	180	(100)
HER-4	Negativa	179	(93,7)
	Positiva	12	(6,3)
	Total	191	(100)

A frequência de coexpressão dos receptores pode ser verificada na Tabela 10. Não ocorreu coexpressão de EGFR e HER-2, EGFR e HER-4, e entre HER-2 e HER-4. As coexpressões de EGFR e HER-3 citoplasmático, e EGFR e HER-3 nuclear ocorreram em 1 (0,6%) caso cada. As coexpressões de HER-2 e HER-3 citoplasmático e HER-3 nuclear foram encontradas em 2 (1,1%) casos cada. A coexpressão de HER-3 citoplasmático e HER-4 foi de 5 (2,8%) casos, e a de HER-3 nuclear e HER-4 foi de 4 (2,2%) casos.

Tabela 11 - Associação entre as expressões imunohistoquímicas de EGFR, HER-2, HER-3 e HER-4.

Expressão Imunohistoquímica		EGFR		HER-2		HER-4	
		Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
HER-2	Negativo	212 (97,7%)	2 (0,9%)				
	Positivo	3 (1,4%)	0 (0%)				
HER-3 citoplasma	Negativo	71 (39,2%)	1 (0,6%)	71 (39,2%)	1 (0,6%)	65 (36,3%)	5 (2,8%)
	Positivo	108 (59,7%)	1 (0,6%)	107 (59,1%)	2 (1,1%)	104 (58,1%)	5 (2,8%)
HER-3 núcleo	Negativo	112 (62,2%)	1 (0,6%)	112 (62,2%)	1 (0,6%)	106 (59,2%)	6 (3,4%)
	Positivo	66 (36,7%)	1 (0,6%)	65 (36,1%)	2 (1,1%)	63 (35,2%)	4 (2,2%)
HER-4	Negativo	177 (92,7%)	2 (1,0%)	176 (92,1%)	3 (1,6%)		
	Positivo	12 (6,3%)	0 (0%)	12 (6,3%)	0 (0%)		

Na Tabela 12 podemos verificar as alterações dos genes dos receptores da família EGF, levando em consideração a presença de alterações como a amplificação do gene, e o ganho de cromossomos (trissomias ou polissomias).

A alteração do número de cópias dos genes dos receptores da família EGF pode ser vista na Tabela 13. O número de cópias do gene do *EGFR* foi normal em 160 pacientes (87,4%) e alterado em 23 (12,6%). Para o gene *HER-2*, o número de cópias foi normal em 182 (92,4%) pacientes e alterada em 15 (7,6%). O status do gene *HER-3* foi normal em 167 (89,3%), e alterado em 20 (10,7%). Para o gene *HER-4*, o número de cópias foi normal em 163 (97%) pacientes, e alterada em 5 (3%). (Figura 6).

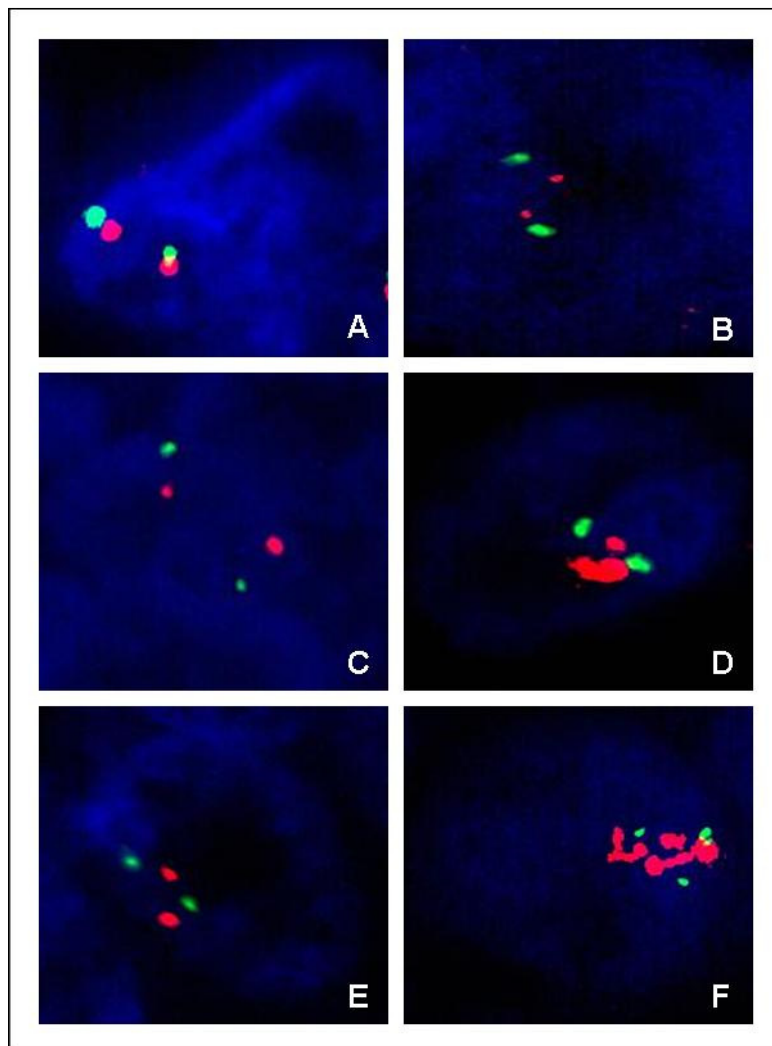


Figura 6 - Fotomicrografia ilustrando os genes pesquisados. Em A, *EGFR* sem amplificação. O sinal verde representa o centrômero do cromossomo 7 e em vermelho e gene *EGFR*. Em B, Gene *Her3* sem amplificação. O sinal verde representa o centrômero do cromossomo 12 e em vermelho e gene *Her3*. Em C e D, caso normal e amplificado para *HER-2*. O sinal verde representa o centrômero do cromossomo 17 e em vermelho o gene *HER-2*. Em E e F reações normais e amplificada para o gene *HER-4*. Em verde o centrômero do cromossomo 2 e em vermelho o gene *HER-4*.

Tabela 12 - Frequências das alterações dos genes dos receptores *EGFR*, *HER-2*, *HER-3* e *HER-4* – teste de FISH.

Variável	Categoria	n	(%)
<i>EGFR</i>	Não amplificado	160	(87,4)
	Trissomia	17	(9,3)
	Polissomia	6	(3,3)
	Amplificado	0	(0)
	Total	183	(100)
<i>HER-2</i>	Não amplificado	182	(92,4)
	Trissomia	8	(4,1)
	Polissomia	2	(1,0)
	Amplificado	5	(2,5)
	Total	197	(100)
<i>HER-3</i>	Não amplificado	167	(89,3)
	Trissomia	13	(7,0)
	Polissomia	6	(3,2)
	Amplificado	1	(0,5)
	Total	187	(100)
<i>HER-4</i>	Não amplificado	163	(97,0)
	Trissomia	3	(1,8)
	Polissomia	1	(0,6)
	Amplificado	1	(0,6)
	Total	168	(100)

Tabela 13 - Frequências de alterações do número de cópias dos genes dos receptores *EGFR*, *HER-2*, *HER-3* e *HER-4* – teste de FISH.

Variável	Categoria	n	(%)
<i>EGFR</i>	Normal	160	(87,4)
	Alterada	23	(12,6)
	Total	183	(100)
<i>HER-2</i>	Normal	182	(92,4)
	Alterada	15	(7,6)
	Total	197	(100)
<i>HER-3</i>	Normal	167	(89,3)
	Alterada	20	(10,7)
	Total	187	(100)
<i>HER-4</i>	Normal	163	(97,0)
	Alterada	5	(3,0)
	Total	168	(100)

4.3 TESTES DE ASSOCIAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS CLÍNICO-PATOLÓGICAS, A EXPRESSÃO IMUNISTOQUÍMICA E O NÚMERO DE CÓPIAS DOS GENES DOS RECEPTORES DA FAMÍLIA EGF

As variáveis clínico-patológicas testadas foram: IMC, idade, estágio da FIGO, grau histológico da FIGO, status linfonodal, invasão vascular sanguínea, invasão vascular linfática, invasão perineural, tamanho do tumor, citologia peritoneal e invasão miometrial.

Quando foi analisado o status linfonodal com as outras variáveis, houve associação desta com invasão miometrial, citologia peritoneal, invasão vascular sanguínea e invasão vascular linfática.

A variável invasão vascular linfática apresentou associação com idade, tamanho do tumor, citologia, grau histológico da FIGO, invasão miometrial, invasão vascular sanguínea e estágio da FIGO.

Para as análises entre a expressão imunoistoquímica dos receptores com as variáveis clínico-patológicas, o estadiamento da FIGO 2009 foi agrupado em duas categorias: estádios I + II e estádios III + IV.

As variáveis de expressão imunoistoquímica dos receptores foram correlacionadas com as variáveis clínico-patológicas: idade, IMC, estágio da FIGO, grau histológico da FIGO, invasão miometrial, tamanho do tumor, invasão vascular sanguínea, invasão vascular linfática e invasão perineural. Ocorreu associação estatisticamente significativa somente entre a expressão imunoistoquímica de EGFR e invasão perineural ($p=0,038$).

As mesmas variáveis clínico-patológicas foram correlacionadas com o número de cópias dos genes dos receptores da família EGF. Ocorreu associação estatisticamente significativa entre o teste de FISH para HER-2 e invasão miometrial, e invasão vascular sanguínea (Tabela 14). Houve ainda associação estatisticamente significativa entre o teste de FISH para HER-3 e as variáveis IMC, invasão vascular linfática e tamanho do tumor (Tabela 15).

Foram realizadas análises de associação entre alteração do número de cópias do gene e a expressão imunoistoquímica dos receptores da família EGFR, e a única associação positiva encontrada foi entre a presença de alteração do gene *HER-2* e expressão da proteína HER-2 aumentada (Tabela 16).

Tabela 14 - Associação entre as variáveis clínico-patológicas e alteração do número de cópias de *HER-2*.

Variável	Categoria	FISH <i>HER-2</i>		p
		Normal	Alterado	
Idade	< 65 anos	98	6	0,302
	≥ 65 anos	84	9	
IMC	< 30	89	8	0,716
	≥ 30	69	5	
Estádio FIGO	I + II	148	11	0,485
	III + IV	32	4	
Status Linfonodal	Positivo	123	9	0,623
	Negativo	16	2	
Grau FIGO	I + II	135	10	0,749
	III	43	4	
IVS	Ausente	167	11	0,020
	Presente	11	5	
IVL	Ausente	153	10	0,062
	Presente	25	5	
IPN	Ausente	171	14	0,284
	Presente	3	1	
Invasão Miométrio	< 50%	108	4	0,026
	≥ 50%	72	10	
Citologia	Positiva	118	11	1,000
	Negativa	18	1	
Tamanho	< 2cm	30	0	0,075
	≥ 2cm	101	14	

Tabela 15 - Associação entre as variáveis clínico-patológicas e alteração do número de cópias de *HER-3*.

Variável	Categoria	FISH <i>HER-3</i>		
		Normal	Alterado	p
Idade	< 65 anos	93	9	0,364
	≥ 65 anos	74	11	
IMC	< 30	74	16	0,003
	≥ 30	70	2	
Estádio FIGO	I + II	134	15	0,550
	III + IV	31	5	
Status Linfonodal	Positivo	113	13	0,241
	Negativo	15	4	
Grau FIGO	I + II	122	16	0,571
	III	41	3	
IVS	Ausente	151	16	0,221
	Presente	13	3	
IVL	Ausente	142	12	0,016
	Presente	22	7	
IPN	Ausente	158	18	0,362
	Presente	3	1	
Invasão Miometrial	< 50%	97	9	0,340
	≥ 50%	68	10	
Citologia	Positiva	108	14	0,695
	Negativa	19	1	
Tamanho	< 2cm	27	0	0,041
	≥ 2cm	93	16	

Tabela 16 - Associação entre alteração do número de cópias do gene *EGFR* e expressão imunoistoquímica para EGFR.

Variável	Categoria	FISH <i>EGFR</i>		p
		Normal	Alterado	
Expressão EGFR	Negativa	158 (86,3%)	23 (12,6%)	0,590
	Positiva	2 (1,1%)	0 (0%)	

Tabela 17 - Associação entre alteração do número de cópias do gene *HER-2* e expressão imunoistoquímica para HER-2.

Variável	Categoria	FISH <i>HER-2</i>		p
		Normal	Alterado	
Expressão HER-2	Negativa	181 (91,9%)	13 (6,6%)	0,016
	Positiva	1 (0,5%)	2(1%)	

Tabela 18 - Associação entre alteração do número de cópias do gene *HER-3* e expressão imunoistoquímica para HER-3 no citoplasma.

Variável	Categoria	FISH <i>HER-3</i>		p
		Normal	Alterado	
Expressão HER-3	Negativa	57 (33,9%)	8 (4,8%)	0,898
Citoplasma	Positiva	91 (54,2%)	12 (7,1%)	

Tabela 19 - Associação entre alteração do número de cópias do gene *HER-3* e expressão imunoistoquímica para HER-3 no núcleo.

Variável	Categoria	FISH <i>HER-3</i>		p
		Normal	Alterado	
Expressão HER-3	Negativa	95 (56,5%)	12 (7,1%)	0,805
Núcleo	Positiva	53 (31,5%)	8 (4,8%)	

Tabela 20 - Associação entre alteração do número de cópias do gene *HER-4* e expressão imunohistoquímica para HER-4.

Variável	Categoria	FISH <i>HER-4</i>		p
		Normal	Alterado	
Expressão HER-4	Negativa	132 (89,2%)	5 (3,4%)	0,519
	Positiva	11 (7,4%)	0 (0%)	

4.4 ASSOCIAÇÃO ENTRE SOBREVIDA E AS VARIÁVEIS CLÍNICO-PATOLÓGICAS

As taxas de sobrevida global, sobrevida câncer-específica e sobrevida livre de doença em função do estágio FIGO estão descritas na Tabela 13.

As variáveis clínico-patológicas com impacto na sobrevida global foram: idade maior que 65 anos, presença de metástase linfonodal, grau histológico III da FIGO, presença de embolização sanguínea, presença de embolização linfática, invasão miometrial maior ou igual a 50% e citologia peritoneal positiva (Tabela 14).

As variáveis clínico-patológicas com impacto na sobrevida câncer-específica, após a análise univariada, estão expostas na Tabela 15, e foram as mesmas da sobrevida global.

Com relação à sobrevida livre de doença, na análise estatística univariada, as variáveis idade e IMC não tiveram significância estatística. As variáveis presença de comprometimento linfonodal, grau histológico III da FIGO, presença embolização vascular sanguínea, presença de embolização vascular linfática, invasão miometrial maior ou igual 50% e citologia

peritoneal positiva, e tamanho do tumor maior que 2cm tiveram impacto negativo na sobrevida livre de doença (Tabela 16).

Tabela 21 - Taxas de sobrevida global (SG), Sobrevida câncer-específica (SCE) e Sobrevida livre de doença (SLD), em 5 anos, em função do estágio da FIGO 2009. (Hospital A.C. Camargo, 1990-2008)

Estadio	SG (%)	p	SCE (%)	p	SLD (%)	p
I	89,3	0,001	94,2	0,001	84,9	0,001
II	75,0		87,5		75	
III	62,8		71,7		62,7	
IV	0		0		0	

Tabela 22 - Taxas de sobrevida global (SG) em função das variáveis clínico-patológicas – Análise univariada. (Hospital A.C. Camargo, 1990-2008)

Variável	Categoria	SG (%) em 5 anos	p
Idade	< 65 anos	86,8	0,001
	≥ 65 anos	74,7	
IMC	< 30	77	0,279
	≥ 30	84,1	
Status Linfonodal	Positivo	48,1	0,001
	Negativo	85,9	
Grau Histológico FIGO	I + II	85,1	0,003
	III	69,2	
IVS	Ausente	84,2	0,001
	Presente	50,0	
IVL	Ausente	86,9	0,001
	Presente	50,5	
IPN	Ausente	81	0,407
	Presente	100	
Invasão miometrial	< 50%	90,8	0,001
	≥ 50%	68,9	
Citologia peritoneal	Positiva	52,4	0,001
	Negativa	87,2	
Tamanho	< 2cm	88,3	0,069
	≥ 2cm	76,1	

Tabela 23 - Taxas de sobrevida câncer específica (SCE) em função das variáveis clínico-patológicas – Análise univariada. (Hospital A.C. Camargo, 1990-2008)

Variável	Categoria	SCE (%) em 5 anos	p
Idade	< 65 anos	91,7	0,003
	≥ 65 anos	80,4	
IMC	< 30	83,2	0,253
	≥ 30	88	
Status Linfonodal	Positivo	67,7	0,004
	Negativo	89,3	
Grau Histológico FIGO	I + II	91,1	0,001
	III	73	
IVS	Ausente	91,5	0,001
	Presente	50,0	
IVL	Ausente	93,3	0,001
	Presente	50,5	
IPN	Ausente	86,6	0,486
	Presente	100	
Invasão miometrial	< 50%	94	0,001
	≥ 50%	77,3	
Citologia peritoneal	Positiva	55,9	0,001
	Negativa	92,5	
Tamanho	< 2cm	94,1	0,086
	≥ 2cm	82,4	

Tabela 24 - Taxas de sobrevida livre de doença (SLD) em função das variáveis clínico-patológicas – Análise univariada. (Hospital A.C. Camargo, 1990-2008)

Variável	Categoria	SLD (%) em 5 anos	p
Idade	< 65 anos	81,7	0,202
	≥ 65 anos	78,5	
IMC	< 30	77,2	0,875
	≥ 30	82,9	
Status Linfonodal	Positivo	49,4	0,001
	Negativo	81,9	
Grau Histológico FIGO	I + II	85,4	0,010
	III	61,5	
IVS	Ausente	82,1	0,013
	Presente	54,5	
IVL	Ausente	83,8	0,001
	Presente	56,	
IPN	Ausente	80,9	0,008
	Presente	33,3	
Invasão miometrial	< 50%	87,3	0,006
	≥ 50%	70,2	
Citologia peritoneal	Positiva	63,8	0,052
	Negativa	84	
Tamanho	< 2cm	97	0,02
	≥ 2cm	76,4	

4.5 ASSOCIAÇÃO ENTRE EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA, NÚMERO DE CÓPIAS DOS GENES DOS RECEPTORES DA FAMÍLIA EGF E SOBREVIDA

Quanto aos receptores da família EGF, a expressão de EGFR teve impacto negativo na sobrevida livre de doença ($p=0,001$). Quando a expressão de EGFR foi negativa, a sobrevida livre de doença foi 81,1%. No caso da expressão positiva, nenhum paciente esteve livre de doença aos 5

anos de seguimento. Foi encontrada uma melhor sobrevida global em 5 anos para o grupo de pacientes com expressão positiva de HER-3 no citoplasma, porém não houve associação estatisticamente significativa ($p = 0,092$) (Figura 7). Não houve associação entre a expressão imunohistoquímica entre os receptores HER-2 e HER-4 com sobrevida global, câncer-específica ou sobrevida livre de doença (Tabela 17).

Tabela 25 - Taxas de sobrevida global (SG), câncer-específica (SCE), e sobrevida livre de doença (SLD), em 5 anos, em função das expressões imunohistoquímicas do EGFR, HER-2, HER-3 e HER-4 – Análise univariada. (Hospital A.C. Camargo, 1990-2008)

Variável	Expressão	SG(%)	p	SCE(%)	p	SLD(%)	p
EGFR	Negativa	81,4	0,104	86,8	0,069	81,1	0,001
	Positiva	0,0		0,0		0,0	
HER-2	Negativa	81,3	0,459	86,2	0,543	80,7	0,440
	Positiva	66,7		100		66,7	
HER-3 Citoplasma	Negativa	75,3	0,092	82,5	0,274	79,7	0,831
	Positiva	84,7		88,3		77,6	
HER-3 Núcleo	Negativa	79,7	0,698	85,0	0,808	79,3	0,814
	Positiva	82,8		87,2		75,4	
HER-4	Negativa	80,1	0,291	85,9	0,533	78	0,277
	Positiva	91,7		91,7		91,7	

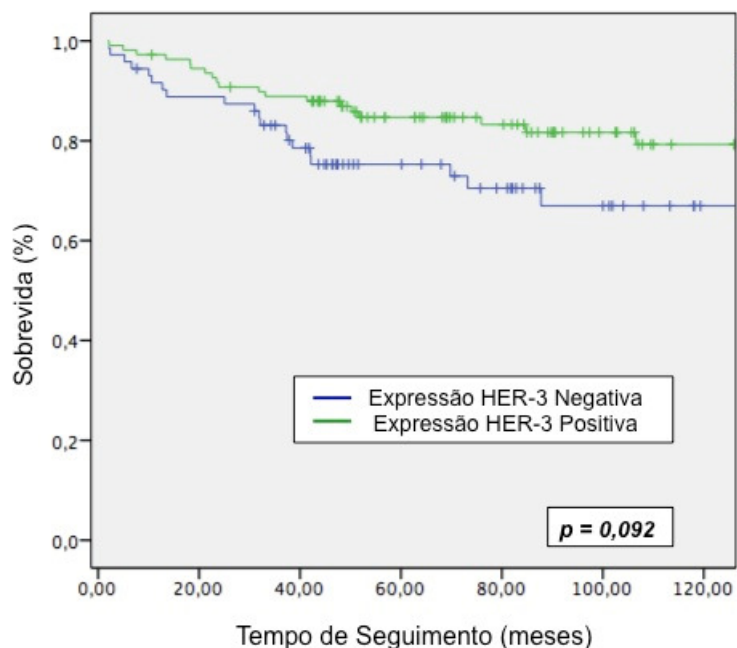


Figura 7 - Sobrevida global em função de expressão imunoistoquímica de HER-3.

O número de cópias dos genes dos receptores da família EGF verificada pelo FISH e classificada como normal ou alterada, não apresentou associação estatisticamente significativa com sobrevida global, câncer-específica, ou sobrevida livre doença (Tabela 26). O grupo de pacientes com o teste de FISH de HER-2 alterado apresentou pior sobrevida livre de doença em 5 anos (60,2% versus 82,2%), porém não houve diferença estatisticamente significativa (Figura 8).

Tabela 26 - Taxas de sobrevida global (SG), câncer-específica (SCE), e sobrevida livre de doença (SLD), em 5 anos, em função de alteração do número de cópias dos genes de *EGFR*, *HER-2*, *HER-3* e *HER-4* analisados pelo teste de FISH – Análise univariada. (Hospital A.C. Camargo, 1990-2008).

Variável	Expressão	SG(%)	p	SCE(%)	p	SLD(%)	p
<i>EGFR</i>	Negativa	81,8	0,933	86,9	0,750	83,1	0,188
	Positiva	76		80		64,5	
<i>HER-2</i>	Negativa	82,4	0,200	87,7	0,435	82,2	0,066
	Positiva	66,7		80		60,6	
<i>HER-3</i>	Negativa	80,8	0,753	86,5	0,538	82	0,227
	Positiva	79,3		84		66	
<i>HER-4</i>	Negativa	81,1	0,291	87,1	0,388	79,3	0,314
	Positiva	100		100		60	

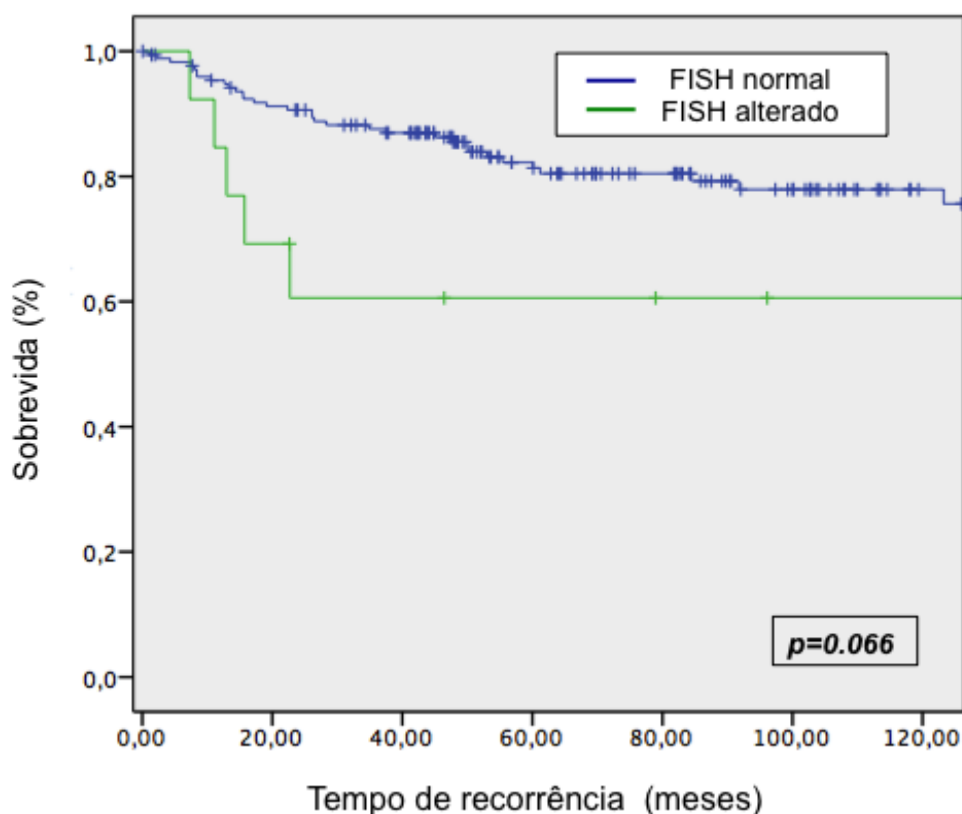


Figura 8 - Sobrevida livre de doença em função da alteração do número de cópias de *HER-2*.

4.6 ANÁLISE MULTIVARIADA

Após a análise multivariada, os fatores independentes para risco de óbito foram: idade maior que 65 anos, presença de invasão miometrial maior que 50%, e presença de comprometimento linfonodal (Tabela 21).

Os fatores associados ao risco de óbito por câncer foram: idade acima de 65 anos e presença de invasão vascular linfática (Tabela 22). No caso do risco de recidiva, foram fatores independentes: a presença de comprometimento linfonodal, grau histológico III da FIGO e presença de alteração do FISH para HER-2 (Tabela 23).

Tabela 27 - Associação entre as variáveis clínico-patológicas e o risco de óbito – Análise multivariada.

Variável	RR	IC 95%	<i>p</i>
Idade ≥ 65 anos	2,74	1,28 – 5,89	0,009
Invasão miometrial > 50%	2,48	1,14 – 5,39	0,022
Comprometimento linfonodal	2,49	1,23 – 7,06	0,015

Risco estimado do modelo de regressão Cox; RR: Risco relativo; IC: Intervalo de confiança. Ajustado para índice de massa corpórea, grau 3, invasão vascular sanguínea, invasão vascular linfática, tamanho do tumor > 2cm, expressão de HER3 e FISH do HER2.

Tabela 28 - Associação entre as variáveis clínico-patológicas e o risco de óbito por câncer – Análise multivariada.

Variável	RR	IC 95%	<i>p</i>
Idade ≥ 65 anos	2,66	1,17 – 6,07	0,019
Invasão vascular linfática presente	6,79	3,29 – 14,0	<0,001

Risco estimado do modelo de regressão Cox; RR: Risco relativo; IC: Intervalo de confiança. Ajustado para índice de massa corpórea, grau 3, invasão vascular sanguínea, invasão miometrial > 50%, tamanho do tumor > 2cm, expressão de HER3 e comprometimento linfonodal.

Tabela 29 - Associação entre as variáveis clínico-patológicas e o risco de recidiva – Análise multivariada.

Variável	RR	IC 95%	<i>p</i>
Comprometimento linfonodal	4,90	2,17 – 11,0	<0.001
Grau 3 FIGO	2,93	1,35 – 6,34	0.006
FISH <i>HER-2</i> alterado	7,04	2,52 – 19,6	<0.001

Risco estimado do modelo de regressão Cox; RR: Risco relativo; IC: Intervalo de confiança. Ajustado para idade, índice de massa corpórea, invasão vascular sanguínea, invasão vascular linfática, invasão perineural, invasão miometrial > 50% e tamanho do tumor > 2cm.

5 DISCUSSÃO

O câncer é uma doença multifatorial e multifacetada, e nos últimos 20 anos houve uma grande progressão no entendimento da doença, com o palco principal de atuação voltando-se para os mecanismos moleculares da carcinogênese e as vias que levam ao desenvolvimento e progressão da doença. Há um crescente interesse em novas estratégias para o tratamento do câncer, principalmente em estádios avançados, devido ao surgimento das terapias alvo moleculares.

As vias relacionadas à ativação dos receptores de fatores de crescimento estão entre as mais estudadas atualmente. Através da ativação desses receptores, a célula pode controlar mecanismos essenciais para a carcinogênese, que incluem morte, proliferação, angiogênese e adesão celular. Portanto, constituem alvos interessantes e facilmente atingíveis para novas drogas molécula-alvo. É neste contexto que procuramos colaborar com esse trabalho.

Consideramos a casuísta deste trabalho expressiva quando correlacionamos com o visto na literatura, principalmente porque é constituída somente com neoplasias do endométrio tipo I. Além disso, os prontuários da instituição nos permitem acesso à maioria dos dados coletados e o período de seguimento é confiável. É importante também ressaltar que houve disponibilidade da maior parte desse material para as análises patológicas em questão.

Nossa casuística mostrou números compatíveis com literatura no que diz respeito à frequência dos fatores demográficos, e também dos fatores clínico-patológicos. Nas análises de associação univariada, os fatores analisados também mostraram congruência com a literatura.

Em nossa casuística as taxas de sobrevida global, sobrevida câncer-específica e sobrevida livre de doença foram de 81,1%, 86,4% e 80,3% em 5 anos, respectivamente. Tal fato corrobora o bom prognóstico global dos tumores de endométrio do tipo I.

As sobrevidas estratificadas por estádios (I, II, III e IV) podem ser vistas na Tabela 12.

O fator de prognóstico mais importante para câncer do endométrio é a presença de comprometimento linfonodal. Em nossa casuística esse fator também se correlacionou com pior sobrevida, tanto na análise univariada (SG, SCE e SLD), quanto na análise multivariada (SG e SLD).

As outras variáveis clínico-patológicas citadas em literatura como tendo impacto na sobrevida, também mantiveram em nossa casuística a associação com a sobrevida (CREASMAN et al. 1987; MORROW et al. 1991). Para a sobrevida global e câncer-específica, na análise univariada, as variáveis foram: idade maior que 65 anos, presença de comprometimento linfonodal, grau histológico da FIGO, presença de invasão vascular linfática, presença de invasão vascular sanguínea presença de invasão do miométrio $\geq 50\%$, e citologia peritoneal positiva. Para sobrevida livre de doença, na análise univariada, foram: presença de comprometimento linfonodal, grau histológico da FIGO, presença de invasão vascular linfática, presença de

invasão vascular sanguínea, presença de invasão perineural, presença de invasão do miométrio $\geq 50\%$, citologia peritoneal positiva e tamanho do tumor $\geq 2\text{cm}$.

Os fatores de risco independentes na análise multivariada foram: 1) idade ≥ 65 anos aumentando o risco relativo de óbito e óbito por câncer em 2,74 e 2,66, respectivamente; 2) presença de invasão do miométrio $\geq 50\%$, com risco relativo de óbito de 2,48; 3) presença de invasão vascular linfática foi associada a um risco 6,79 vezes maior de óbito por câncer; 4) presença de grau histológico III com aumento de risco de recidiva em 2,93; 5) presença de comprometimento linfonodal também foi fator de risco independente para maior risco de óbito e de recidiva da doença, com riscos relativos de 2,49 e 4,9 respectivamente.

Os receptores da família EGF têm sido foco de atenção no desenvolvimento da terapêutica dos tumores sólidos nos últimos anos. O tratamento baseado em nos anticorpos monoclonais contra os receptores do sistema EGF vem sendo consolidados na prática clínica, principalmente no câncer de mama e câncer de pulmão. Existem também estudos em câncer de cabeça e pescoço, câncer de estômago, câncer de cólon, e também alguns estudos em câncer de endométrio.

Para o câncer do endométrio, a família EGF foi estudada principalmente no que se refere à expressão imunohistoquímica e o status do gene do *HER-2*. Esses estudos contribuíram para consolidar, do ponto de vista molecular, a classificação proposta por BOKHMAN entre 2 tipos de câncer de endométrio. A classificação inicial era baseada em critérios

clínicos e patológicos. Posteriormente critérios moleculares confirmaram a hipótese e sugeriram vias de carcinogênese distintas para cada tipo (BOKHMAN 1983; SAMARNTHAI et al. 2010; OKUDA et al. 2010).

Em nossa casuística, a expressão imunoistoquímica dos receptores da família EGF em geral se mostrou baixa, exceto pela expressão de HER-3 no citoplasma (60,2%) e no núcleo (37,2%). Não houve associação entre as expressões imunoistoquímicas dos receptores HER-2 e HER-4 com sobrevida global, sobrevida câncer-específica e sobrevida livre de doença. Houve associação entre sobrevida livre de doença e a expressão de EGFR ($p=0,016$), porém a expressão de EGFR não se confirmou como fator independente prognóstico após a análise multivariada. Esse resultado poderia ser explicado pelo pequeno número de pacientes que apresentaram expressão positiva de EGFR. A expressão positiva de HER-3 no citoplasma correlacionou-se com melhor sobrevida global, porém essa diferença não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p = 0,092$).

A expressão de EGFR foi associada na análise univariada com presença de invasão perineural. No entanto, devemos citar que somente 2 casos apresentaram expressão imunoistoquímica positiva para o EGFR, de acordo com o critério de marcação usado. A análise de associação dos outros receptores (HER-2, HER-3 e HER-4) com as variáveis clínico-patológicas não mostrou correlações significativas.

Em publicação de 2007, EJSKJAER et al. pesquisaram a expressão imunoistoquímica dos receptores e ligantes da família EGF e expressão gênica através da pesquisa de a pesquisa de mRNA por RT-PCR em

amostras de biópsia do endométrio retiradas por curetagem. Os autores encontraram maior expressão dos receptores e maior expressão gênica nos casos de adenocarcinoma do endométrio, quando comparados ao endométrio não doente pós-menopausa. Também mostraram associação entre os receptores. Esta casuística consistiu em 45 casos de adenocarcinoma de endométrio tipo I, sendo sua maioria casos com estágio FIGO I e II (41 casos).

Em outra série, ADONAKIS et al. (2008) verificaram a expressão imunohistoquímica dos receptores, e correlacionaram a expressão com prognóstico. A amostra consistia em 106 casos de adenocarcinomas do endométrio, sendo 92 casos de tumores tipo I (86,8%), e 79 casos (74,6%) de tumores em estágio I e II. Nesta casuística, os autores encontraram expressão imunohistoquímica aumentada (>5% de marcação pelas células tumorais) em todos os receptores: 66 casos para o EGFR (62,3%), 69 casos para HER-2 (65,1%), 78 casos para HER-3 (67,9%), e 78 casos para HER-4 (73,6%). A análise estatística mostrou associação positiva entre as expressões dos receptores, e na análise de Kaplan-Meier, o EGFR positivo mostrou associação significativa com menor sobrevida câncer-específica. A expressão de EGFR foi ainda fator independente de prognóstico na análise multivariada (RR = 4,93, p = 0,043). Quando comparado com esse estudo, nossa casuística mostrou expressões baixas de EGFR (0,9%), HER-2 (1,4%) e HER-4 (6,3%). HER-3 em citoplasma mostrou expressão de 60,2%, valor próximo ao da casuística previamente citada (67,9%).

Um único trabalho avaliou a expressão imunohistoquímica de HER-3 e

HER-4 nos carcinomas do endométrio e o comparou com a expressão encontrada no endométrio normal. Porém, a expressão não foi correlacionada com prognóstico (SRINIVASAN et al. 1999). Os autores descreveram a expressão aumentada de HER-3 (30%) e HER-4 (15%) em 41 casos de adenocarcinoma de endométrio, quando comparados ao endométrio não tumoral. Na publicação não foi especificado o subtipo dos adenocarcinomas do endométrio.

Nossa casuística mostrou expressão imunohistoquímica distinta de HER-3 em citoplasma e núcleo, fato sem relato anterior em literatura para os carcinomas do endométrio, já que no câncer do endométrio foi previamente descrita a marcação de HER-3 no citoplasma, e em uma minoria dos casos na membrana (SRINIVASAN et al. 1999; EJSKJAER et al. 2007).

Houve expressão imunohistoquímica positiva de HER-3 no citoplasma em 108 casos (60,2%), e no núcleo houve expressão positiva de HER-3 em 67 (37,2%) dos casos analisados.

Existem estudos relatando a localização nuclear dos receptores da família EGF, e o receptor mais estudado em relação à sua localização nuclear é o EGFR. Nesta localização, há indícios de que o EGFR esteja agindo como fator de transcrição, podendo ser agente de remodelação de cromatina, e agente de reparo de DNA e/ou transdução de sinal por meio de sua atividade de tirosina quinase. A localização nuclear de EGFR é tipicamente descrita como resposta ao estresse celular, ou concomitante com a proliferação celular, como no caso das neoplasias (WELLS et al. 2002; CARPENTER et al. 2003).

São poucos os estudos relatando a localização nuclear de HER-3, porém esses estudos mostram que o HER-3 pode desempenhar funções interessantes nessa localização. Em linhagens celulares de câncer de mama, HER-3 nuclear parece ter papel na regulação de síntese de RNA durante a fase de crescimento celular. Em uma série de casos de câncer de pulmão, houve expressão de HER-3 em núcleo em 57% dos casos, associado com níveis significativamente elevados de mRNA HER-3. HER-3 também pode ser visto em localização nuclear nos carcinomas da próstata e suas linhagens celulares, sendo correlacionado com progressão da doença. Seu nível de expressão é elevado em tumores hormônio-resistentes, quando comparado com tumores hormônio-sensíveis. Porém, em linhagens celulares de câncer de próstata, sua expressão nuclear foi alta em células sensíveis a androgênios (SITHANANDAM e ANDERSON 2008). Isso prova que a localização nuclear de HER-3 desempenha papéis em situações de doença, e que deve ser alvo de mais estudos para elucidação de suas funções nessa localização.

O receptor HER-3 tem atraído atenção cada vez maior nos últimos anos, principalmente como alvo importante para desenvolvimento de novas terapias alvo moleculares. Estudos indicam que o HER-3 é o principal parceiro de dimerização de HER-2, sendo este dímero considerado o mais ativos da família dos receptores de EGF. O dímero HER-2/HER-3 age principalmente pela via PI3K-Akt, promovendo sobrevivência das células tumorais, sendo crucial para sinalização mediada pelo HER-2, nos tumores que possuem amplificação do gene HER-2 (BASELGA et al. 2009).

Podemos encontrar expressão aumentada de HER-3 nos tumores de mama, e em mais da metade dos cânceres de ovário, onde podem estar relacionados com tumores de pior prognóstico (TANNER et al. 2006). BAIOCCHI et al. (2009) estudaram a expressão de HER-3 e HER-4 em cânceres de cólon nos estádios II e III submetidos a cirurgia radical, e demonstraram que expressão positiva de HER-4 em membrana foi fator prognóstico independente para recorrência de doença. Mostraram ainda que expressão negativa de HER-3 foi fator prognóstico independente para recorrência e sobrevida.

Quando analisamos as casuísticas de outros trabalhos da literatura, levando em conta somente tumores do endométrio tipo I, temos taxas de expressão de EGFR variando entre 32 e 67% dos casos, e a associação com prognóstico foi diversa (REINARTZ et al. 1994; KHALIFA et al. 1994; SCAMBIA et al. 1994; NIIKURA et al. 1995; KONECNY et al. 2009).

Em publicação de 1994, KHALIFA et al. publicaram resultados de sua casuística que possuía 45 casos de adenocarcinoma do endométrio tipo I, com expressão de EGFR em 37,8%, e HER-2 em 60%. Aumento de expressão de HER-2 não teve impacto na sobrevida, porém a expressão de EGFR teve impacto negativo na sobrevida, e na análise multivariada excluindo o estágio FIGO, foi fator independente de mau prognóstico.

NIIKURA et al. (1995) analisaram a expressão de EGFR em 140 casos de tumores do endométrio tipo I, e encontrou expressão aumentada em 67,1% dos casos. Houve associação entre aumento da expressão imunohistoquímica e tumores com alto grau histológico, e com maior invasão

do miométrio na análise univariada. Expressão aumentada de EGFR também foi correlacionada com piora da sobrevida, porém, após análise multivariada não se apresentou como fator prognóstico independente.

REINARTZ et al. (1994) em sua publicação, avaliaram as expressões de EGFR e HER-2 em casuística contendo 128 casos de carcinoma de endométrio, sendo 84 casos de tumores tipo I. Nestes, houve expressão de EGFR em 32% e de HER-2 em 4% dos casos dos tumores tipo I. Nesse trabalho, EGFR e HER-2 não apresentaram associação com sobrevida.

Para a análise do teste de FISH, agrupamos as alterações de cópia dos genes do receptores, juntamente com as amplificações, com a finalidade de aumentar o poder da análise estatística, pois tivemos um baixo número de amplificações dos genes dos receptores da família EGF. Porém é desconhecido se o ganho de cópias gene realmente se traduz numa aumento de expressão dos seus respectivos receptores. O teste de FISH para *EGFR* encontrou 23 casos de ganho de cromossomos e nenhum caso de amplificação do gene *EGFR*. Para *HER-3* e *HER-4*, ocorreu somente um caso de amplificação do gene em cada um, e o maior número de casos alterados correspondeu a ganho de cópias dos genes. Para o FISH de *HER-2* encontramos o maior número de amplificações, que foram 5, e o menor número de ganho de cromossomos, que foram 10, quando comparado aos testes para *EGFR*, *HER-3* e *HER-4*.

Estudos sugerem que a amplificação do gene *HER-2* está associada a um aumento da expressão da proteína HER-2 e conseqüentemente ocorreria a transcrição aumentada do receptor. Portanto, a verificação do

papel do gene *HER-2* é feita tanto através da análise de expressão proteica quanto através da análise do número de cópias do gene.

Em nossa casuística, apesar do pequeno número de casos com alteração do gene e com expressão positiva da proteína HER-2, encontramos associação positiva entre alteração do teste de FISH para HER-2 e expressão positiva o receptor ($p = 0,016$). Não ocorreu associação entre alteração do FISH e expressão dos outros receptores (EGFR, HER-3 e HER-4).

Na análise univariada de associação entre alterações do FISH e variáveis clínico-patológicas, encontramos que FISH de *HER-2* alterado teve associação com presença de invasão vascular sanguínea e invasão de $\geq 50\%$ do miométrio. Verificamos também associação entre alteração do FISH de *HER-3* e IMC ≥ 30 , presença de invasão vascular linfática e tamanho do tumor ≥ 2 cm.

Alteração do status dos genes dos receptores *EGFR*, *HER-3* e *HER-4* não apresentou impacto em sobrevida. Apesar de não ter havido diferença estatisticamente significativa na análise univariada ($p = 0,066$), alteração de FISH para HER-2 se mostrou como fator independente associado a maior chance de recidiva da doença na análise multivariada (RR = 7,04; $p < 0,001$).

A porcentagem de tumores de endométrio tipo I que apresenta aumento de expressão de HER-2 é baixa, e varia entre 10 e 30% aproximadamente. A expressão aumentada de HER-2 é fator relacionado com pior sobrevida em alguns estudos (REINARTZ et al. 1994; SAFFARI et

al. 1995; KOHLBERGER et al. 1996; RIBEN et al. 1997; MORRISON et al. 2006), mas não em outros (KHALIFA et al. 1994; GRUSHKO et al. 2008). Isso pode ocorrer devido à falta de concordância na literatura no que diz respeito parâmetros de interpretação dos resultados para expressão proteica de HER-2, diferença nas populações analisadas, técnicas de coloração para imunohistoquímica diferentes, e diferenças nos anticorpos usados na coloração das lâminas.

A amplificação do gene HER-2 analisada por FISH está presente entre 6% a 38% de todos os carcinomas do endométrio (SAFFARI et al. 1995; RIBEN et al. 1997; ROLITSKY et al. 1999; WILLIAMS et al. 1999). SAFFARI et al. (1995), em casuística de 84% dos casos de câncer do endométrio do tipo I (63 casos), encontraram associação entre aumento de expressão imunohistoquímica de HER-2 e amplificação do gene HER-2 com pior sobrevida. ROLITSKY et al. (1999) encontraram que a amplificação de HER-2 foi fator de pior prognóstico independente na análise multivariada.

Porém os resultados de outros estudos sugerem que amplificação ou aumento de expressão de HER-2 não é fator independente de pior prognóstico, embora apresentem influência na sobrevida (HETZEL et al. 1992; LUKES et al. 1994; HEFFNER et al. 1999; WILLIAMS et al. 1999; CORONADO et al. 2001; PRAT et al. 2004).

O presente estudo obteve resultados semelhantes em relação à expressão de HER-2 (8% dos casos) e amplificação do gene HER-2 (1,4 a 3% dos casos), com dois estudos recentes, levando em conta somente paciente com câncer do endométrio tipo I (MORRISON et al. 2006;

KONECNY et al. 2009).

MORRISON et al.(2006, em sua casuística contendo 353 casos de tumores de endométrio tipo I (73% do total de casos), mostraram que o aumento da expressão do receptor associado à amplificação do gene de HER-2 foi fator independente de pior prognóstico na análise multivariada. Estes pacientes apresentaram maior risco de morte pela doença (RR = 2,3; $p = 0,010$), e menor intervalo livre de doença (RR = 2,75; $p = 0,002$). Além disso, para os 315 casos de tumores tipo I que possuíam tempo de seguimento adequado, houve diferença na sobrevida câncer-específica e no intervalo livre de doença, para os pacientes que apresentavam aumento de expressão, ou amplificação do gene *HER-2* ($p = 0,002$ e $p = 0,001$ respectivamente). Em um subgrupo desta casuística, com 224 pacientes estágio I, com qualquer grau histológico, houve expressão aumentada de HER-2 em 6%, e amplificação em 1,3%. E neste mesmo subgrupo houve menor sobrevida câncer-específica e menor intervalo livre de doença nas pacientes com aumento de expressão e/ou amplificação de *HER-2*.

Em resumo, nossa casuística mostrou expressão imunoistoquímica pouco aumentada para EGFR, HER-2 e HER-4, e aumentada para HER-3 em citoplasma. Encontramos ainda a expressão de HER-3 em núcleo, fato este não descrito previamente.

Quanto às alterações no status dos genes, nossa casuística apresentou baixas taxas de alteração, porém a alteração do FISH de *HER-2*, se destacou na análise multivariada como fator de pior prognóstico independente, implicando em menor sobrevida livre de doença.

Algumas hipóteses podem ser feitas a partir dos dados apresentados:

- 1 Existe uma expressão proteica baixa da família EGF, associada com baixas taxas de alterações nos genes dos receptores. Uma explicação possível para esse fato seria a de que um dos mecanismo da oncogênese dos tumores de endométrio tipo I, fosse a baixa ativação de todo o sistema EGF, o que poderia conferir o bom prognóstico desse tipo de tumor;
- 2 Alteração de FISH para HER-2 foi fator prognóstico independente para menor sobrevida livre de doença, mesmo com o baixo número de casos em nossa casuística. Alteração do FISH de HER-2 incluiu o maior número de amplificações do gene, quando comparado com as amplificações dos outros receptores, talvez sugerindo que alterações de cópias do cromossomo (polissomias) não tenham a mesma importância que as amplificações do gene. Este fato sugere ainda que HER-2 possui importância como oncogene, conferindo poder de transformação às células quando suas vias intracelulares estão ativadas;
- 3 O principal papel do HER-3 é como parceiro de dimerização de HER-2, ativando principalmente a via PI3K. Em nossa casuística ocorre aumento de expressão citoplasmática de HER-3, assim como aumento de expressão nuclear de HER-3, quando comparado aos outros receptores da família. Poderíamos inferir que esses receptores encontrados no citoplasma e núcleo não estão chegando ao seu destino na membrana, onde formariam os heterodímeros. Portanto,

haveria uma menor sinalização intracelular. Dessa forma podemos tentar explicar a tendência de melhor sobrevida global em casos em o HER-3 está expresso. Porém essas são somente especulações diante dos resultados e necessitam outros estudos para melhor esclarecimento.

6 CONCLUSÕES

Houve expressão imunoistoquímica para EGFR, HER-2, HER-4 em 0,9%, 1,4%, 6,3% dos casos. No caso do HER-3, houve expressão em citoplasma e núcleo em 60,2% e 37,2% dos casos, respectivamente.

O número de cópias dos genes *EGFR*, *HER-2*, *HER-3* e *HER-4* através de FISH foi encontrado alterado em 12,6%, 7,6%, 10,7% e 3,0% dos casos, respectivamente.

- 1 A expressão imunoistoquímica de EGFR correlacionou-se com presença invasão perineural. Não houve associação entre as expressões de HER-2, HER-3 e HER-4 com as variáveis clínico-patológicas;
- 2 A presença de alteração do número de cópias do gene *HER-2* apresentou associação com a presença de invasão vascular sanguínea e invasão $\geq 50\%$ do miométrio. A alteração do número de cópias do gene *HER-3* apresentou associação com: IMC ≥ 30 , presença de invasão vascular linfática e tamanho do tumor $\geq 2\text{cm}$. As alterações no número de cópias de *EGFR* e *HER-4* não tiveram associação com as variáveis clínico-patológicas;
- 3 A expressão imunoistoquímica positiva de EGFR apresentou associação com pior sobrevida livre de doença ($p < 0,001$) na análise univariada. As expressões imunoistoquímicas positivas de HER-2,

HER-3 e HER-4 não tiveram impacto estatisticamente significativo em sobrevida global, sobrevida câncer-específica e sobrevida livre de doença na análise univariada.

A presença de alterações dos números de cópias dos genes dos receptores da família EGF não tiveram impacto nas sobrevida global, sobrevida câncer-específica e sobrevida livre de doença na análise univariada. Porém, a alteração do número de cópias de *HER-2* mostrou-se fator de risco independente para recidiva na análise multivariada.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adonakis G, Androutsopoulos G, Koumoundourou D, Liava A, Ravazoula P, Kourounis G. Expression of the epidermal growth factor system in endometrial cancer. **Eur J Gynaecol Oncol** 2008; 29:450-4.

Altekruse SF, Kosary CL, Krapcho M, et al. **SEER Cancer Statistics Review, 1975-2007**. Bethesda: National Cancer Institute; 2010. Available from: <URL:http://seer.cancer.gov/csr/1975_2007/> [2012 jun 01].

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

ASTECC study group, Kitchener H, Swart AM, Qian Q, Amos C, Parmar MK. Efficacy of systematic pelvic lymphadenectomy in endometrial cancer (MRC ASTEC trial): a randomised study. **Lancet** 2009; 373:125-36.

Baiocchi G, Lopes A, Coudry RA, et al. ErbB family immunohistochemical expression in colorectal cancer patients with higher risk of recurrence after radical surgery. **Int J Colorectal Dis** 2009; 24:1059-68.

Barrett RJ, Harlan LC, Wesley MN, et al. Endometrial cancer: stage at diagnosis and associated factors in black and white patients. **Am J Obstet Gynecol** 1995; 173:414-22, discussion 422-3.

Baselga J, Swain SM. Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3. **Nat Rev Cancer** 2009; 9:463-75.

Begnami MD, Fukuda E, Fregnani JH, et al. Prognostic implications of altered human epidermal growth factor receptors (HERs) in gastric carcinomas: HER2 and HER3 are predictors of poor outcome. **J Clin Oncol** 2011; 29:3030-6.

Benedetti Panici P, Basile S, Maneschi F, et al. Systematic pelvic lymphadenectomy vs. no lymphadenectomy in early-stage endometrial carcinoma: randomized clinical trial. **J Natl Cancer Inst** 2008; 100:1707-16.

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

Boronow RC, Morrow CP, Creasman WT, et al. Surgical staging in endometrial cancer: Clinical-pathologic findings of a prospective study. **Obstet Gynecol** 1984; 63:825-32.

Carpenter G. Nuclear localization and possible functions of receptor tyrosine kinases. **Curr Opin Cell Biol** 2003; 15:143-8.

Ciardiello F, Tortora G. A novel approach in the treatment of cancer: targeting the epidermal growth factor receptor. **Clin Cancer Res** 2001; 7:2958-70.

Citri A, Yarden Y. EGF-ERBB signalling: towards the systems level. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2006; 7:505-16.

Coronado PJ, Vidart JA, Lopez-Asenjo JA, et al. P53 overexpression predicts endometrial carcinoma recurrence better than HER-2/neu overexpression. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol** 2001; 98:103-8.

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

Creasman W. Revised FIGO staging for carcinoma of the endometrium. **Int J Gynaecol Obstet** 2009; 105:109.

Creasman WT, Boronow RC, Morrow CP, DiSaia PJ, Blessing J. Adenocarcinoma of the endometrium: its metastatic lymph node potential: a preliminary report. **Gynecol Oncol** 1976; 4:239-43.

Creasman WT, Morrow CP, Bundy BN, Homesley HD, Graham JE, Heller PB. Surgical pathologic spread patterns of endometrial cancer. A Gynecologic Oncology Group Study. **Cancer** 1987; 60(Suppl):2035-41.

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

DiSaia PJ, Creasman WT, Boronow RC, Blessing JA. Risk factors and recurrent patterns in stage I endometrial carcinoma. **Am J Obstetr Gynecol** 1984; 151:1009-15.

Dizon DS. Treatment options for advanced endometrial carcinoma. **Gynecol Oncol** 2010; 117:373-81.

Doll A, Abal M, Rigau M, et al. Novel molecular profiles of endometrial cancer-new light through old windows. **J Steroid Biochem Mol Biol.** 2008; 108:221-9.

Ejskjaer K, Sørensen BS, Poulsen SS, Forman A, Nexø E, Mogensen O. Expression of the epidermal growth factor system in endometrioid endometrial cancer. **Gynecol Oncol** 2007; 104:158-67.

Engelsen IB, Stefansson IM, Beroukhi R, et al. Sellers WR. HER-2 / neu expression is associated with high tumor cell proliferation and aggressive phenotype in a population based patient series of endometrial carcinomas. **Int J Oncol** 2008; 32:307-16.

Grushko TA, Filiaci VL, Mundt AJ, et al. An exploratory analysis of HER-2 amplification and overexpression in advanced endometrial carcinoma: a Gynecologic Oncology Group study. **Gynecol Oncol** 2008; 108:3-9.

Heffner HM, Freedman AN, Asirwatham JE, et al. Prognostic significance of p53, PCNA, and c-erbB-2 in endometrial adenocarcinoma. **Eur J Gynaecol Oncol** 1999; 20:8-12.

Hetzel DJ, Wilson TO, Keeney GL, et al. HER-2/neu expression: a major prognostic factor in endometrial cancer. **Gynecol Oncol** 1992; 47:179-85.

Hicks ML, Kim W, Abrams J, Johnson CC, Blount AC, Parham GP. Racial differences in surgically staged patients with endometrial cancer. **J Natl Med Assoc** 1997; 89:134-40.

Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. **Nat Rev Cancer** 2005; 5:341-54. Erratum in: **Nat Rev Cancer** 2005; 5:580.

Hynes NE, MacDonald G. ErbB receptors and signaling pathways in cancer. **Curr Opin Cell Biol** 2009; 21:177-84.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. **CA Cancer J Clin** 2011; 61:69-90.

Kaplan E, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. **J Am Stat Assoc** 1958; 53:457-81.

Khalifa MA, Abdoh AA, Mannel RS, Haraway SD, Walker JL, Min KW. Prognostic utility of epidermal growth factor receptor overexpression in endometrial adenocarcinoma. **Cancer** 1994; 73:370-6.

Konecny GE, Santos L, Winterhoff B, et al. HER2 gene amplification and EGFR expression in a large cohort of surgically staged patients with nonendometrioid (type II) endometrial cancer. **Br J Cancer** 2009; 100:89-95.

Leitao MM, Barakat RR. Advances in the management of endometrial carcinoma. **Gynecol Oncol** 2011; 120:489-92.

Lukes AS, Kohler MF, Pieper CF, et al. Multivariable analysis of DNA ploidy, p53, and HER-2/neu as prognostic factors in endometrial cancer. **Cancer** 1994; 73:2380-5.

Mariani A, Dowdy SC, Podratz KC. New surgical staging of endometrial cancer: 20 years later. **Int J Gynaecol Obstet** 2009; 105:110-1.

Masciullo V, Amadio G, Lo Russo D, Raimondo I, Giordano A, Scambia G. Controversies in the management of endometrial cancer. **Obstet Gynecol Int** 2010; 2010:638165.

Morrison C, Zanagnolo V, Ramirez N, et al. HER-2 Is an Independent Prognostic Factor in Endometrial Cancer: Association With Outcome in a Large Cohort of Surgically Staged Patients. **J Clin Oncol** 2006; 24:2376-85.

Morrow CP, Bundy BN, Kurman RJ, et al. Relationship between surgical-pathological risk factors and outcome in clinical stage I and II carcinoma of the endometrium: a Gynecologic Oncology Group study. **Gynecol Oncol** 1991; 40:55-65.

Morrow CP, Di Saia PJ, Townsend DE. Current management of endometrial carcinoma. **Obstetr Gynecol** 1973; 42:399-406.

Moscattello DK, Holgado-Madruga M, Godwin AK, et al. Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors. **Cancer Res** 1995; 55:5536-9.

Niikura H, Sasano H, Matsunaga G, et al. Prognostic value of epidermal growth factor receptor expression in endometrioid endometrial carcinoma. **Hum Pathol** 1995; 26:892-6.

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

Okuda T, Sekizawa A, Purwosunu Y, et al. Genetics of endometrial cancers. **Obstet Gynecol Int** 2010; 2010:984013.

Pecorelli S. Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, and endometrium. **Int J Gynaecol Obstet** 2009; 105:103-4.

Prat J. Prognostic parameters of endometrial carcinoma. **Hum Pathol** 2004; 35:649-62.

Reinartz JJ, George E, Lindgren BR, Niehans GA. Expression of p53, transforming growth factor alpha, epidermal growth factor receptor, and c-erbB-2 in endometrial carcinoma and correlation with survival and known predictors of survival. **Hum Pathol** 1994; 25:1075-83.

Riben MW, Malfetano JH, Nazeer T, et al. Identification of HER-2/neu oncogene amplification by fluorescence in situ hybridization in stage I endometrial carcinoma. **Mod Pathol** 1997; 10:823-31.

Rolitsky CD, Theil KS, McGaughy VR, et al. HER-2/neu amplification and overexpression in endometrial carcinoma. **Int J Gynecol Pathol.** 1999; 18:138-43

Saffari B, Jones LA, el-Naggar A, et al. Amplification and overexpression of HER-2/neu (c-erbB2) in endometrial cancers: correlation with overall survival. **Cancer Res** 1995; 55:5693-8.

Samarntjai N, Hall K, Yeh IT. Molecular profiling of endometrial malignancies. **Obstet Gynecol Int** 2010; 2010:162363.

Scambia G, Benedetti Panici P, et al. Significance of epidermal growth factor receptor expression in primary human endometrial cancer. **Int J Cancer** 1994; 56:26-30.

Seracchioli R, Solfrini S, Mabrouk M, et al. Controversies in surgical staging of endometrial cancer. **Obstet Gynecol Int** 2010; 2010:181963.

Sergina NV, Moasser MM. The HER family and cancer: emerging molecular mechanisms and therapeutic targets. **Trends Mol Med** 2007; 13:527-34.

Sithanandam G, Anderson LM. The ERBB3 receptor in cancer and cancer gene therapy. **Cancer Gene Ther** 2008; 15:413-48.

Srinivasan R, Benton E, McCormick F, Thomas H, Gullick WJ. Expression of the c-erbB-3/HER-3 and c-erbB-4/HER-4 growth factor receptors and their ligands, neuregulin-1 alpha, neuregulin-1 beta, and betacellulin, in normal endometrium and endometrial cancer. **Clin Cancer Res** 1999; 5:2877-83.

Takeuchi K, Ito F. EGF receptor in relation to tumor development: molecular basis of responsiveness of cancer cells to EGFR-targeting tyrosine kinase inhibitors. **FEBS J** 2010; 277:316-26.

Tanner B, Hasenclever D, Stern K, et al. ErbB-3 predicts survival in ovarian cancer. **J Clin Oncol** 2006; 24:4317-23.

Tsujioka H, Yotsumoto F, Shirota K, et al. Emerging strategies for ErbB ligand-based targeted therapy for cancer. **Anticancer Res** 2010; 30:3107-12.

Uberall I, Kolár Z, Trojanec R, Berkovcová J, Hajdúch M. The status and role of ErbB receptors in human cancer. **Exp Mol Pathol** 2008; 84:79-89.

Wárlám-Rodenhuis CC, De Winter KA, Lutgens LC, et al. Surgery and postoperative radiotherapy versus surgery alone for patients with stage-1 endometrial carcinoma: multicentre randomised trial. PORTEC Study Group. Post Operative Radiation Therapy in Endometrial Carcinoma. **Lancet** 2000; 355:1404-11.

Wells A, Marti U. Signalling shortcuts: cell-surface receptors in the nucleus? **Nat Rev Mol Cell Biol** 2002; 3:697-702.

Wikstrand CJ, Reist CJ, Archer GE, Zalutsky MR, Bigner DD. The class III variant of the epidermal growth factor receptor (EGFRvIII): characterization and utilization as an immunotherapeutic target. **J Neurovirol** 1998; 4:148-58.

Williams JA Jr, Wang ZR, Parrish RS, et al. Fluorescence in situ hybridization analysis of HER-2/neu, c-myc, and p53 in endometrial cancer. **Exp Mol Pathol** 1999; 67:135-43.

Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. **J Clin Oncol** 2007; 25:118-45.

Yarden Y, Sliwkowski MX. ErbB-3 predicts survival in ovarian cancer. **J Clin Oncol** 2006; 24:4317-23.

Yarden Y, Pines G. The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology. **Nat Rev Cancer** 2012; 12:553-63.

Zaczek A, Brandt B, Bielawski KP. The diverse signaling network of EGFR, HER2, HER3 and HER4 tyrosine kinase receptors and the consequences for therapeutic approaches. **Histol Histopathol** 2005; 20:1005-15.

Anexo 1 - Ficha de coleta de dados

PROTOCOLO NEOPLASIA DE ENDOMETRIO

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. PESO-.....|_____|P
6. ALTURA -|_____|H
7. DATA DE ABERTURA DO PRONTUARIO.....___/___/___ 1cons
8. MENOPAUSA- (0) sim (1) não|_____|
9. IDADE DA
MENOPAUSA.....|_____|idade_menopausa
10. REPOSIÇÃO HORMONAL.....(0) Sim.....(1) Não.....|_____|trh

SINTOMAS/EXAMES

11. SINTOMAS- (0) não (1) dor (2) sangramento (3) corrimento (4) outros|_____|sint
12. DATA DOS PRIMEIROS SINTOMAS-.....___/___/___ sint_data
13. DIAGNOSTICO- (0) curetagem (1) histeroscopia (2) aspirado (3) biopsia colo|_____|diag
14. Data-|_____|diag_data
15. HISTEROSCOPIA (achados)- (0) normal (1) polipo (2) endometrio proliferativo (3) massa
(4) atrofico.....|_____|hstero_achado
16. AP- (1) adeno endometriode (2) sero papilifero (3) cels claras|_____|AP
17. CA 125 (0) não realizado (1) realizado|_____|ca125
18. VALOR DO CA 125|_____|valor_ca125

TRATAMENTO

19. TRATAMENTO PRE CIRURGIA - (0) sim (1) não.....|_____|trata_pre
20. TIPO DE TRATAMENTO PRE: (1) Rxt (2) hormonio (3) QT (8) não se aplica.....|_____|tipo_tratapré
21. LOCAL 1ª CIRURGIA- (0) ACC (1) fora|_____|1ª cir
22. 1ª CIRURGIA- DATA-.....___/___/___ 1ª cir_data
23. 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
24. 2ª CIRURGIA- DATA-.....___/___/___ 2ª cir_data
25. TIPO DE CIRURGIA—|_____|tipo_2acir

ACHADOS OPERATORIO:

26. ASCITE (0) nao (1) sim.....|_____|asc
27. CARCINOMATOSE.... (0) nao (1) sim.....|_____|carcin
28. ADERENCIA TUMORAL(UTERO C/ ORGAOS)..... (0) nao (1) sim.....|_____|adere_tumor
29. LINFONODOMEGALIA..... (0) nao (1) sim.....|_____|linfonodo
30. METASTASE..... (0) nao (1) sim.....|_____|meta

TRATAMENTO ADJUVANTE

31. RADIOTERAPIA EXTERNA- (0)nao (1)sim|_____|Rxt_ext
32. BRAQUITERAPIA- (0)nao (1)sim.....|_____|braq
33. QUIMIOTERAPIA- (0)nao (1)sim.....|_____|QT
34. HORMONIOTERAPIA- (0)nao (1)sim.....|_____|hormônio
35. TERMINO _____termino

ANATOMIA PATOLOGICA

36. TAMANHO(CM)|_____|tamanho
37. LOCALIDADE- (0)FUNDO (1)CORPO (2)CERVIX (3)FUNDO-CORPO (4)FUNDO-CORPO-CERVIX (5)CORPO-CERVIX.....|_____|local
38. OVARIOS- (0)C/IMPLANTE (1)S/IMPLANTE|_____|ovarios
39. TROMPAS- (0)C/INVASÃO (1)S/INVASÃO|_____|trompa
40. EPIPLON- (0)C/IMPLANTE (1)S/IMPLANTE|_____|epiplon
41. CITOLOGIA PERITONEAL POSITIVA- (0)nao (1)sim.....|_____|cperitoneal
42. CONGELAÇÃO- _____
43. TIPO HISTOLOGICO **ADENOCARCINOMA – (1)adeno endometriode (2)sero papilifero (3)cels claras (4)ausência de câncer na peça**.....|_____|tipo_histo

NUMERO DE LINFONODOS DISSECADOS

44. PELVICO (dissecados)-.....|_____|lin_pelv_diss
45. P.AORTICO (dissecados).....|_____|lin_paort_diss

NUMERO LINFONODOS COMPROMETIDOS

46. PELVICO (comprometidos)-.....|_____|lin_pelv_comp
47. P.AORTICO (comprometidos)-|_____|lin_paort_comp
48. GRAU ARQUITETURAL- **G1(1) G2(2) G3(3)**|_____|GA
49. GRAU NUCLEAR-.....|_____|GN
50. INVASÃO VASCULAR- (0)nao (1)sim.....|_____|In_Vasc
51. INVASÃO LINFATICA- (0)nao (1)sim.....|_____|IN_linf
52. INVASAO PERINEURAL- (0)nao (1)sim|_____|IPN
53. PARAMETRIOS COMPROMETIDOS- (0)nao (1)sim|_____|param_comp
54. INVASÃO DO MIOMETRIO (CM)(0)restrito endometrio (1) 1/2 interna (2)1/2 externa.....|_____|linv_miom
55. NUMERO DA LÂMINA PEÇA--.....- _____no_lamina

56. ESTADIAMENTO PATOLOGICO

- 1A(1) 1B(2) 1C(3) 2A(4) 2B(5) 3A(6) 3B(7) 3C(8) 4A(9) 4B(10)**|_____|est_patolo

ACOMPANHAMENTO

57. RECIDIVA - (0)nao (1)sim|_____|recidiva
58. DATA DA RECIDIVA ---...../_____/_____/_____|data_recid
59. LOCAL DA RECIDIVA (0)local (1)distancia (2)local e distancia.....|_____|local_recid
60. **TRATAMENTO DA RECIDIVA**(0)NÃO (1)QT (2)RxT (3)CIR (4)QT+RxT (5)CIR+QT (6)CIR+RxT|_____|Trat_recid
61. INTENÇÃO DO TRATAMENTO (0)PALIATIVO (1)CURATIVO|_____|intenção_trat
62. CIRURGIA- DATA _____Cir_data
63. CIRURGIA- QUAL?..... cir_tipo

SITUAÇÃO ATUAL

64. DATA ULTIMO CONTATO--..... ____/____/____ data_contato

65. SITUAÇÃO:(1) vivo sem câncer (2) vivo com câncer (3) morte pelo tratamento
(4) morte pela doença (5) morte outras causas (6) perdido de vista.....|_____|situação