

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE E-CADERINA E
AVALIAÇÃO DE SUA RELAÇÃO COM AS TAXAS DE
PROLIFERAÇÃO CELULAR EM NEOPLASIAS
INTRAEPITELIAIS CERVICAIS E CARCINOMA
EPIDERMÓIDE DO COLO DE ÚTERO**

PRISCILA SAMARA SARAN

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

Área de concentração: Oncologia

**Orientadora: Dra Cláudia Malheiros Coutinho
Camillo**

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

São Paulo

2014

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Saran, Priscila Samara

Análise da expressão de E-caderina e avaliação de sua relação com as taxas de proliferação celular em neoplasias intraepiteliais cervicais e carcinoma epidermóide do colo de útero / Priscila Samara

Saran - São Paulo 2014.

69p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientadora: Cláudia Malheiros Coutinho Camillo

Descritores: 1. NEOPLASIAS INTRAEPITELIAIS DO COLO DO ÚTERO. 2. CARCINOMA ESPINOCELULAR DO COLO DO ÚTERO. 3. E-CADERINAS. 4. PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS. 5. TRANSIÇÃO EPITELIAL-MESENQUIMAL. 6. BROTAMENTOS TUMORAIS.

*Marco Polo describes a bridge,
stone by stone.*

“But which is the stone that supports the arch?”

Kublai Khan asks.

“This bridge is not supported by one stone or another”

Marco Polo answers,

“but by the line of the arch that they form.”

*Kublai Khan remains silent,
reflecting. Then he adds,*

*“Why do you speak
to me of the stones? It is only the arch that matters to me.”*

Polo answers,

“Without stones there is no arch.”

Italo Calvino

AGRADECIMENTOS

À Deus, pois Ele, por Ele e para Ele são todas as coisas.

Aos meus pais, Pedro e Inês, e minha irmã Soyla, pelo apoio incondicional e por acreditarem no meu objetivo.

À tia Cleonice, que me acolheu quando cheguei à esta cidade odiosa e apaixonante, “Paulicéia desvairada”.

Ao Prof. Dr. Fernando pela ideia deste trabalho e pela oportunidade. Tenho orgulho de ter passado por esta instituição, pela qual tenho muito respeito e admiração e onde tive oportunidade de aprender muito.

À Dra Cláudia pela presença, pelo apoio e por ser um exemplo de mulher pesquisadora. Certamente levarei comigo as lições sobre ética, competência e comprometimento com a pesquisa. Por ter sido sempre um porto seguro, onde eu sempre tive respostas e ajuda para executar este trabalho.

À Dra Silvia, sou muito grata pela boa vontade que teve ao me ajudar a entender mais sobre patologia.

À Dra Marcilei pela ajuda e pelas dicas de imunofluorescência.

Aos Drs Elza e Renato, pela boa vontade em me auxiliar com a casuística deste trabalho.

Ao Prof Dr Jose Humberto, pelo auxílio nas análises estatísticas do presente estudo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Aos funcionários dos laboratórios de imunoistoquímica e técnicas histológicas, do CEP, CIPE, Biblioteca, e Pós Graduação, cujo trabalho foi essencial para a concretização desta pesquisa. Dentre vocês pude ver exemplos admiráveis de que é possível levar o trabalho com leveza, transmitindo segurança a quem está ao redor. Agradeço especialmente à Katia, Suely, Jefferson, Ivan e Fátima, que são ótimos exemplos das qualidades acima mencionadas.

Aos Drs Milton e Rosivânia, por me apresentarem o mundo das células. Pela paciência que tinham em tentar explicar fisiologia a quem não parava de fazer perguntas.

Aos colegas do CIPE.

À Elen e à Bárbara pela compreensão, pela amizade e pela ajuda que foi vital para que esta dissertação fosse concluída. Que este agradecimento eternizado na página de uma dissertação expresse o quanto fico feliz por existirem pessoas “do bem” ainda neste mundo!

Ao Junior, por me aconselhar, e por me apoiar numa fase difícil deste Mestrado.

À Tati, minha irmã não-parente, pela amizade, pelos conselhos, risadas, pelas discussões de apresentações de trabalho.

À Vick, por ser essa amiga tão presente, pelas tantas horas que passamos conversando pra entender o mundo e tudo o que acontecia ao nosso redor. O que seria deste trabalho sem as ideias para abstrair um pouco, as discussões sobre o trabalho e sobre o mundo, e sem a companhia nos eventos científicos?

Ao Victor, amigo querido, pelos conselhos e apoio, por estar presente sempre apesar da distância, e pelas vezes que salvou o meu computador (e a mim consequentemente).

RESUMO

Saran PS. **Análise da expressão de E-caderina e avaliação de sua relação com as taxas de proliferação celular em neoplasias intraepiteliais cervicais e carcinoma epidermóide do colo de útero.** São Paulo; 2014. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

O câncer de colo de útero é o terceiro mais frequente entre as mulheres e permanece como um importante problema de saúde, principalmente entre os países em desenvolvimento. O carcinoma invasivo de colo uterino, em cerca de 90% dos casos, evolui a partir de lesões intraepiteliais cervicais (NICs), que por sua vez são divididas em lesões de baixo grau (NIC I) e de alto grau (NICs II e III). A E-caderina é uma proteína cálcio-dependente sendo uma das principais responsáveis pela adesão célula a célula. Vários estudos apontam que a E-caderina pode ter função na inibição da proliferação celular. Apesar desse papel na adesão celular, não podemos afirmar que ele seja o responsável pela inibição da proliferação, já que há eventos no desenvolvimento normal em que células fortemente aderidas têm um alto índice proliferativo. Também deve ser considerado que a E-caderina apresenta um papel importante no reconhecimento célula-célula, organização do citoesqueleto, na transdução de sinal, na polaridade epitelial e controle do crescimento. Perda da expressão de E-caderina é um evento crucial para a ocorrência da transição epitélio-mesenquimal (TEM). Neste trabalho avaliamos, por imunistoquímica, a expressão da E-caderina e proliferação celular (expressão do marcador de proliferação celular Ki-67), e comparamos a expressão de ambas proteínas no tumor como um todo e no fronte de invasão e também em lesões precursoras. Para tanto, foram selecionados 20 amostras de ectocérvix histologicamente normais 25 amostras de endocérvix histologicamente normais 22 amostras de lesão de baixo grau, 44 amostras de lesão de alto grau e 43 amostras de carcinoma epidermóide invasor, provenientes de 70 pacientes tratadas no AC Camargo

Cancer Center. Foi observada a perda da expressão de E-caderina a partir da lesão de baixo grau (3,78% das células com perda de expressão), sendo o fronte de invasão onde esta diminuição foi mais acentuada (11,69%). Também foi avaliada se esta diminuição de E-caderina no fronte estava relacionada ao número de brotamentos tumorais. Contudo não foi observada relação entre número de brotamentos e perda de E-caderina: os casos que apresentaram perda de expressão de E-caderina acima da mediana apresentaram uma quantidade de 12,70 brotamentos/mm², enquanto que os casos que apresentaram perda de expressão de E-caderina abaixo da mediana apresentaram 11,88 brotamentos/mm². O índice de proliferação foi máximo nas lesões intraepiteliais de alto grau (7,97% das células), seguido do centro de tumor (2,16%), sendo que há uma diminuição desta proliferação no fronte de invasão (1,33%). Contudo, não foi observada uma relação quantitativa entre a perda global da expressão de E-caderina e o índice proliferativo. Nossos resultados sugerem que a expressão de E-caderina seja extremamente dinâmica. Talvez esta dinâmica explique os resultados contraditórios obtidos quando trabalhos tentam correlacionar a expressão de E-caderina e o prognóstico das diversas neoplasias e que para que este marcador seja eficiente na capacidade de prever o comportamento biológico talvez seja necessário observar os blocos invasores e não o tumor como um todo.

SUMMARY

Saran PS. **[Analysis of E-cadherin expression and evaluation of its relationship with cell proliferation rates in cervical intraepithelial neoplasias and uterine cervix squamous cell carcinoma]**. São Paulo; 2014. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Cervical cancer is the third most common cancer among women and remains a major health problem, especially in developing countries. Invasive carcinoma, in about 90% of cases, develops from cervical intraepithelial neoplasias (CINs), classified into low-grade lesions (CIN I) and high-grade (CINs II and III). E-cadherin is a calcium-dependent protein responsible for cell-cell adhesion. Several studies show that E-cadherin could be important in inhibition of cell proliferation. Despite this role in cell adhesion, it cannot be stated that it is responsible for the inhibition of proliferation, since in normal development strongly adhered cells can have a high proliferative index. It should also be considered that E-cadherin has important roles in cell-cell recognition, cytoskeletal organization, signal transduction, epithelial polarity and growth control. Decreased expression of E-cadherin is a critical event for the occurrence of epithelial mesenchymal transition (EMT). In this study, we evaluated by immunohistochemistry the expression of E-cadherin and cell proliferation (expression of Ki-67) and compared the expression of both proteins in the tumor as a whole and in the invasive front and in premalignant lesions. For this analysis 20 ectocervix samples 25 endocervix samples 22 low grade lesions, 44 high grade lesions and 43 invasive epidermoid carcinomas were selected from 70 patients treated at AC Camargo Cancer Center. Loss of E-cadherin expression was observed from low-grade lesions (loss of expression in 3.78% of the cells), and in the invasive front this decrease was more pronounced (11.69%). It was also assessed whether this decrease of E-cadherin in the invasive front was related to the number of tumor buddings. However no relationship between the number of buddings

and loss of E-cadherin was observed: patients who had loss of expression of E-cadherin above the median value showed an amount of 12.70 buddings/mm², while patients who had loss of expression of E-cadherin below the median value showed 11.88 buddings/mm². The proliferation index was high in high-grade intraepithelial lesions (7.97%), followed by the central area of the tumor (2.16%), and there was a decrease in the proliferation in invasive front (1.33%). However, a quantitative relationship between the overall loss of E-cadherin expression and proliferative index was not observed. Our results suggests that E-cadherin expression might be highly dynamic. This dynamic might explain the contradictory results obtained when studies attempt to correlate the expression of E-cadherin and prognosis in several cancers and suggests that, to be effective in the ability to predict the biologic behavior, might be necessary to observe E-cadherin expression in invasive tumor blocks and not in the tumor as a whole.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Técnica de colposcopia em coloração aceto-branca da cérvice...	3
Figura 2	Representação das alterações histológicas observadas nos diferentes graus de neoplasias intraepiteliais cervicais (NICs) e no carcinoma invasivo.....	4
Figura 3	Imagem representativa de dupla marcação imunistoquímica para E-caderina (marrom) e Ki-67 (vermelho) em amostra de tonsila palatina.....	18
Figura 4	Imagem representativa de dupla marcação para E-caderina (marrom) e Ki-67 (vermelho), visualizada no <i>software</i> ImageScope.....	22
Figura 5	Demonstração da subtração de cores realizada pelo <i>software</i> ImageScope (algoritmo Color Deconvolution).....	23
Figura 6	Demonstração da subtração de cores realizada pelo <i>software</i> ImageScope (algoritmo Color Deconvolution).....	24
Figura 7	Perda de expressão de E-caderina nas diferentes condições estudadas, sendo considerado apenas as células negativas.....	31
Figura 8	Percentual de <i>pixels</i> marrons (E-caderina) nas diferentes condições estudadas, medido pelo algoritmo <i>Color Deconvolution</i>	33
Figura 9	Percentual de <i>pixels</i> vermelhos (Ki-67) nas diferentes condições estudadas, medido pelo algoritmo <i>Color Deconvolution</i>	37

Figura 10	Percentual de núcleos marcados por Ki-67 nas lesões de alto grau, centro do carcinoma epidermóide invasivo e no fronte de invasão da neoplasia, avaliados pelo algoritmo <i>nuclear1</i>	39
Figura 11	Imagem representativa de ectocérvice histologicamente normal com dupla marcação para E-caderina (marrom) e Ki-67 (vermelho).....	41
Figura 12	Imagem representativa de endocérvice histologicamente normal com dupla marcação para E-caderina (marrom) e Ki-67 (vermelho).....	42
Figura 13	Imagem representativa de lesão de alto grau demonstrando intensa marcação para E-caderina (marrom) e Ki-67 (vermelho).....	43
Figura 14	Imagem representativa de amostra de carcinoma in situ e tumor invasivo subjacente.....	44
Figura 15	Imagem representativa de carcinoma <i>in situ</i> , com área de micro invasão.....	45
Figura 16	Imagem representativa de amostra de carcinoma invasor com grande bloco e brotamento de invasão.....	46
Figura 17	Imagem representativa de amostra de carcinoma invasor.....	46
Figura 18	Imagem representativa de amostra de carcinoma epidermóide invasor.....	47
Figura 19	Imagem representativa de amostra de carcinoma epidermóide invasor.....	48

Figura 20	Imagem representativa de carcinoma epidermóide invasor.....	49
Figura 21	Imagem representativa de carcinoma epidermóide invasor.....	49
Figura 22	Imagem representativa de carcinoma epidermóide invasor.....	50
Figura 23	Imagem representativa de carcinoma epidermóide invasor.....	51
Figura 24	Imagem representativa de ectocérvice histologicamente normal utilizando-se a técnica de imunofluorescência.....	52
Figura 25	Imagem representativa de carcinoma invasor, visto ao microscópio confocal com emissão para os canais azul escuro (E-caderina) e azul claro (DAPI).....	53
Figura 26	Imagem representativa de brotamento tumoral, visto ao microscópio confocal com emissão para os canais azul escuro (E-caderina) e azul claro (DAPI), em maior aumento (102x).....	54
Figura 27	Modelo de expressão de E-caderina e taxa de proliferação celular em neoplasias do colo uterino.....	62

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Número de casos analisados conforme o diagnóstico histopatológico.....	15
Quadro 2	Características dos anticorpos utilizados e seus controles....	17
Quadro 3	Características dos anticorpos utilizados na técnica de imunofluorescência	26
Tabela 1	Perda de expressão de E-caderina nas diferentes condições estudadas sendo consideradas apenas as células negativas ao uso do algoritmo <i>membrane_v1</i> em coloração imunoistoquímica com dupla marcação para E-caderina e Ki-67.....	29
Tabela 2	Relação estatística dos grupos dois a dois avaliada pelo teste de Kruskal-Wallis, quanto à perda de expressão de E-caderina, baseando-se que a distribuição dos resultados não é normal pelo teste D'Agostino/Person.....	30
Tabela 3	Percentual de pixels marrons (E-caderina) nas diferentes condições estudadas sendo considerado o uso do algoritmo <i>Color decovolution</i> em coloração imunoistoquímica com dupla marcação para E-caderina e Ki-67.....	32
Tabela 4	Relação estatística dos grupos dois a dois avaliada pelo teste de Kruskal-Wallis, quanto à expressão de E-caderina, baseando-se que a distribuição dos resultados não é normal pelo teste de D'Agostino & Pearson.....	34

Tabela 5	Percentual de pixels vermelhos (Ki-67) nas diferentes condições estudadas sendo considerado o uso do algoritmo <i>color decovolution</i> em coloração imunoistoquímica com dupla marcação para E-caderina e Ki-67.....	36
Tabela 6	Relação estatística dos grupos dois a dois avaliada pelo teste de Kruskal-Wallis, quanto à expressão de Ki-67, baseando-se que a distribuição dos resultados não é normal pelo teste de D'Agostino & Pearson.....	38
Tabela 7	Percentual de núcleos positivos marcados para Ki-67 nas diferentes condições estudadas sendo considerado o uso do algoritmo nuclear v1 em coloração imunoistoquímica.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DP	Desvio-padrão
Ecad	E-caderina
HE	Técnica histológica de Hematoxilina-Eosina
IP	Índice Proliferativo
LAG	Lesão de Alto Grau (correspondente às NICs II e III)
LBG	Lesão de Baixo Grau (correspondente à NIC I)
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
NIC	Neoplasia Intraepitelial Cervical
TEM	Transição Epitélio Mesenquimal

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Câncer de Colo do Útero	1
1.2	E-caderina	7
1.3	Índice Proliferativo	9
1.4	Fronte de invasão	11
1.5	Justificativa	12
2	OBJETIVOS	13
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1	Casuística.....	15
3.2	Imunoistoquímica	16
3.3	Imunofluorescência	25
3.3	Análise Estatística	26
4	RESULTADOS.....	28
4.1	Expressão de E-caderina	28
4.2	Proliferação celular.....	35
4.3	Análise subjetiva das marcações obtidas.....	40
4.3.1	Munofluorescencia	51
4.4	Perda de expressão de E-caderina e formação de brotos tumorais de invasão	54
5	DISCUSSÃO	56
6	CONCLUSÕES	63
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

ANEXOS

- Anexo 1** Aprovação do projeto no Comitê de Ética em Pesquisa
- Anexo 2** Valores de porcentagem de pixels encontrados para os marcadores E-caderina (marrom) e Ki-67 (vermelho) e número de células analisadas em ectocérvice normal utilizando-se o software ImageScope (Aperio)
- Anexo 3** Valores de porcentagem de pixels encontrados para os marcadores E-caderina (marrom) e Ki-67 (vermelho) e número de células analisadas em endocérvice normal utilizando-se o software ImageScope (Aperio)
- Anexo 4** Valores de porcentagem de pixels encontrados para os marcadores E-caderina (marrom) e Ki-67 (vermelho) e número de células analisadas em lesão de baixo grau utilizando-se o software ImageScope (Aperio)
- Anexo 5** Valores de porcentagem de pixels encontrados para os marcadores E-caderina (marrom) e Ki-67 (vermelho) e número de células analisadas em lesão de alto grau utilizando-se o software ImageScope (Aperio)
- Anexo 6** Valores de porcentagem de pixels encontrados para os marcadores E-caderina (marrom) e Ki-67 (vermelho) e número de células analisadas em *core* tumoral utilizando-se o software ImageScope (Aperio)
- Anexo 7** Valores de porcentagem de pixels encontrados para os marcadores E-caderina (marrom) e Ki-67 (vermelho) e número de células analisadas em frente de invasão tumoral utilizando-se o software ImageScope (Aperio)

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER DE COLO DE ÚTERO

O câncer do colo do útero é o terceiro tipo de câncer mais frequente entre as mulheres e permanece como importante problema de saúde em todo o mundo, com aproximadamente 500 mil novos casos e 230 mil óbitos anualmente. Para o Brasil, o número de novos casos esperado em 2012 foi de 17540, o que corresponde a um risco estimado de 17 casos a cada 100 mil mulheres (Ministério da Saúde 2011). A doença acomete pacientes adultas jovens desde a faixa etária de 20 a 29 anos e o risco subsequentemente aumenta rapidamente até atingir seu pico, geralmente na faixa etária de 50 a 60 anos (Ministério da Saúde 2011). É mais comum em mulheres que tiveram início precoce da vida sexual, particularmente antes dos dezesseis anos de idade, alta paridade, uso de contraceptivos hormonais e fumo, além de alguns fatores dietéticos e nutricionais (TYRING 2000; GUERRA et al. 2005). O problema se torna particularmente mais acentuado em países em desenvolvimento, tendo uma incidência duas vezes maior que em países desenvolvidos, sendo os casos diagnosticados em estádios relativamente avançados e a sobrevida média em cinco anos de apenas 41% (Ministério da Saúde 2009 2011).

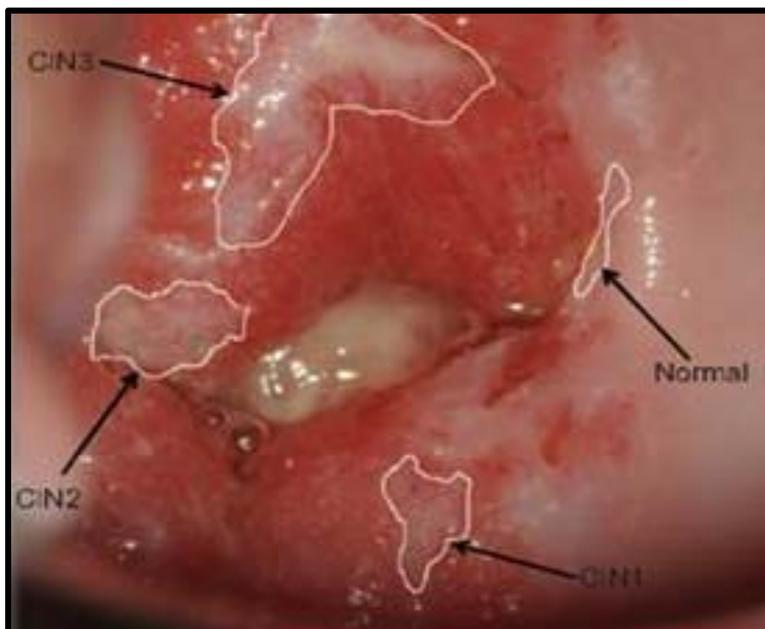
Está bem estabelecido que a infecção pelo vírus do papiloma humano (HPV) seja o fator causal central do câncer de colo uterino. Estudos recentes

demonstraram a presença do DNA do HPV em mais de 99,7% dos casos de câncer cervical (revisado por TYRING 2000).

Há mais de 100 tipos de HPV já relacionados (FRANCO et al. 2000), e desses apenas alguns (mais especificamente os tipos 16, 18, 31, 33, 39, 45, 52, 58 e 69) são mais representativos por serem considerados de alto risco, estando presentes com muita frequência nas lesões malignas. São produzidas pelo menos três proteínas com propriedades estimuladoras do crescimento e transformação – E5, E6 e E7 (ZUR HAUSEN 2000). A expressão das oncoproteínas virais e sua interação com fatores químicos e físicos de capacidade mutagênica podem contribuir para o desenvolvimento das modificações celulares que induzem o câncer (ZUR HAUSEN 2000). Sabe-se que as proteínas E6 e E7 dos tipos 16 e 18 do vírus podem induzir efeitos semelhantes ao que ocorre quando há mutação na p53, já que elas podem se ligar avidamente a p53 causando degradação da mesma (CAMBRUZZI 2005; TYRING 2000). A proteína E7 também se liga e inativa outro gene supressor de tumor, o pRb (ZUR HAUSEN 2000).

O câncer do colo uterino invasor, em cerca de 90% dos casos, evolui a partir de lesões intraepiteliais cervicais (NIC, neoplasia intraepitelial cervical), que por sua vez são divididas em lesões de baixo grau (NIC I) e de alto grau (NICs II e III) (Ministério da Saúde 2000). Essas lesões pré-invasivas ocorrem em áreas multifocais, e diferentes graus de NICs podem ser encontrados ao longo da junção escamo-colunar (GRIZZLE et al. 2011). Exames citopatológicos podem sugerir e diagnosticar a presença de tais lesões precursoras, sendo indicado o exame de colposcopia/biópsia caso as

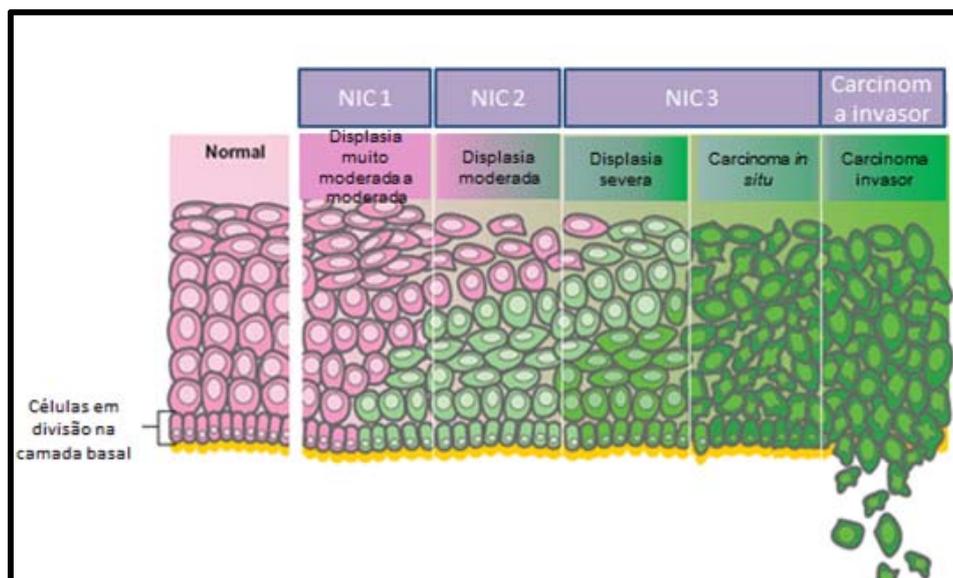
lesões sejam de alto grau, como demonstrado na Figura 1 (Ministério da Saúde 2000).



Fonte: SCHIFFMAN e WENTZENSEN (2010)

Figura 1 - Técnica de colposcopia com coloração aceto branca da cérvix. Através dessa técnica a cérvix é “corada” com uma solução de ácido acético a 5%. Quanto mais fortemente os tecidos se corarem de branco, significa que a região corada apresenta maior hiperqueratose, sendo assim é possível visualizar as lesões cervicais e demarcar os locais a serem biopsiados. Neste exemplo a paciente apresentou NICs I, II e III (representados por CIN1, CIN2 e CIN3, respectivamente).

Comparando-se as lesões histologicamente, pode-se observar que o número de células anormais e a área nuclear relativa aumentam conforme aumenta o grau da lesão (TAVASSOLI e DEVILEE 2003). Sendo assim, é possível observar que as lesões adquirem características que vão progressivamente se tornando mais semelhantes às do tumor invasivo (Figura 2).



Fonte: Center for Cancer Research in the Journals-CCR (2013)

Figura 2 - Representação das alterações histológicas observadas nos diferentes graus de neoplasias intraepiteliais cervicais (NICs) e no carcinoma invasivo. Podemos observar as atipias celulares e estruturais do epitélio se tornando mais acentuadas conforme aumenta o grau da lesão. Na NIC 3 (ou carcinoma *in situ*) o epitélio já perdeu a estratificação e a maior parte das células apresenta atipias. No carcinoma invasor há a invasão da membrana basal por estas células neoplásicas.

A NIC I, considerada de grau leve, apresenta alterações discretas e pode ser espontaneamente revertida, sendo que 75% dos casos sofreram regressão até uma segunda consulta (Ministério da Saúde 2000). Há presença de maturação nos dois terços superiores do epitélio e atipias variáveis, mas normalmente discretas, nas células superficiais. Podem ser encontradas anormalidades nucleares discretas. As figuras de mitose não são numerosas neste tipo de lesão, e quando presentes concentram-se no terço basal do epitélio. Na NIC II a maturação das células limita-se à metade superior do epitélio. As atipias nucleares são conspícuas tanto em camadas superiores quanto inferiores do epitélio. As figuras de mitose localizam-se

nos dois terços basais do epitélio e formas anormais podem ser encontradas. Na NIC III o tecido pode apresentar ausência de maturação, e até mesmo de ceratinização da superfície, ou esta maturação pode estar confinada apenas ao terço superior do epitélio. Há anormalidades nucleares marcantes por toda a extensão do epitélio e podem ser encontradas numerosas figuras de mitose em todos os níveis, sendo que são frequentes mitoses atípicas (TAVASSOLI e DEVILLEE 2003).

As metástases são responsáveis por aproximadamente 90% das mortes por câncer (MEHLEN e PUISIEUX 2006; LEBER e EFFERTH 2009). A cascata metastática compreende numerosos passos, incluindo o escape do local onde o tumor estava inicialmente localizado, penetração no estroma local, entrada nos vasos sanguíneos ou linfáticos, ligação às plaquetas, interação com endotélios e adesão aos mesmos, extravasamento, re-colonização e expansão (LIOTTA et al. 1991).

Em câncer do colo uterino as metástases ocorrem geralmente em linfonodos ou são loco-regionais e apenas pequena parcela das pacientes tem metástases a distância. Deste modo, a maioria das pacientes com carcinoma do colo do útero morre pelo avanço da doença loco-regional, havendo também complicações infecciosas frequentes após quimio/radioterapia. A capacidade de invasão local está relacionada à alterações da adesão celular e modificações do estroma subjacente. Nos carcinomas bem diferenciados, as células neoplásicas se organizam em forte adesão célula a célula e são polarizadas. Enquanto estas características teciduais são mantidas, o processo de invasão se dá em

grandes blocos, com a massa tumoral infiltrando como que “empurrando” a sub-mucosa e o crescimento é preferencialmente exofítico. Os tumores com maior capacidade de invasão apresentam menor adesão e se organizam em blocos menores de células, infiltrativos, com grande modificação do estroma. Este processo é altamente regulado pelas moléculas de adesão e metaloproteases (SOARES et al. 2006; CAMPOS et al. 2006). A fase inicial do processo em que as células tumorais evadem das estruturas organizadas dos tecidos para invadir locais mais distantes requer que as células passem por uma conversão fenotípica, e há muitos trabalhos que sugerem que a transição epitélio mesenquimal (TEM) seja o evento onde as células tumorais adquirem propriedades invasivas e migratórias (GOTZMANN et al. 2004; EVDOKIMOVA et al. 2009).

A transição epitélio-mesenquimal é reconhecida na biologia do desenvolvimento como um instrumento para efetivar as rápidas mudanças morfogênicas em embriões de metazoários (SHOOK e KELLER 2003), como na gastrulação, durante a qual as células do epitélio são internalizadas para dar origem ao tecido mesodérmico; e também na formação da crista neural, coração, sistema muscular, estruturas craniofaciais, e sistema nervoso periférico. A adesão celular é diretamente relevante nos eventos de TEM (THIERY e SLEEMAN 2006), sendo a sua perda o primeiro passo do processo. Um dos marcadores da TEM é a perda da expressão de E-caderina (Ecad), que é substituída por outros tipos de caderina, especialmente a N-caderina. Este fato é complementado pelo ganho de

marcadores mesenquimais (tais como a vimentina) e com isto há a modificação fenotípica das células neoplásicas (THIERY 2002).

1.2 E-CADERINA

A E-caderina é uma glicoproteína transmembrana dependente de cálcio que participa da formação das junções aderentes, desempenhando um papel importante na regulação da adesão intercelular em tecidos epiteliais de todos os órgãos, sendo altamente conservada entre as espécies (TAKEICHI 1991; ANDERSEN et al. 2005).

Sabe-se que a perda da expressão de E-caderina está relacionada ao fenótipo invasivo das células tumorais *in vitro* (HIROHASHI e KANAI 2003) e sua re-expressão leva a uma inibição da proliferação celular sendo, portanto, uma proteína supressora de tumor (GOTTARDI et al. 2001; HIROHASHI e KANAI 2003). Tem sido proposto também que ela atue mediando os eventos de inibição do crescimento por contato através de suas funções de adesão (PERRAIS et al. 2007). Células que se encontram com a expressão de E-caderina mantida geralmente estão em fase G0 e o fato de se encontrarem unidas pelas suas pontes intercelulares implicaria na restrição da possibilidade de entrar em ciclo celular (WU et al. 2003).

No entanto, há eventos no desenvolvimento normal em que células fortemente aderidas sofrem proliferação muito rápida (PERRAIS et al. 2007), o que não nos permite concluir que os efeitos antiproliferativos da E-caderina sejam devidos somente à adesão celular. Além disso, as caderinas têm outras importantes funções envolvendo reconhecimento célula-célula,

organização do citoesqueleto, transdução de sinais, locomoção de uma célula sobre a outra, polaridade epitelial e controle do crescimento (ANGST et al. 2001; JEANES et al. 2008).

Uma dessas outras funções da Ecad é a capacidade desta proteína regular a sinalização da via Wnt canônica através de sua interação com a beta-catenina. Essa regulação da via Wnt representaria um mecanismo para a regulação da proliferação celular e progressão tumoral mediado por Ecad (KUPHAL e BEHERENS 2006; JEANES et al. 2008). Há também outras conhecidas vias de sinalização oncogênica que são ativadas através da perda de expressão de Ecad, como MAPK, Ras, Rac1 (WIJNHOVEN et al. 2000; SOTO et al. 2008), e perda de sinalização da via Hippo (KIM et al. 2011).

Há diversos mecanismos conhecidos pelos quais pode ocorrer a perda de Ecad nos tumores, como clivagem anormal da proteína, perda de heterozigose, mutações somáticas, hipermetilação da região promotora ou repressão da transcrição (CHRISTOFORI 2006; DE WEVER et al. 2008).

A perda da expressão de Ecad permite a transgressão do limite da membrana basal e disseminação pelas células tumorais (PERL et al. 1998). Isso se torna claro frente à observação que a perda de Ecad é progressiva à medida que a gravidade da lesão intra-epitelial avança (FALEIRO-RODRIGUES e LOPES 2004). FLATLEY et al. (2009) demonstraram que a metilação da região promotora do gene *CDH1* (que codifica para a E-caderina), é mais significativa à medida que ocorre a progressão do

carcinoma do colo do útero, sendo máxima nos tumores invasivos quando comparados com os diversos níveis de NICs.

Um ponto bastante interessante é que aparentemente as alterações da expressão de Ecad são um fato bastante precoce na carcinogênese, ocorrendo no primeiro evento de adaptação celular da junção escamo-colunar, que é a metaplasia escamosa (HERFS et al. 2008). Este fato pode ser observado morfológicamente, pois as células basais de um epitélio hiperplásico perdem expressão de E-caderina. Este efeito se deveria não à hipermetilação da região promotora, mas sim à super-expressão de SNAIL, um conhecido repressor da expressão de Ecad e marcador de transição epitélio mesenquimal (TEM) (HERFS et al. 2008).

1.3 ÍNDICE PROLIFERATIVO

O índice proliferativo (IP) é uma medida do comportamento biológico dos tumores que se aplica desde o início da patologia cirúrgica. O reconhecimento de que neoplasias malignas têm IP elevado e que a presença de figuras de mitose atípicas são características de neoplasias malignas é realizado desde o início do século. A contagem de mitoses faz parte de muitos esquemas de classificação do grau de malignidade de diversos tumores e, mesmo subjetiva, é de aplicação diária na patologia diagnóstica.

A elevada taxa de proliferação, no entanto, parece não ser constante durante todo o processo tumoral. No momento em que a célula tumoral

começa a alterar seu comportamento para um fenótipo mesenquimal (durante a TEM), há expressão de proteínas que atuam inibindo a proliferação celular. Sendo assim, o aumento da proliferação, importante para o início e manutenção do tumor primário, seria substituído por inibição do crescimento nas células de carcinoma em circulação e em órgãos secundários, o que favoreceria um fenótipo mais maligno (EVDOKIMOVA et al. 2009).

Marcadores de ciclo celular têm sido utilizados como um auxílio na contagem de mitoses em diversos tipos tumorais e, neste sentido, a determinação da expressão de Ki-67 é um importante marcador dentre os atualmente utilizados.

O Ki-67 é uma proteína nuclear não histônica pertencente a uma família de antígenos MPM-2. Ela é fosforilada durante a mitose e está associada com a condensação dos cromossomos e separação das cromátides irmãs (KAUSCH et al. 2003), estando presente em todas as fases da divisão celular, e sendo totalmente degradada em até uma hora após o término da divisão. A avaliação de sua expressão através de imunistoquímica pode ser utilizada para se estimar os índices de proliferação de um tumor.

No desenvolvimento de lesões intraepiteliais, a expressão de Ki-67 pode ser encontrada nas camadas intermediária e superficial do epitélio, e quanto maior o número de células positivas, e mais distantes elas estiverem da membrana basal, maior o grau da lesão (CAMBRUZZI et al. 2005).

Em um trabalho analisando carcinoma invasivo de colo uterino e suas lesões precursoras (NICs de graus I, II e III) e também cervicite crônica inespecífica, CARVALHO (2006), demonstrou que quanto maior o grau da lesão, os índices de positividade para Ki-67 eram maiores e a expressão de E-caderina era menor, comparando-se os diferentes estágios de lesão analisados. Entretanto, neste trabalho não foram observadas a co-expressão destes marcadores e tampouco sua relação com o fronte de invasão.

1.4 FRONTE DE INVASÃO

O fronte de invasão, ou interface tumor-hospedeiro, é um interessante alvo de estudo, já que em muitos tumores é nele que ocorrem vários eventos moleculares importantes na disseminação tumoral. Além disso, sua avaliação é muito relevante na avaliação do prognóstico dos pacientes (revisado em BRYNE et al. 1998). Denominam-se *tumour buddings*, ou brotamentos tumorais, as células isoladas ou grupos de menos do que cinco células tumorais indiferenciadas na margem invasiva do tumor (UENO et al. 2002).

A avaliação de *buddings* tumorais foi proposta em 1987 e desde então vem obtendo grande aceitação por parte dos patologistas, sendo considerada uma propriedade da TEM, estando associada à ocorrência de metástases em linfonodo e à distância (GINGER et al. 2012). A presença de *buddings* está ainda associada a pouca diferenciação tumoral, estágio avançado e diminuição da sobrevida pós-operatória em câncer endometrial.

Há muitos estudos que apontam a sua avaliação como uma ferramenta promissora para se utilizar na rotina clínica (KANAZAWA et al. 2008; GINGER et al. 2012; KOYUNCUOGLU et al. 2012).

1.5 JUSTIFICATIVA

Trabalhos de nosso grupo demonstraram que a análise do fronte de invasão pode ser importante fator prognóstico no carcinoma epidermóide do pênis (GUIMARÃES et al. 2006). Mais importante, quando é realizada a comparação entre a perda de E-caderina nestes tumores, a perda é mais evidente no fronte de invasão do que no tumor como um todo e que esta perda maior no fronte de invasão correlaciona-se com o índice de metástases em linfonodo e expressão de vimentina (dados não publicados). Este tipo de análise ainda não foi realizado em carcinomas de colo do útero e pode trazer um melhor entendimento do processo que ocorre no fronte de invasão destes tumores. A hipótese a ser testada é que a perda de E-caderina é mais intensa no fronte de invasão do tumor quando comparado às demais porções do tumor e que, por conseguinte, estas células tem índice proliferativo mais elevado quando comparado com o tumor como um todo, realçando que o fenótipo de TEM está melhor representado nesta área do tumor e que assim deve ser estabelecido quando da análise das biópsias e peças cirúrgicas.

2 OBJETIVOS

Frente ao exposto, o objetivo do presente trabalho é avaliar a expressão da E-caderina e o índice de proliferação medido pela marcação nuclear de Ki-67 nos epitélios normais, lesão de baixo grau, lesão de alto grau e carcinoma epidermóide invasor no centro do tumor e frente de invasão com o objetivo de observar a correlação entre estes dois marcadores.

Para tal será avaliado:

1. quantificação da expressão de E-caderina nos epitélios normais, lesão de baixo grau, lesão de alto grau e carcinoma epidermóide invasor;
2. quantificação do índice proliferativo nos epitélios normais, lesão de baixo grau, lesão de alto grau e carcinoma epidermóide invasor;
3. relação entre a expressão dos marcadores E-caderina e Ki-67 nos epitélios normais, lesão de baixo grau, lesão de alto grau e carcinoma epidermóide invasor;
4. avaliação qualitativa da relação da expressão da E-caderina e Ki-67 pela dupla marcação imunoistoquímica;
5. avaliação da relação da expressão da E-caderina e a formação de brotamentos de células no frente de invasão da neoplasia

A principal hipótese de trabalho é de que a perda da adesão celular representada pela diminuição da expressão de E-caderina, que é um indicador da transição epitélio-mesenquimal, favorece a proliferação celular nas diferentes situações da progressão carcinogénica do carcinoma do colo do útero.

3 MATERIAL E METODOS

3.1 CASUÍSTICA

O presente estudo compreende a análise de casos representativos de ectocérvix normal, endocérvix normal, lesões intraepiteliais de baixo e alto grau e carcinoma invasor de colo do útero provenientes de 70 pacientes tratadas no A.C. Camargo Cancer Center no período de 1983 a 2009. As lâminas e blocos de parafina dos casos estudados foram resgatados do Arquivo do Departamento de Anatomia Patológica. Todos os casos foram provenientes de histerectomia ou conização e não foram selecionados casos de biópsia para análise. As lâminas representativas dos epitélios normais e lesões foram selecionadas e revistas por um patologista e a distribuição do número de lesões analisadas está no Quadro 1.

Quadro 1 - Número de casos analisados conforme o diagnóstico histopatológico.

Diagnóstico	Número de Casos analisados
Ectocérvix histologicamente normal	20
Endocérvix histologicamente normal	25
Lesão intraepitelial de Baixo Grau	22
Lesão intraepitelial de Alto Grau	44
Carcinoma Epidermóide invasivo	43

O projeto foi conduzido de forma retrospectiva, sem contato com os pacientes, utilizando blocos de parafina arquivados no Departamento de Anatomia Patológica do A.C. Camargo Cancer Center. Nenhum dos blocos se esgotou e material residual está disponível para eventuais questões clínicas. Desta forma, o projeto foi apresentado ao Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição, com a solicitação de dispensa do termo de consentimento livre e esclarecido. Foi aprovado pelo mesmo em reunião de 26 de outubro de 2010, estando registrado sob o número 1468/10 (Anexo 1).

3.2 IMUNOISTOQUÍMICA

Novos cortes foram obtidos por microtomia mecânica usual, corados por hematoxilina/eosina (HE) para a revisão do caso, sendo que os cortes subsequentes se destinaram para as reações de imunistoquímica.

A reação imunistoquímica foi realizada seguindo os protocolos padronizados do Departamento de Anatomia Patológica do A.C. Camargo Cancer Center (vide detalhes abaixo). Os cortes de 3 μ m de espessura foram submetidos à reação imunistoquímica automatizada no equipamento Ventana Benchmark (USA) utilizando anticorpos anti-Ki-67 (Ventana-Roche, USA), e anti-E-Cadherin (BD Biosciences, USA). As características de cada anticorpo podem ser vistas no Quadro 2. Como controles positivos foram utilizados: tecido fixado de tonsila humana para o anticorpo anti-Ki-67 e um caso de carcinoma ductal invasor de mama para o anticorpo anti-E-caderina. Foram também realizados conjuntamente controles negativos, com a

retirada do anticorpo primário. As lâminas foram submetidas à dupla marcação para a demonstração simultânea dos dois antígenos. Como a E-caderina tem expressão na membrana celular e o Ki-67 é de marcação nuclear, estas duas marcações são facilmente visualizadas pelo sistema cromogênico. Para tal foram utilizados dois cromógenos distintos, a peroxidase/diaminobenzidina e fosfatase alcalina/vermelho permanente. Um exemplo do controle da dupla marcação pode ser visto na Figura 3, em corte de tonsila, onde os centros germinativos demonstram marcação nuclear vermelha e o epitélio demonstra a marcação de membrana marrom.

Quadro 2 - Características dos anticorpos utilizados e seus controles.

Antígeno	Marca	Catálogo	Clone	Espécie	Imunogênic	Isotipo	Concentração
Ki-67	Ventana / Roche	790-4286	30-9	Coelho	Porção C- terminal	NI*	Pré-diluído
E-caderina	BD - Biosciences	610181	36 / E-cadherin	Coelho	Porção C- terminal	IgG2a, K	250 µg/ml

*, NI: não informado

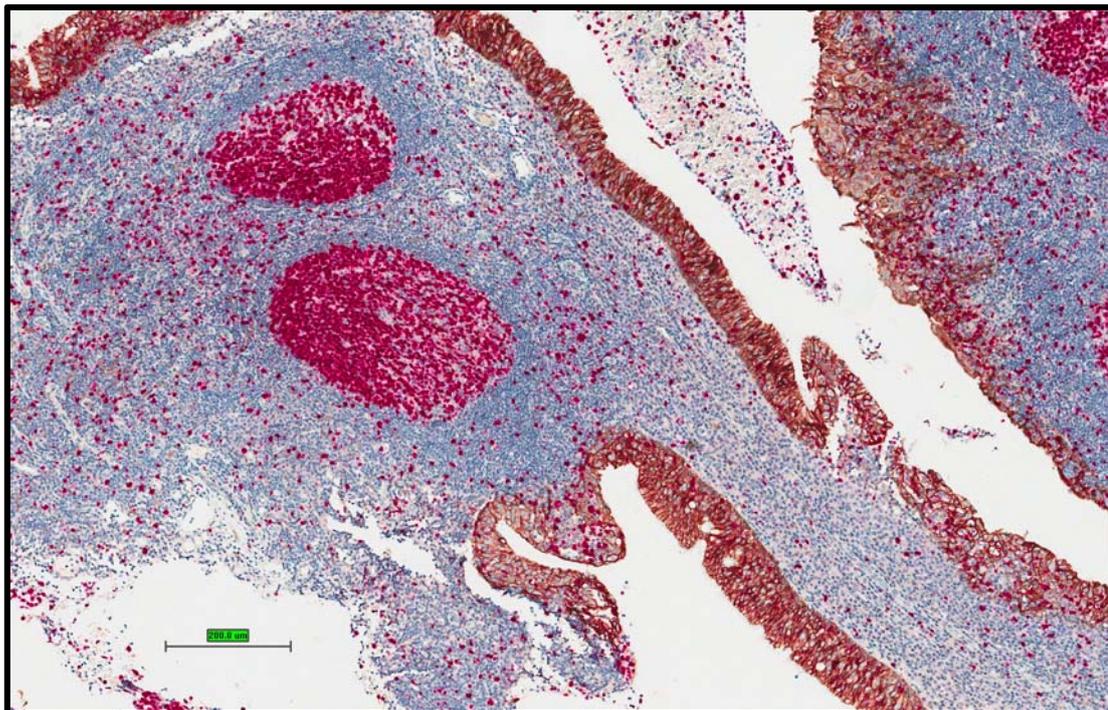


Figura 3 - Imagem representativa de dupla marcação imunohistoquímica para E-caderina (marrom) e Ki-67 (vermelho) em amostra de tonsila palatina.

As reações de imunohistoquímica foram realizadas de acordo com protocolo estabelecido após a padronização dos anticorpos testados. Inicialmente os tecidos foram desparafinizados utilizando a solução *EZPrep* e as lâminas foram aquecidas a 75°C por 8 minutos. A recuperação antigênica foi realizada aplicando a solução *Cell Conditioner* por 8 minutos a 95°C seguido por incubação de 64 minutos a 100°C. As lâminas foram lavadas com a solução *Reaction buffer* e incubadas por 4 minutos nessa mesma solução, seguida da inibição realizada por uma gota de *UV INHIBITOR* nas lâminas por 4 minutos, seguida de lavagem por *Reaction Buffer*. A seguir foram aplicados 100 μ L do anticorpo anti-E-caderina previamente diluído e transferido para um *Prep Kit* (dispensador capaz de ser preenchido com anticorpos diluídos). As lâminas então foram incubadas

por 32 minutos e depois uma nova lavagem com *Reaction buffer*. A revelação da reação foi realizada através da aplicação da solução *UV HRP UNIV MULT* nas lâminas e incubação de 8 minutos. Após outra lavagem com a solução *Reaction buffer*, as lâminas foram incubadas por 8 minutos com uma gota de *UV DAB* e uma gota de *UV DAB H2O2*, lavadas com *Reaction buffer* e, após incubação com uma gota de *UV COPPER* por 4 minutos, foram novamente lavadas com *Reaction buffer*. Todos os reagentes, exceto o anticorpo primário, foram de origem da Ventana/Roche (USA).

Para a efetivação da dupla marcação, a reação foi continuada depois da aplicação da gota de *UV COPPER*. As lâminas foram novamente aquecidas a 90°C por 4 minutos e a 37°C por mais 4 minutos. Foi então aplicada uma gota do anticorpo *CONFIRM Ki-67* e incubado por 16 minutos. Após o tempo de incubação as lâminas foram lavadas com *Reaction buffer* e foi aplicada uma gota de *UV Red UNIV MULT* seguido por incubação por 12 minutos. As lâminas foram lavadas com *Reaction buffer* e aplicada uma gota de *UV Red Enhancer* seguido por incubação por 4 minutos, depois uma gota de *UV Fast Red A* e uma gota de *UV Red Naphthol* e incubado por 8 minutos então uma gota de *UV Fast Red B* foi aplicada e incubada por 8 minutos. Após a incubação foi feita uma lavagem com *Reaction buffer* e aplicada uma gota de *hematoxillin II* e incubado por 8 minutos. As lâminas foram lavadas com *Reaction Buffer* e foi aplicada uma gota de *Bluing reagent* e incubadas por 4 minutos e então a última lavagem com *Reaction buffer*. Todos os reagentes utilizados nas reações descritas são marca

registrada Ventana/Roche (USA). As lâminas que foram submetidas à reação de dupla marcação não passaram pelo processo de desidratação em álcool porque interfere na coloração com fosfatase alcalina. Assim as lâminas são desidratadas em estufa a 60°C por 30 minutos e depois montadas de forma automatizada no equipamento Tissue-Tek® Prisma®/Film® (SAKURA).

A leitura das lâminas foi realizada no aparelho *Aperio Scancope XT*, da Aperio (Vista, CA, EUA). Este é constituído por um microscópio automatizado, com uma lente objetiva de 20x, acoplado a uma câmara com resolução de 50.000 *pixels* por polegada (0,5 µm por *pixel*) e a um software de computador que analisa as lâminas de acordo com parâmetros pré-estabelecidos. Os algoritmos utilizados para analisar a dupla marcação foram o *membrane v1*, que detecta marcações em membrana celular, *nuclear v1*, para a contagem de núcleos positivos para a proteína Ki-67, e *ColorDeconvolution*, que decompõe as imagens em canais diferentes de acordo com uma calibração prévia, possibilitando a marcação de ambos os padrões de marcação conforme configuração de porcentagens de pixels. Detalhes sobre o “*hardware*” e “*software*” do APERIO SCANSCOPE XT são avaliáveis no site (www.aperio.com). De forma resumida, este algoritmo permite que os espectros de pixels sejam decompostos em três diferentes cores: azul, vermelho e marrom. Frente à seleção de uma área, o software analisa qual a porcentagem de pixels em cada um dos espectros. No presente caso, a marcação da Ecad foi feita em marrom e do Ki-67 em vermelho. O procedimento é explicado a seguir:

Antes de iniciar a análise das imagens, foi realizada a calibração do algoritmo ditando as cores bases e seus tons que devem ser identificadas por cada canal. Para tal foi feita a calibração onde cada sistema de visualização foi utilizado, sem a contra-coloração. Desta forma obteve-se uma lâmina apresentando apenas uma marcação revelada com o *iVIEW DAB Detection* e outra por *Enhanced Alkaline Phosphatase Red Detection*. As regiões que apresentavam positividade foram selecionadas no software e os valores obtidos de cada lâmina usados para a calibração do algoritmo.

Após calibrar o algoritmo, a análise das lâminas foi feita em duas etapas. A primeira etapa foi selecionar as áreas correspondentes ao fronte de invasão. Feita a seleção, no algoritmo foi feita a escolha dos canais correspondentes para E-caderina, ou seja, o canal que reconhecerá o padrão de cor do DAB e correspondente para Ki-67, canal que reconhecerá o padrão de cor da fosfatase alcalina. Na segunda etapa, foi feita a seleção das regiões correspondentes ao centro do tumor e em seguida a escolhas dos canais, como procedido no fronte de invasão.

A análise feita pelo algoritmo *ColorDeconvolution* é baseada na intensidade e número de pixels positivos de acordo com o espectro de cor previamente determinado. O resultado da análise é automaticamente dividido em três categorias principais e pré-determinadas pelo software: fraco positivo, médio positivo e forte positivo e um escore que é determinado por uma equação que agrupa todas as categorias. Para efeito de análise, decompunha-se a cor e o resultado era expresso na porcentagem de pixels positivos para as cores vermelha e marrom. Considerando-se que o Ki-67 é

um marcador nuclear (em vermelho) e a E-caderina é um marcador de membrana (marrom), o resultado foi expresso em termos de porcentagem para cada cor correspondente. Exemplos da subtração de cores realizada pelo *Color Deconvolution* podem ser vistas nas Figuras 4, 5 e 6.

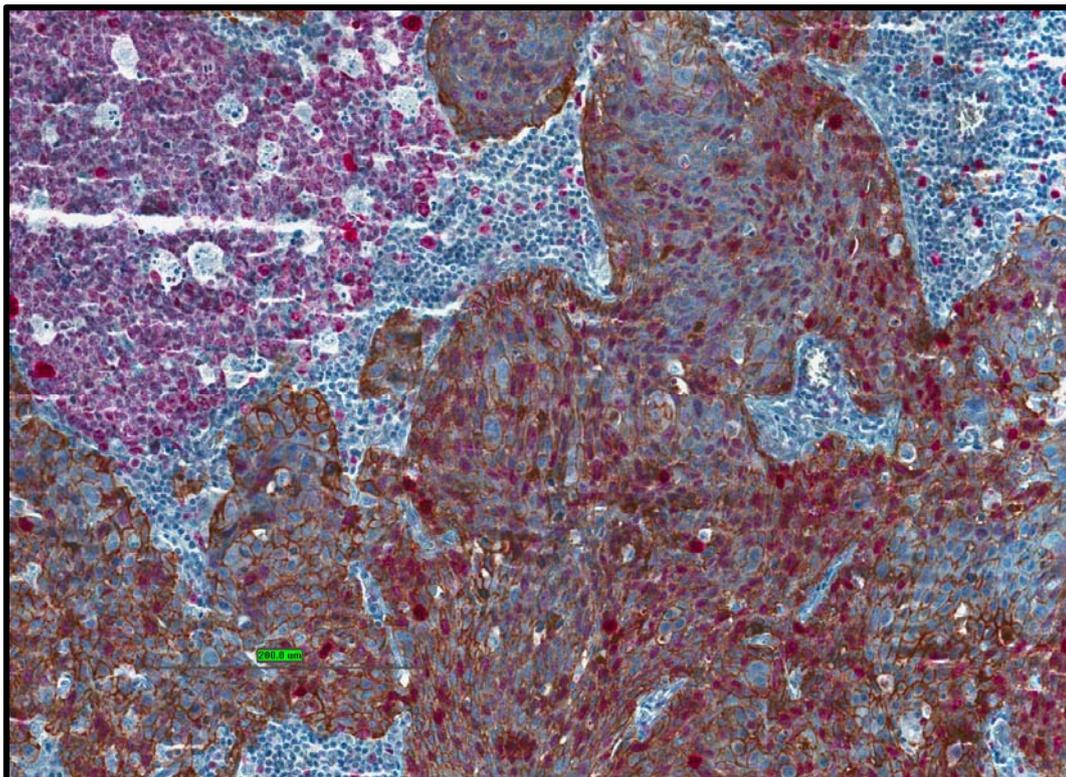


Figura 4 - Imagem representativa de dupla marcação imunohistoquímica para E-caderina (marrom) e Ki-67 (vermelho), visualizada no *software* ImageScope.

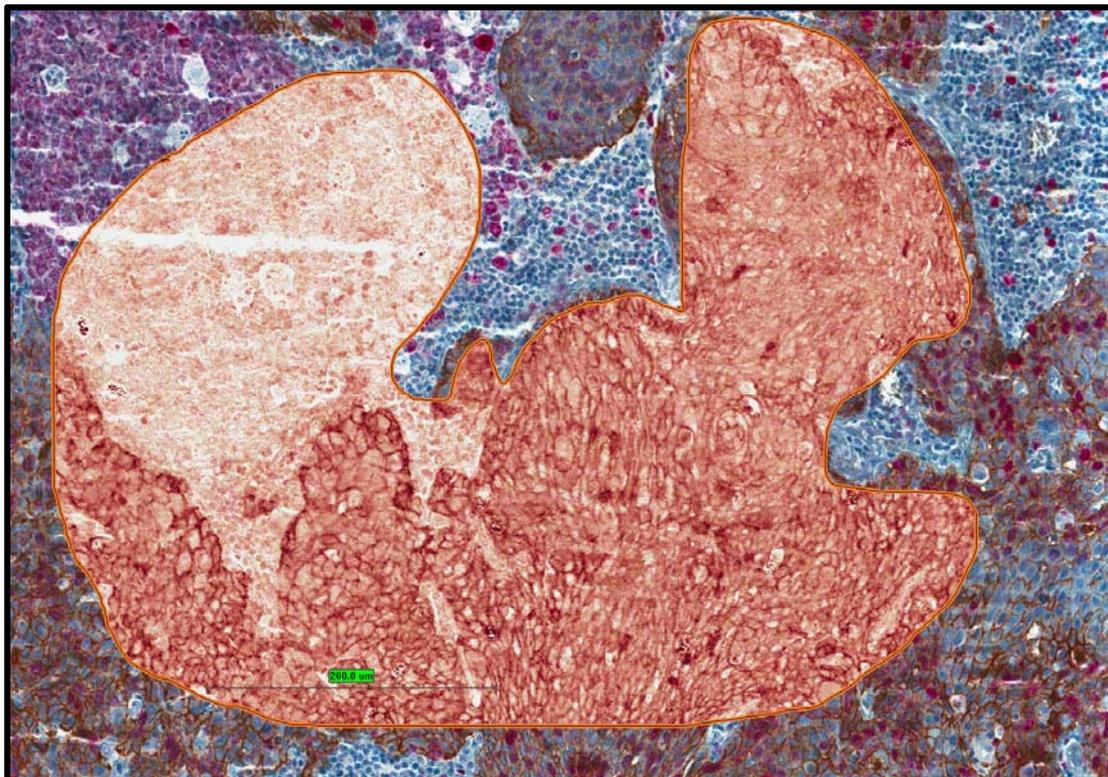


Figura 5 - Demonstração da subtração de cores realizada pelo software ImageScope (algoritmo *Color Deconvolution*), demonstrando os *pixels* marrons na imagem representada na Figura 4, correspondentes às áreas positivas para E-caderina.

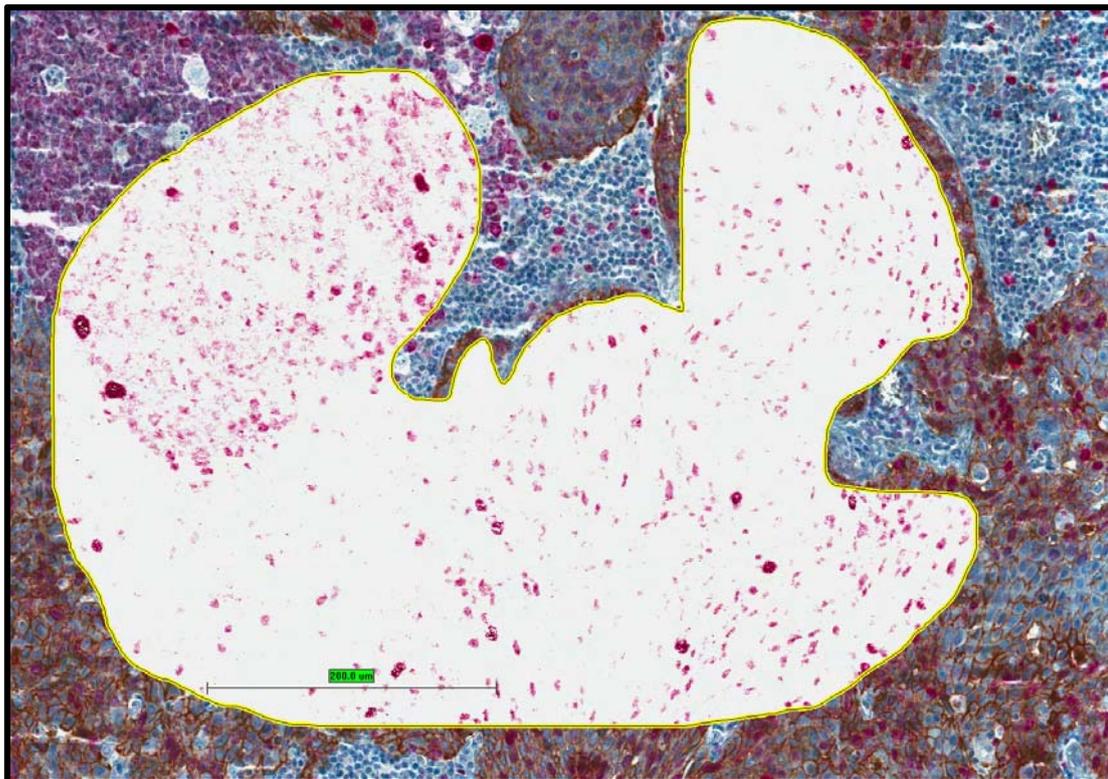


Figura 6 - Demonstração da subtração de cores realizada pelo software ImageScope (algoritmo *Color Deconvolution*), demonstrando os *pixels* vermelhos na imagem representada na Figura 4, correspondentes às áreas positivas para Ki-67.

A parte central do tumor foi definida como as áreas tumorais de grande extensão e de preferência mais centrais em relação à massa tumoral. O fronte de invasão foi definido como a porção mais infiltrativa do tumor, constituído por pequenos blocos de células tumorais, com até 20 células. Todos os brotamentos presentes no corte histológico foram considerados.

Em todas as análises realizadas sempre foram consideradas mais do que 1000 células. A média de células medidas em média (variação) foram: ectocérvice normal: 5150 células (1299-18479), endocérvice: 2703 (1206-

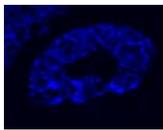
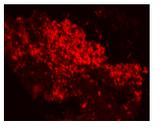
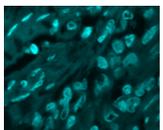
5896), lesão de baixo grau: 5595 (1206-17914), lesão de alto grau: 7356 (1060-38849), carcinoma invasor, centro do tumor: 10416 (1792-39956); e carcinoma invasor, frente de invasão: 2893 (1093-14766).

3.3 IMUNOFLUORESCÊNCIA

Dentre os casos de carcinoma invasor, foram selecionados 15 casos para a realização técnica de imunofluorescência. Na técnica de imunofluorescência indireta utilizada, foi realizada a desparafinização do material aderido às lâminas, submetendo-as a banhos de xilol frio, seguidos de banhos em álcool, hidróxido de amônio e lavagem em água e *wash buffer* Dako. Foi realizada a recuperação antigênica, em panela de pressão, em solução de TRIS/EDTA de pH= 9.0, e lavagens em água comum, seguida de água destilada, e então em PBS. A seguir foi feita a incubação do anticorpo primário por 16 horas a 4°C. Foi realizada a incubação com o anticorpo secundário fluorescente, com o segundo anticorpo primário, e com o segundo anticorpo secundário fluorescente, intercalando estas incubações com lavagens em *wash buffer*. No quadro 3 estão resumidos os marcadores utilizados para esta técnica.

As lâminas foram analisadas em microscópio confocal Fluoview FV10i (Olympus).

Quadro 3 - Marcadores utilizados na técnica de imunofluorescência.

Marcação		Anticorpo secundário	Visualização	
	Anticorpo primário			
	Anti-E-caderina humana produzido em coelho (clone EP700y), Epitomics	Cy 5 produzido em camundongo anti coelho	Azul escuro	
	Anti-Ki67 humano produzido em camundongo (clone MIB-1), Dako	Alexa fluor 594 produzido em cabra anti camundongo	Vermelho alaranjado	
DAPI- Liga-se a regiões ricas em A-T, sendo um bom marcador de ácidos nucleicos e consequentemente, de núcleos celulares.	Presente no meio de montagem Vectashield		Azul claro	

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para caracterização dos resultados foram utilizados dados de frequências absoluta (N) e relativa (%), média, mediana, valores máximo e mínimo e desvio padrão dentro da descrição da casuística do estudo.

Para a comparação da expressão das proteínas entre os grupos os resultados foram inicialmente comparados pelo teste D'Agostino/Person para se avaliar a normalidade da distribuição dos resultados e nenhuma das condições se mostrou com distribuição normal. Uma vez avaliado que a distribuição não era gaussiana, foram aplicados os teste de Kruskal-Wallis, de múltiplas comparações de Dunn e de Mann-Whitney comparando os grupos dois a dois. Quando comparados todos os grupos foi utilizado o teste

one-way analysis of variance. O nível de significância adotado é de 5% para todos os testes. As análises foram realizadas utilizando-se o software GraphPad Prism versão 5.02 para Windows (GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com).

4 RESULTADOS

Os casos seleccionados de ectocérvice normal, endocérvice normal, lesões de baixo grau (NIC I), lesões de alto grau (NIC II + NIC III) e de carcinomas epidermóides invasores foram avaliados e os resultados completos caso a caso e lesão por lesão podem ser vistos nos Anexos 2 a 7. Os casos de carcinoma epidermóide invasor tiveram duas análises, em seu frente de invasão e na porção central da neoplasia.

4.1 EXPRESSÃO DE E-CADERINA

A medida de expressão de E-caderina é avaliada pela percentagem de células que perderam a expressão. Para esta comparação não se levou em conta a intensidade da expressão sendo consideradas positivas as células com intensidade de 3+ 2+ e 1+. A opção por se dividir estes resultados em apenas duas categorias (positivo e negativo), independente da intensidade da expressão foi baseada na hipótese que a perda da expressão está relacionada com a proliferação celular. Os resultados comparativos podem ser apreciados na Tabela 1.

Tabela 1 - Perda de expressão de E-caderina nas diferentes condições estudadas sendo consideradas apenas as células negativas ao uso do algoritmo *membrane_v1* em coloração imunohistoquímica com dupla marcação para E-caderina e Ki-67

Diagnóstico Histopatológico	Média de Células Negativas (%) ± DP	Mediana de Células Negativas
Ectocérvice histologicamente normal	2,55±2,08	2,49
Endocérvice histologicamente normal	4,88±5,12	3,80
Lesão de Baixo grau	3,78±3,71	2,68
Lesão de Alto Grau	0,68±1,27	0,41
Carcinoma Epidermóide, região central	2,21±4,89	0,55
Carcinoma Epidermóide Frente de invasão	11,69±10,65	9,91

Estes resultados foram inicialmente comparados pelo teste D'Agostino/Person para se avaliar a normalidade da distribuição dos resultados e nenhuma das condições se mostrou com distribuição normal. Uma vez avaliado que a distribuição não era gaussiana, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis que mostrou uma distribuição de medianas com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,0001$). Quando comparado os grupos dois a dois pelo teste de múltiplas comparações de Dunn, observou-se que o frente de invasão da neoplasia tem expressão diminuída de E-caderina com quase todas as outras condições, exceto a endocérvice histologicamente normal. Outras diferenças incluem ectocérvice histologicamente normal com lesão de alto grau, endocérvice histologicamente normal com lesão de alto grau e centro do tumor, e lesão de baixo grau com lesão de alto grau. As demais relações não mostraram diferenças significantes. Quando aplicado o

teste de Mann-Whitney comparando os grupos dois a dois observou-se que as condições neoplásicas sempre diferem dos epitélios normais e da lesão de baixo grau; que lesão de alto grau difere de quase todos os grupos, exceto o centro da neoplasia; há diferença significativa quando se compara o centro da neoplasia com o fronte de invasão, sendo que neste a perda da expressão de E-caderina máxima. As relações estatísticas dois a dois pelo teste de Mann-Whitney podem ser vistas na Tabela 2. Os resultados em relação à perda de expressão de E-caderina podem ser vistos na Figura 7.

Tabela 2 - Relação estatística dos grupos dois a dois avaliada pelo teste de Mann-Whitney, quanto à perda de expressão de E-caderina, baseando-se que a distribuição dos resultados não é normal pelo teste D'Agostino/Person

	<i>Ecto</i>	<i>Endo</i>	<i>LBG</i>	<i>LAG</i>	<i>CEC – Centro</i>	<i>CEC - Fronte</i>
Ecto	XXX	n.s.	n.s.	<0,0001	=0,0263	<0,0001
Endo	n.s.	XXX	n.s.	<0,0001	<0,0001	=0,0003
LBG	n.s.	n.s.	XXX	<0,0001	=0,0015	<0,0001
LAG	<0,0001	<0,0001	<0,0001	XXX	n.s.	<0,0001
CEC – Centro	=0,0263	<0,0001	=0,0015	n.s.	XXX	<0,0001
CEC - Fronte	<0,0001	=0,0003	<0,0001	<0,0001	<0,0001	XXX

Ecto: ectocérvice histologicamente normal; Endo: endocérvice histologicamente normal; LBG: lesão de baixo grau; LAG: lesão de alto grau; CEC – Centro: carcinoma epidermóide invasor, centro da neoplasia; CEC – fronte: carcinoma epidermóide invasor, fronte de invasão da neoplasia; n.s.: não significativa.

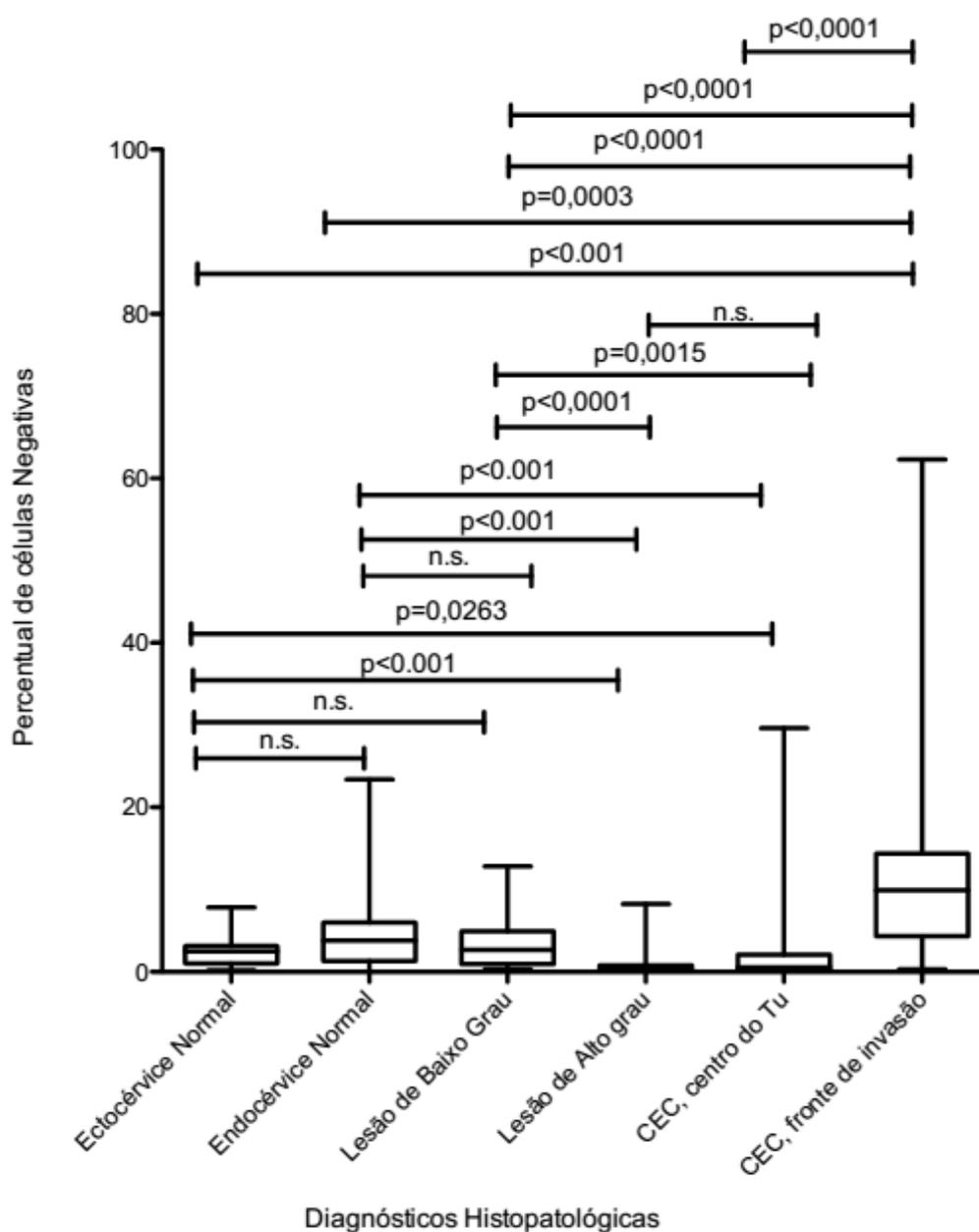


Figura 7 - Perda da expressão de E-caderina nas diferentes condições estudadas, sendo considerado apenas as células negativas.

A expressão de E-caderina foi analisada também de outra maneira, através do programa *Color deconvolution*, onde a porcentagem de pixels marrons é demonstrada. Os resultados em relação a esta análise podem ser

vistos na Tabela 3. Esta maneira reproduz os resultados obtidos pela análise de coloração de membrana com as mesmas relações estatísticas. Os resultados detalhados podem ser vistos na Tabela 3 e Figura 8, além dos Anexos 2 a 7.

Tabela 3 - Percentual de pixels marrons (E-caderina) nas diferentes condições estudadas sendo considerado o uso do algoritmo *Color decovolution* em coloração imunoistoquímica com dupla marcação para E-caderina e Ki-67

Diagnóstico Histopatológico	Média de Pixels Marrons (%) \pm DP	Mediana de Pixels Marrons Positivos
Ectocérvice histologicamente normal	96,60 \pm 2,79	97,49
Endocérvice histologicamente normal	94,92 \pm 1,95	95,13
Lesão de Baixo Grau	96,79 \pm 2,25	96,79
Lesão de Alto Grau	98,81 \pm 0,91	98,81
Carcinoma Epidermóide, região central	97,82 \pm 1,90	97,82
Carcinoma Epidermóide Frente de invasão	94,45 \pm 2,49	94,45

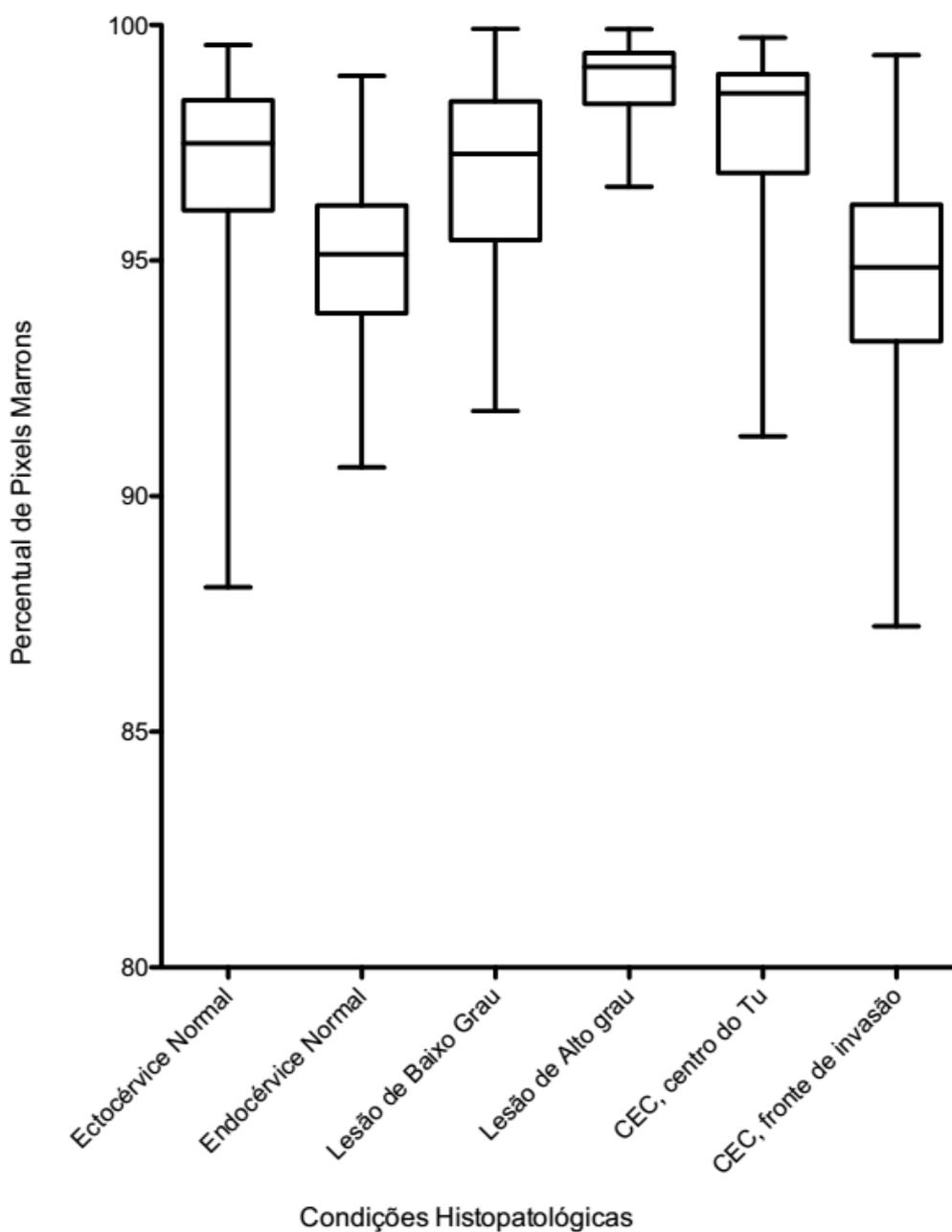


Figura 8 - Percentual de *pixels* marrons (E-caderina), nas diferentes condições estudadas, medido pelo algoritmo *Color Deconvolution*.

Estes resultados quando comparados pelo teste *one-way analysis of variance* mostrou diferenças significativas. Os grupos que menos tinham *pixels* correspondentes à expressão de E-caderina (cor marrom) foram a

endocérvice normal e o fronte de invasão dos carcinomas invasores. A lesão de baixo grau também mostra menor expressão e isto se deve à ceratinização superficial. A lesão de alto grau e a ectocérvice normal são as que mantêm os maiores índices de pixels marrons. Os grupos comparados dois a dois pelo teste de comparação de Bonferroni mostrou que a lesão de alto grau é similar ao centro do tumor, mas é diferente de todas as demais condições e há diferenças significativas entre o centro do tumor e o fronte de invasão. Pela análise do teste de Mann-Whitney estes resultados se repetem conforme pode ser visto na Tabela 4.

Tabela 4 - Relação estatística dos grupos dois a dois avaliada pelo teste de Mann-Whitney, quanto à expressão de E-caderina, baseando-se que a distribuição dos resultados não é normal pelo teste de D'Agostino & Pearson

	Ecto	Endo	LBG	LAG	CEC – Centro	CEC - Frente
Ecto	XXX	<0,0001	n.s.	<0,0001	=0,0208	=0.0005
Endo	<0,0001	XXX	=0,0027	<0,0001	<0,0001	n.s.
LBG	n.s.	=0,0027	XXX	<0,0001	=0,0316	=0,0004
LAG	<0,0001	<0,0001	<0,0001	XXX	=0,0021	<0,0001
CEC – Centro	=0,0208	<0,0001	=0,0316	=0,0021	XXX	<0,0001
CEC – Frente	=0.0005	n.s.	=0,0004	<0,0001	<0,0001	XXX

Ecto: ectocérvice histologicamente normal; Endo: endocérvice histologicamente normal; LBG: lesão de baixo grau; LAG: lesão de alto grau; CEC – Centro: carcinoma epidermóide invasor, centro da neoplasia; CEC – frente: carcinoma epidermóide invasor, frente de invasão da neoplasia; n.s.: não significante.

4.2 PROLIFERAÇÃO CELULAR

Inicialmente a proliferação celular foi avaliada pela dupla coloração E-caderina/Ki-67, onde o antígeno Ki-67 foi identificado através de marcação pela cor vermelha. Na análise, foi utilizado o algoritmo *Color decovolution* para identificar o percentual de pixels vermelhos nas diferentes condições histopatológicas.

Os resultados podem ser vistos na Tabela 5 e Figura 9. Estes resultados quando comparados pelo teste *one-way analysis of variance* mostraram diferença significativa. Os grupos comparados dois a dois pelo teste de comparação de Bonferroni mostrou que somente há diferenças entre a lesão de alto grau e todas as demais condições, sendo que nesta a proliferação celular foi máxima. Todas as demais comparações não foram significantes. Embora não tenha alcançado significância estatística, nota-se que há discretamente mais pixels vermelhos no centro da neoplasia e que este percentual cai no fronte de invasão do tumor e a comparação mostra uma tendência à significância ($p=0,0580$).

Tabela 5 - Percentual de pixels vermelhos (Ki-67) nas diferentes condições estudadas sendo consideradas o uso do algoritmo *color decovolution* em coloração imunoistoquímica com dupla marcação para E-caderina e Ki-67

Diagnóstico Histopatológico	Média de Pixels Vermelhos (%) \pm DP	Mediana de Pixels Vermelhos Positivos
Ectocérvice histologicamente normal	1,06 \pm 0,9	0,79
Endocérvice histologicamente normal	0,50 \pm 0,25	0,47
Lesão de Baixo grau	1,13 \pm 0,63	1,02
Lesão de Alto Grau	7,97 \pm 7,56	6,20
Carcinoma Epidermóide, Região Central	2,16 \pm 2,70	1,15
Carcinoma Epidermóide Frente de Invasão	1,33 \pm 1,57	0,65

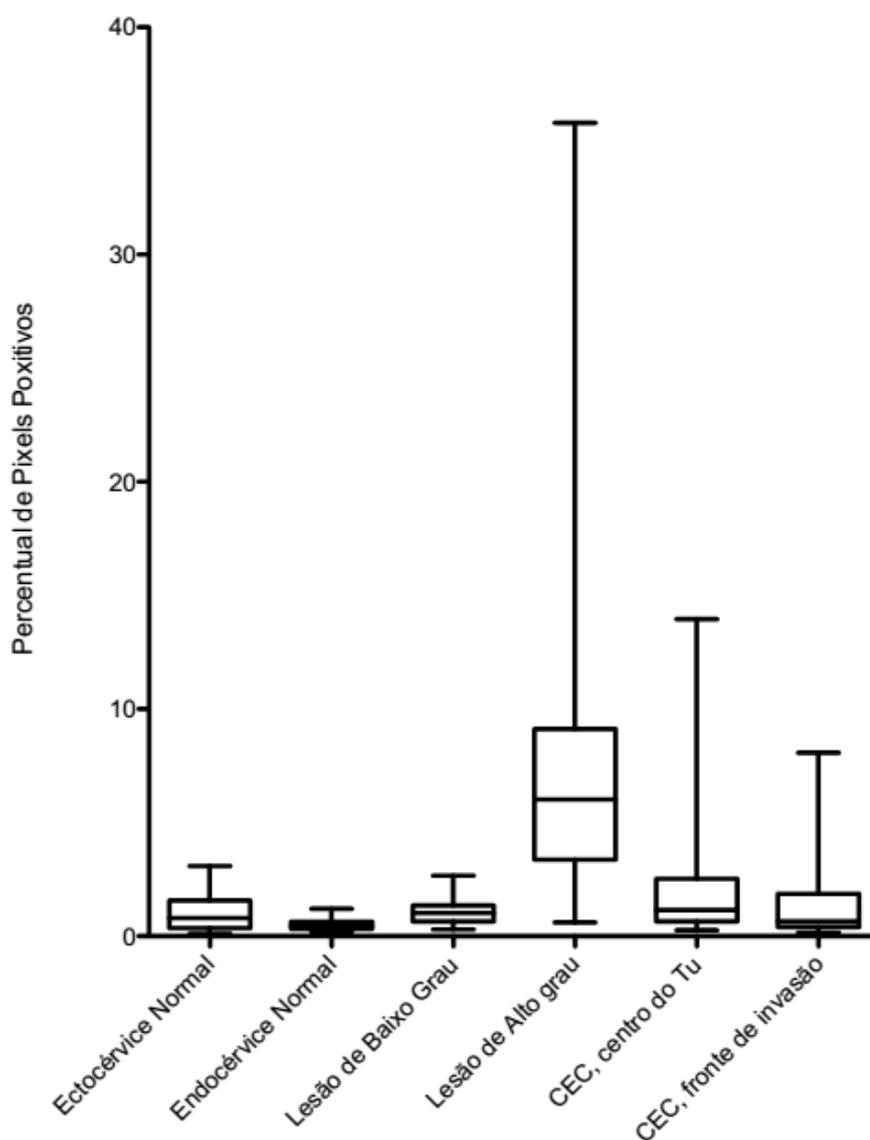


Figura 9 - Percentual de *pixels* vermelhos (Ki-67), nas diferentes condições estudadas, medido pelo algoritmo *Color Deconvolution*.

Pela análise do teste de Mann-Whitney estes resultados se repetem conforme pode ser visto na Tabela 6. Há uma marcada diferença entre o índice de *pixels* vermelhos na lesão de alto grau quando comparado com os demais grupos e com o índice proliferativo entre a endocérvice e demais condições.

Tabela 6 - Relação estatística dos grupos dois a dois avaliada pelo teste de Mann-Whitney, quanto à expressão de Ki-67, baseando-se que a distribuição dos resultados não é normal pelo teste de D'Agostino & Pearson

	Ecto	Endo	LBG	LAG	CEC – Centro	CEC - Frente
Ecto	XXX	=0.0456	n.s.	<0,0001	n.s.	n.s.
Endo	=0.0456	XXX	<0,0001	<0,0001	<0,0001	=0,0077
LBG	n.s.	<0,0001	XXX	<0,0001	n.s.	n.s.
LAG	<0,0001	<0,0001	<0,0001	XXX	<0,0001	<0,0001
CEC – Centro	n.s.	<0,0001	n.s.	<0,0001	XXX	=0,0580
CEC - Frente	n.s.	=0,0077	n.s.	<0,0001	=0,0580	XXX

Ecto: ectocérvice histologicamente normal; Endo: endocérvice histologicamente normal; LBG: lesão de baixo grau; LAG: lesão de alto grau; CEC – Centro: carcinoma epidermóide invasor, centro da neoplasia; CEC – frente: Centro: carcinoma epidermóide invasor, frente de invasão da neoplasia; n.s.: não significativa.

Frente aos resultados obtidos, foi decidido avaliar o número de núcleos positivos para o antígeno Ki-67 em coloração isolada. Para tal, foram selecionados 28 casos que eram observadas áreas de lesões de alto grau e o carcinoma invasor. Nesta última área foram feitas, através do algoritmo nuclear (Aperio), as medidas no centro do tumor e no frente de invasão. Os resultados podem ser apreciados na Tabela 7. Como pode ser visto na Figura 10 as comparações estatísticas feitas grupo a grupo são todas fortemente significantes.

Tabela 7 - Percentual de núcleos positivos marcados para Ki-67 nas diferentes condições estudadas sendo considerado o uso do algoritmo nuclear v1 em coloração imunoistoquímica

Diagnóstico Histopatológico	Porcentagem de Núcleos Positivos (%) ± DP	Mediana de Núcleos Positivos (%)
Lesão de Alto Grau	52,72±19,27	52,48
Carcinoma Epidermóide, Região Central	34,84±19,10	32,04
Carcinoma Epidermóide Frente de Invasão	25,29±15,08	21,02

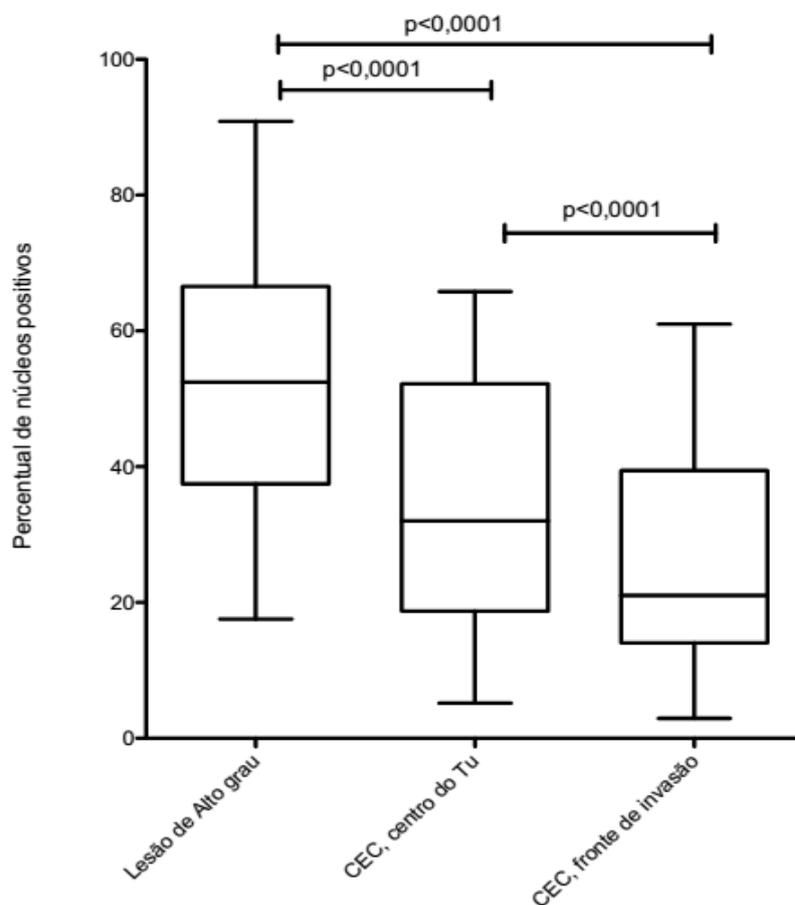


Figura 10 - Percentual de núcleos marcados por Ki-67 nas lesões de alto grau, centro do carcinoma epidermóide invasivo e no frente de invasão da neoplasia, avaliados pelo algoritmo *nuclear1*.

4.3 ANÁLISE QUALITATIVA DAS MARCAÇÕES OBTIDAS

Uma vez comentadas as relações estatísticas numéricas torna-se importante mencionar alguns aspectos subjetivos oriundos da observação dos cortes histológicos e das marcações imunoistoquímicas. As medidas objetivas são extremamente importantes, mas por vezes elas não refletem todo o fenômeno biológico por se analisar grande número de células e porque os algoritmos utilizados incluem um espectro de positividade muito alto.

Quando se observa a ectocérvice normal observa-se que praticamente todas as células expressam E-caderina. A mediana obtida pelo algoritmo foi de 97%. Estas cerca de 3% que não expressam E-caderina representam a camada ceratinizada, que é na verdade constituída por células mortas e portanto sem E-caderina expressa. Evitamos a inclusão desta camada sempre que possível, mas obviamente o desenho da área nem sempre é perfeito. Este aspecto pode ser visto nas Figuras 11 e 24. Na ectocérvice histologicamente normal, cerca de 61% das células apresentam marcação de 3+ e cerca de 35% tem marcação fraca (1+) e menos que 1% das células tem marcação em grau intermediário (2+).



Figura 11 - Imagem representativa de ectocérvice histologicamente normal com dupla marcação para E-caderina (marrom) e Ki-67 (vermelho). Barra: 200 μ m.

O outro tecido normal analisado foi a endocérvice histologicamente normal. Embora cerca de 96% das células expressem E-caderina, e este número não seja diferente daquele observado na ectocérvice histologicamente normal, a marcação é muito diferente. Como se trata de um epitélio cilíndrico uniestratificado, a marcação é geralmente lateral. Sem expressão de E-caderina no pólo apical. Além disso, menos do que a metade das células a expressam em categoria 3+ (47%) e há cerca de 16% das células com marcação de 2+ e 32% com marcação fraca. Exemplo da marcação na endocérvice histologicamente normal pode ser vista na Figura 12.

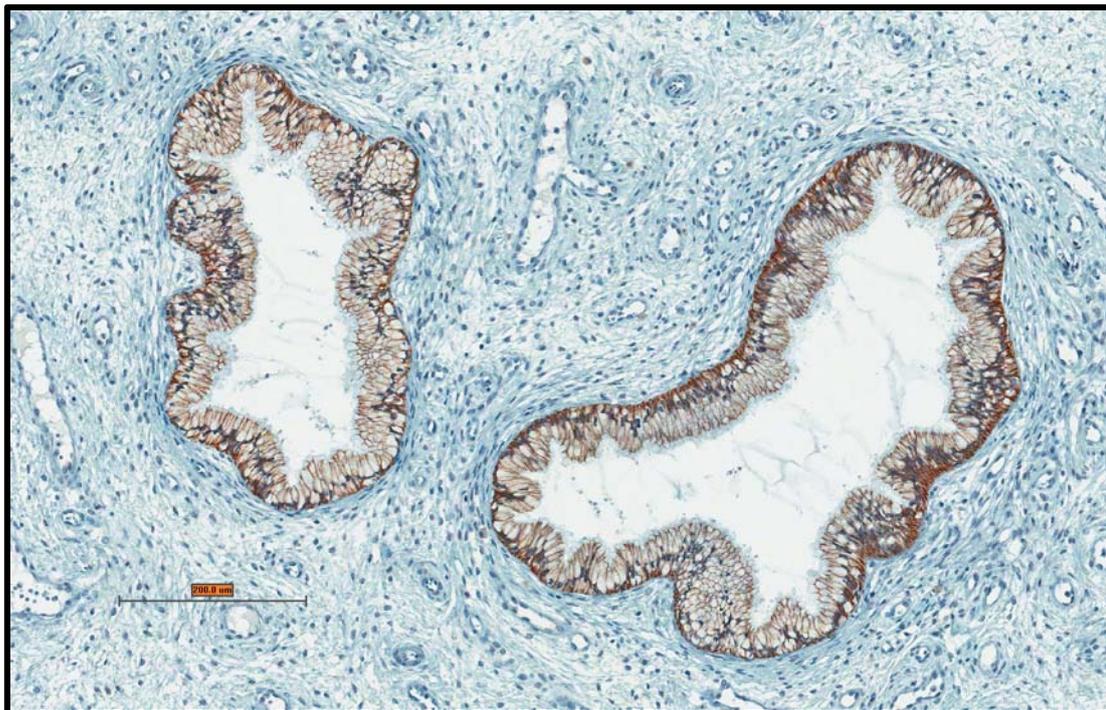


Figura 12 - Imagem representativa de endocérvice histologicamente normal com dupla marcação para E-caderina (marrom) e Ki-67 (vermelho). Barra: 200 μ m.

Na lesão de baixo grau a marcação é muito similar àquela vista na ectocérvice normal, mas com mais células expressando marcação do tipo 2+. Mas praticamente todas as células expressam E-caderina e somente a camada superficial ceratinizada não a expressa.

Os dados mais interessantes estão no carcinoma *in-situ* (ou lesão de alto grau). Neste a expressão de E-caderina é máxima, com virtualmente todas as células expressando o marcador. Um exemplo significativo pode ser visto na Figura 13.

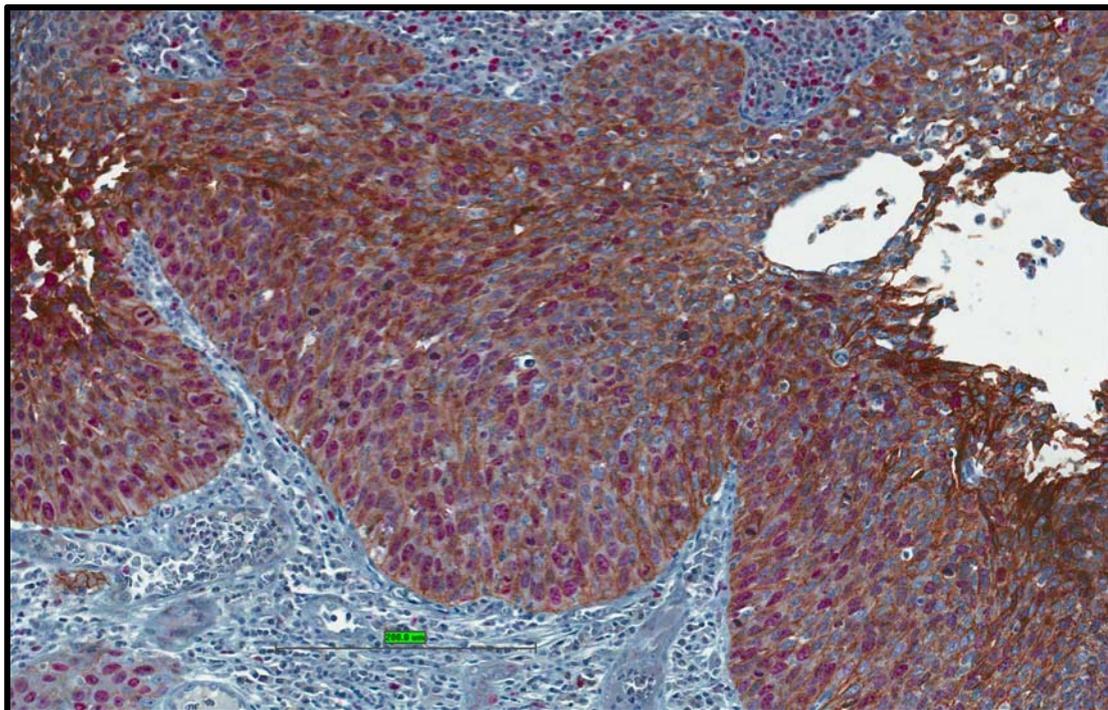


Figura 13 - Imagem representativa de lesão de alto grau demonstrando intensa marcação para E-caderina (marrom) e para Ki-67 (vermelho). Barra: 200 μ m.

A intensidade da marcação, comparativamente maior em relação ao carcinoma invasor, pode ser vista na Figura 14.

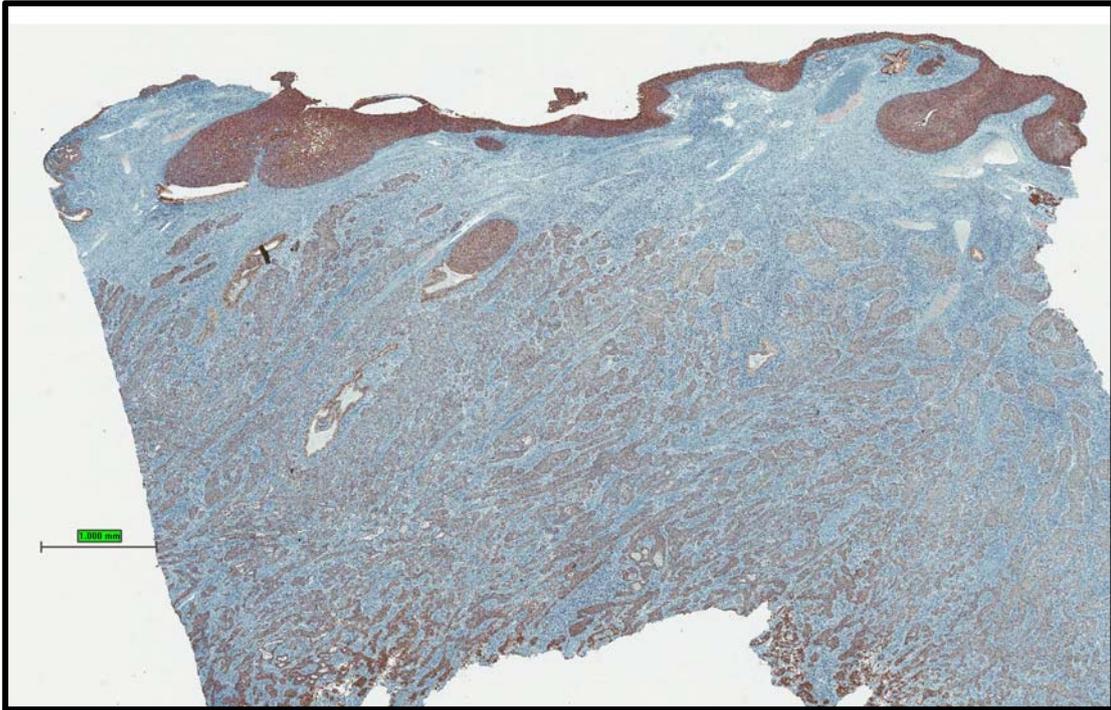


Figura 14 - Imagem representativa de amostra de carcinoma *in situ* e tumor invasivo subjacente. Observar a diferença na intensidade de marcação entre o carcinoma *in situ* e o tumor invasivo subjacente. Mesmo na disseminação pagetóide das glândulas endocervicais, a marcação é mais forte. Barra: 200 μ m.

Ainda um aspecto interessante é quando ocorrem áreas de invasão isoladas adjacentes ao carcinoma *in-situ*. Claramente há uma diminuição da intensidade da expressão, bem como a marcação deixa de ser anel completo (Figura 15).

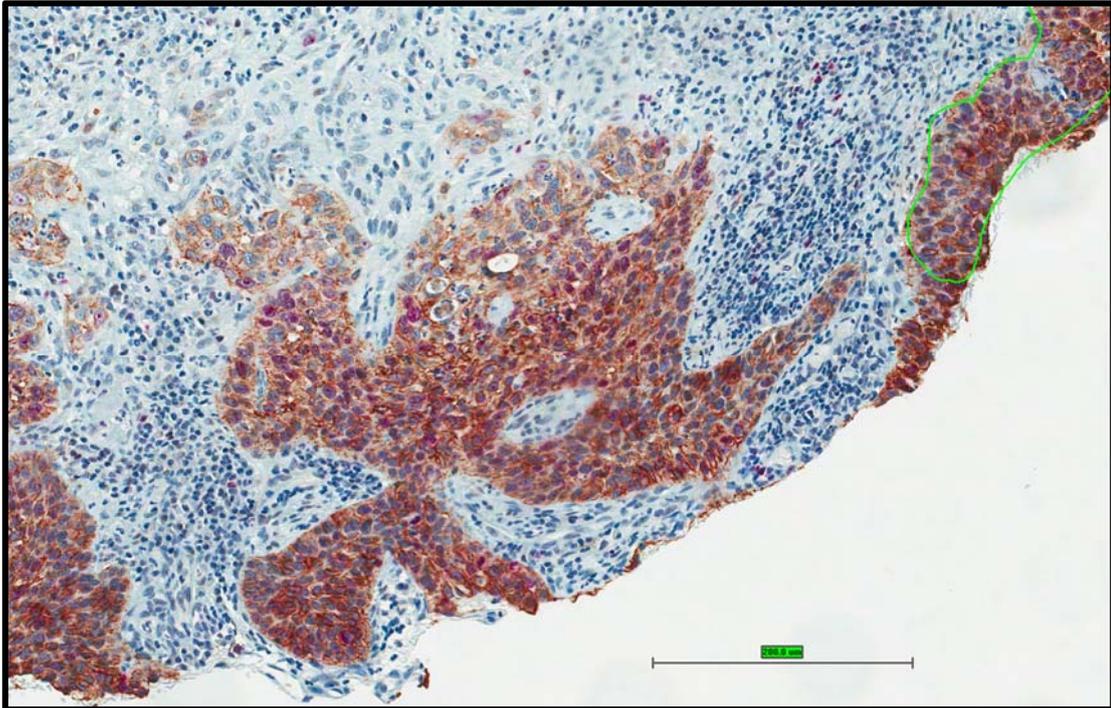


Figura 15 - Imagem representativa de amostra de carcinoma *in situ*, com área de microinvasão. Observar a perda da expressão de E-caderina nos focos de invasão. Barra: 200 μ m.

No carcinoma epidermóide invasor, no centro do tumor, a marcação geralmente é bastante homogênea entre os blocos. Entretanto, quando há perda evidente da expressão de E-caderina, esta ocorre nas células que se encontram formando a camada basal dos blocos tumorais e nas células mais indiferenciadas (Figuras 16 e 17).

O algoritmo marca as células fortemente positivas em vermelho e as fracamente positivas em amarelo. Notar que na Figura 16, as células marcadas em amarelo estão distribuídas na periferia do nódulo.

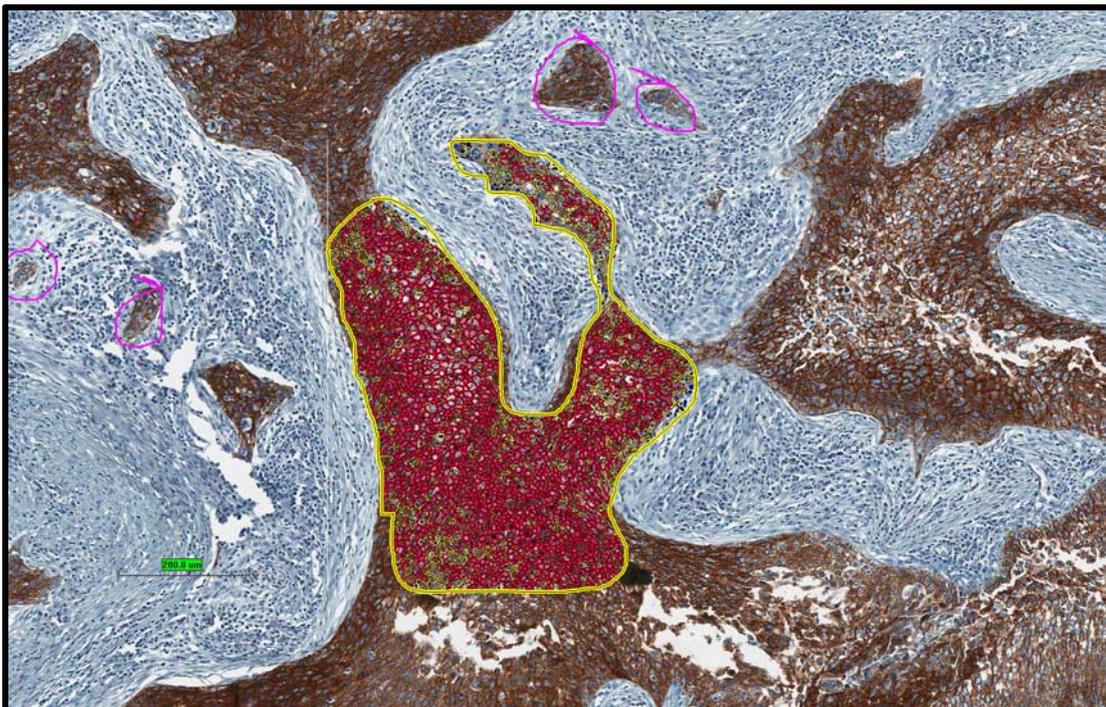


Figura 16 - Imagem representativa de amostra de carcinoma invasor com grande bloco e brotamento de invasão. Notar que as células marcadas em amarelo se situam principalmente na periferia do bloco. Pode-se observar também diminuição na intensidade de marcação nos brotamentos (marcados em rosa). Barra: 200 μ m.

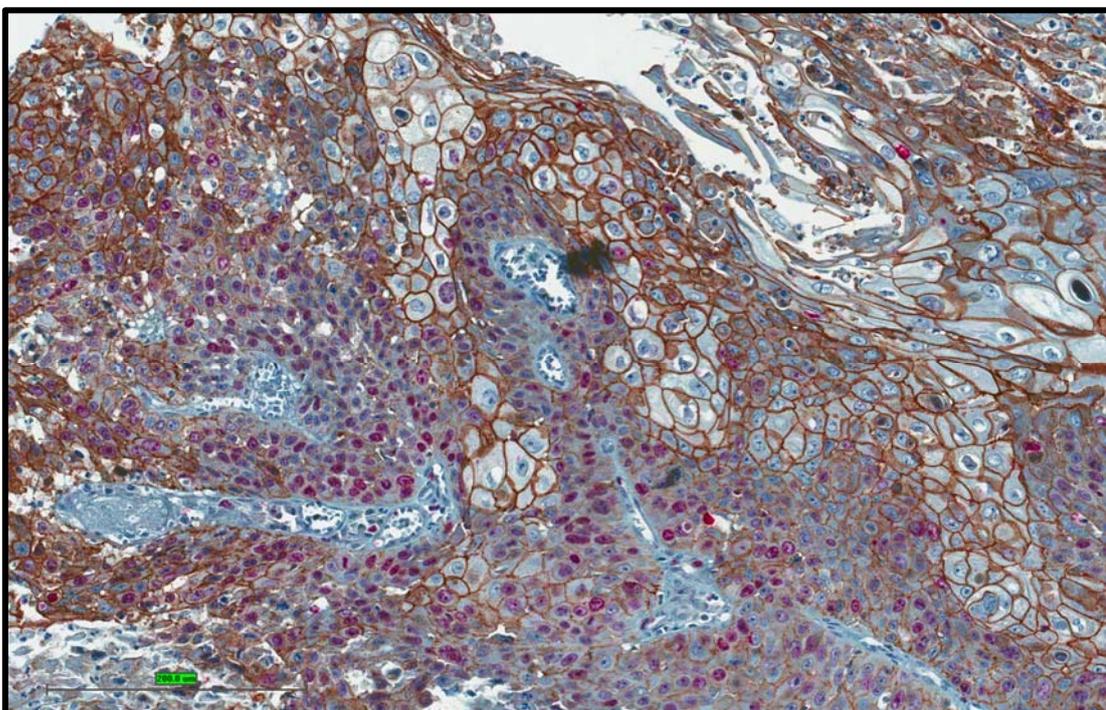


Figura 17 - Imagem representativa de amostra de carcinoma invasor. Notar que a expressão de E-caderina (marrom) predomina nas regiões mais diferenciadas e periféricas, enquanto que a proliferação celular (vermelho) localiza-se predominantemente na periferia do bloco tumoral. Barra: 200 μ m.

Finalmente, é bastante claro que no fronte de invasão há diminuição da expressão de E-caderina. As Figuras 18 e 19 demonstram claramente este efeito. A formação de pequenas projeções dentro de um bloco tumoral na área de invasão demonstra menos expressão de E-caderina e isto se manifesta nos resultados quando se analisa o fronte de invasão.

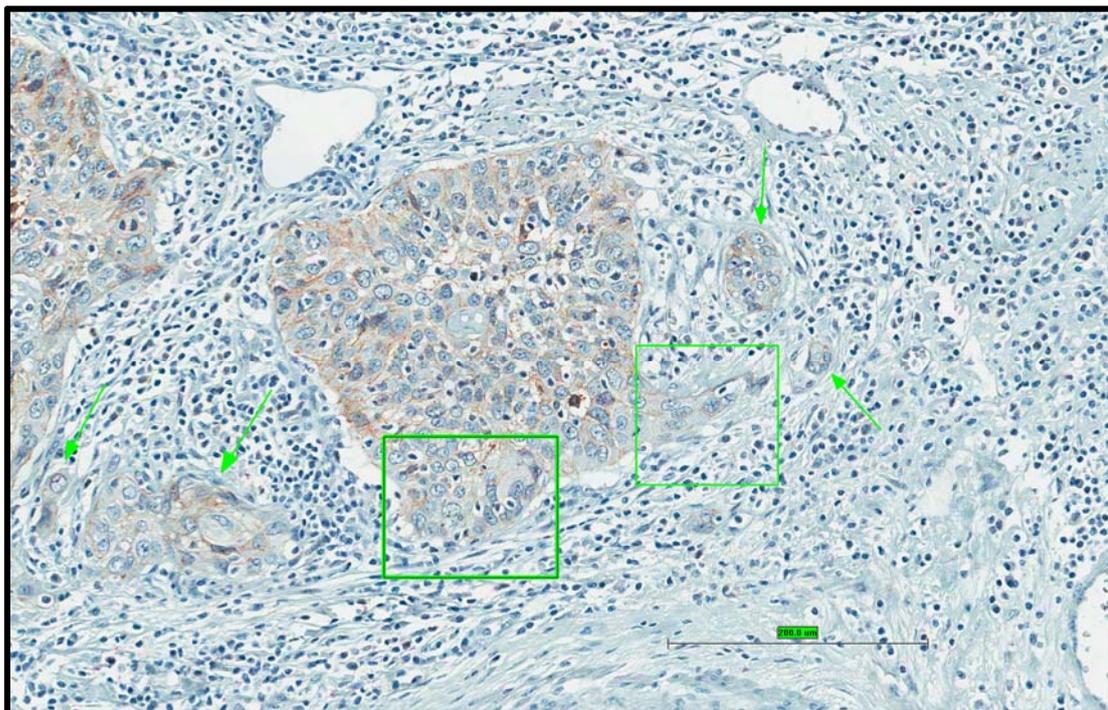


Figura 18 - Imagem representativa de amostra de carcinoma epidermóide invasor. Observar perda da expressão de E-caderina nos brotamentos e pequenos blocos invasores.

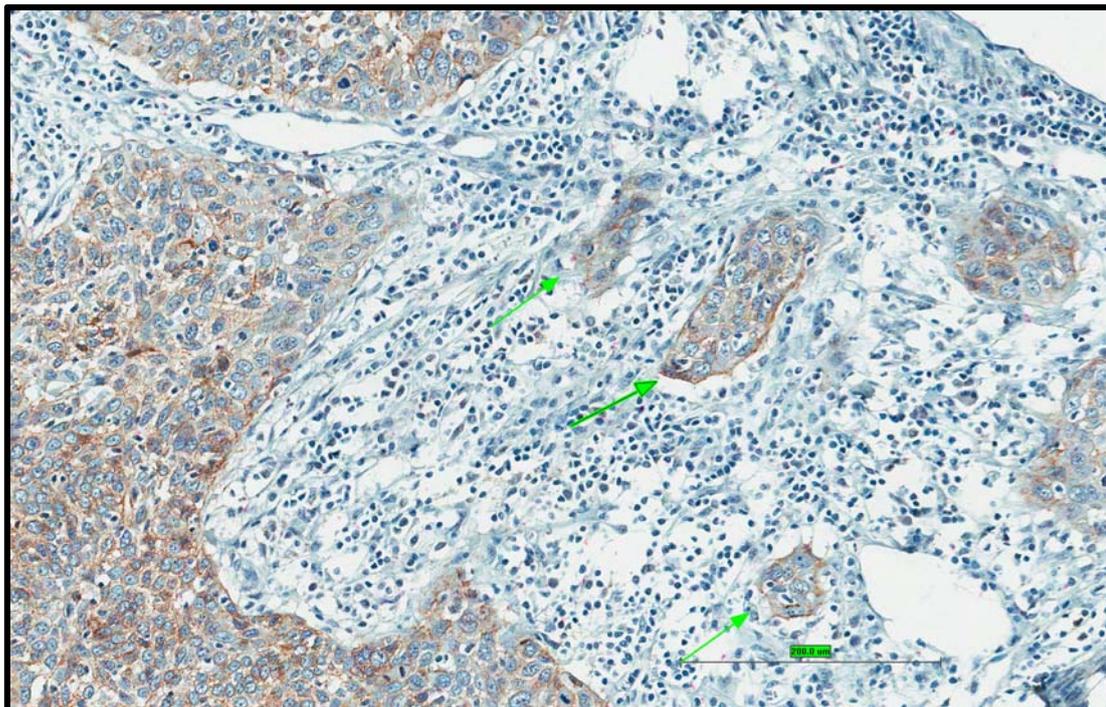


Figura 19 - Imagem representativa de amostra de carcinoma epidermóide invasor. Observar perda da expressão de E-caderina nos pequenos blocos invasores.

A relação entre a perda de E-caderina e a proliferação celular não pode ser demonstrada numericamente. Aparentemente, esta relação é diferente conforme a lesão analisada. Na lesão de alto grau, há a expressão mantida de E-caderina e com a proliferação mais alta. Aparentemente, este fato ocorre até que a invasão ocorra. Em outras áreas invasoras, ocorre a perda de E-caderina com proliferação alta, mas esta ocorre em grandes blocos tumorais (Figuras 20 e 21).

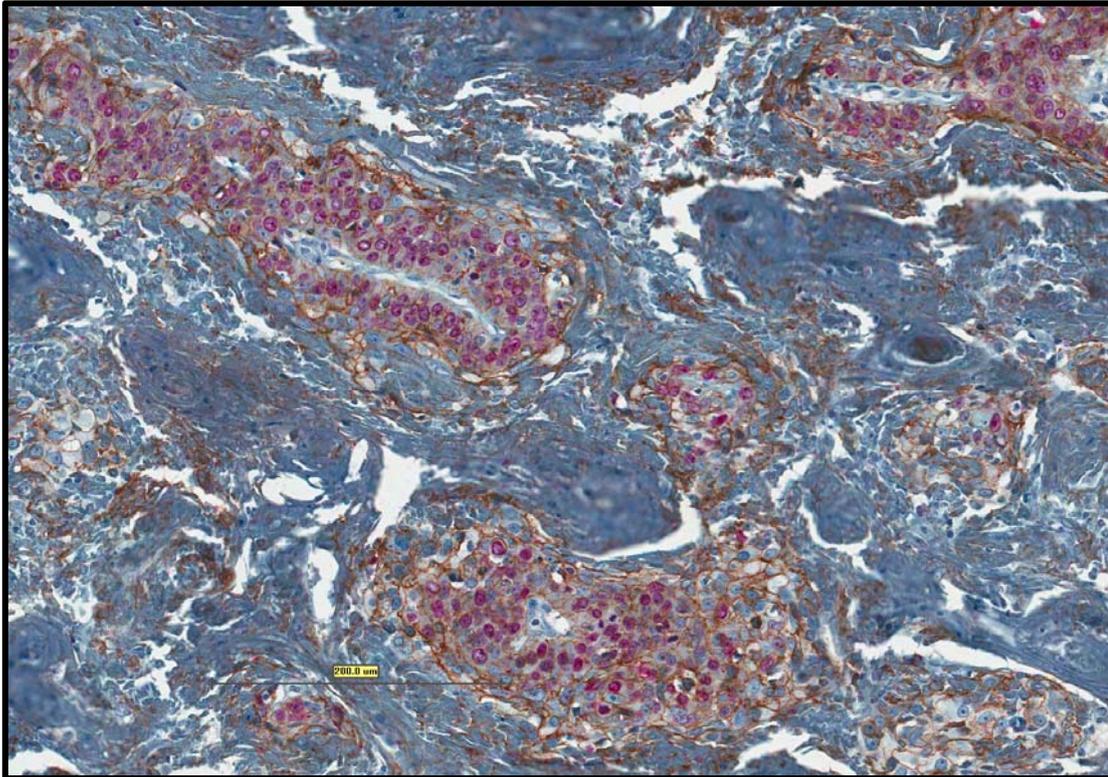


Figura 20 - Imagem representativa de carcinoma epidermóide invasor. Blocos com intensa proliferação celular (vermelho) e perda da expressão de E-caderina (marrom).

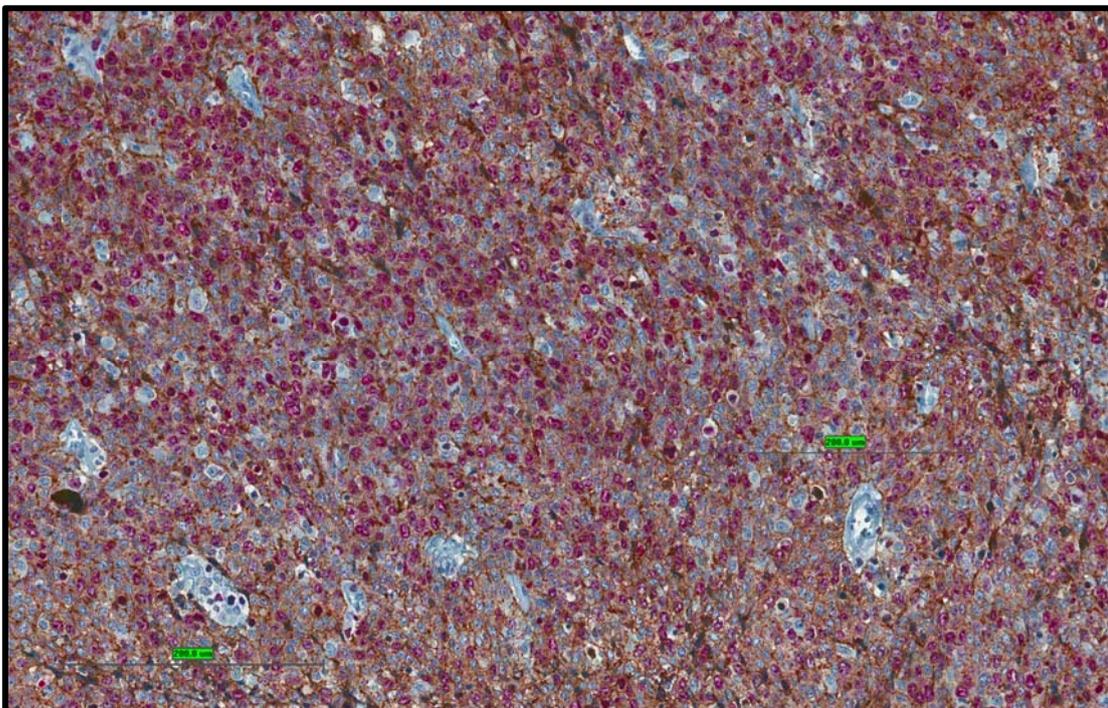


Figura 21 - Imagem representativa de carcinoma epidermóide invasor. Centro do tumor com intensa proliferação tumoral (vermelho) e diminuição da expressão de E-caderina (marrom).

Em outras áreas invasoras, o efeito contrário ocorre, com manutenção da expressão de E-caderina e baixa proliferação celular (Figura 22). No fronte de invasão, é clara a diminuição da expressão de E-caderina e que também ocorre baixa proliferação celular (Figura 23).

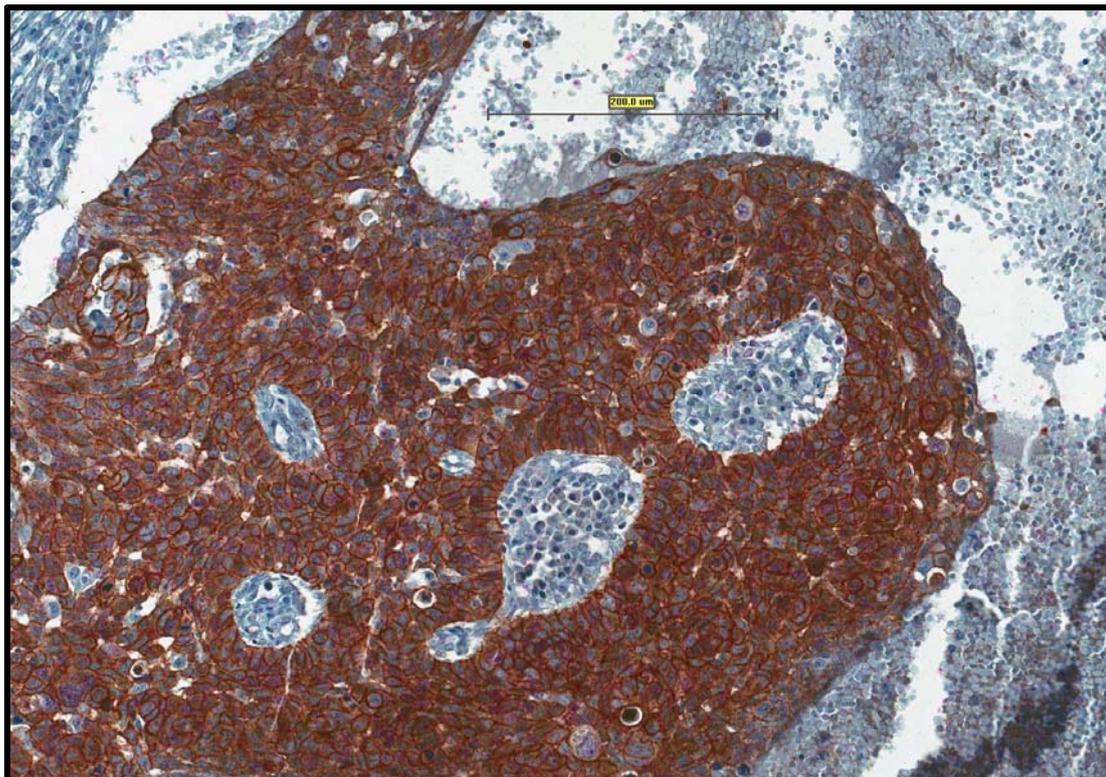


Figura 22 - Imagem representativa de carcinoma epidermóide invasor. Blocos com manutenção da expressão de E-caderina (marrom) e com baixa proliferação celular (vermelho).

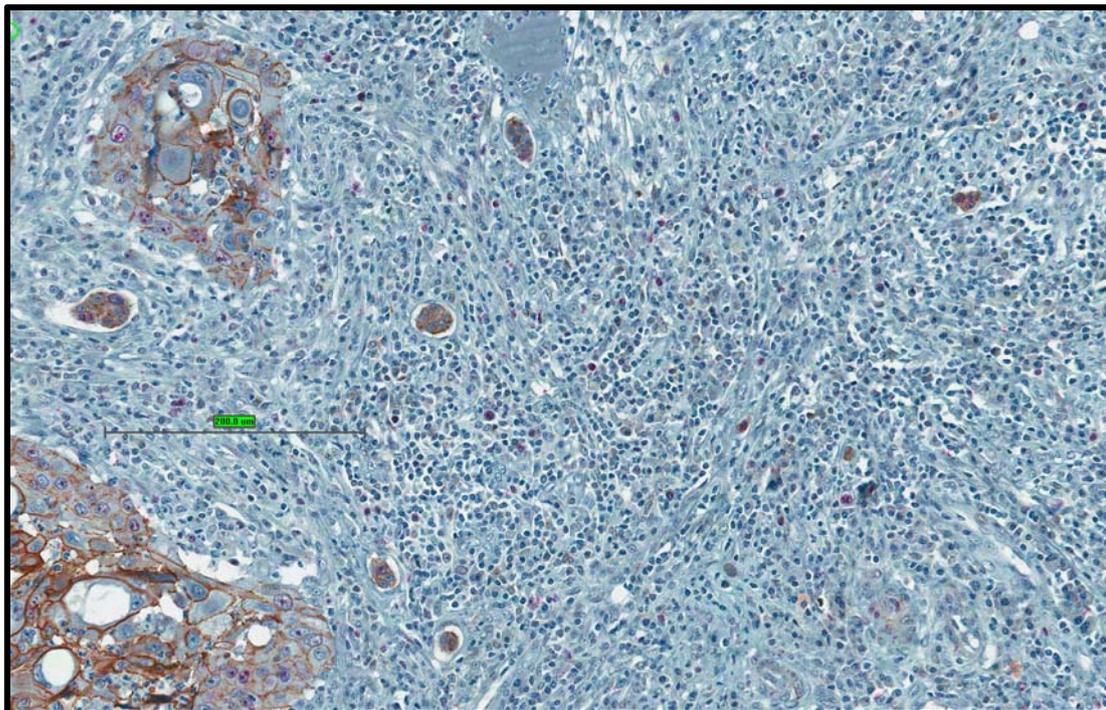


Figura 23 - Imagem representativa de carcinoma epidermóide invasor. Pequenos blocos infiltrativos com diminuição da expressão de E-caderina (marrom) e baixa proliferação celular (vermelho).

4.3.1 Munofluorescencia

Foram selecionados 15 casos, representativos dos diferentes padrões de invasão tumoral, para a realização da técnica de imunofluorescência. Os resultados observados através desta técnica foram compatíveis com o observado em imunohistoquímica. Na Figura 24 pode-se observar a ecocérvice histologicamente normal, e as células em descamação negativas para a expressão de E-caderina.

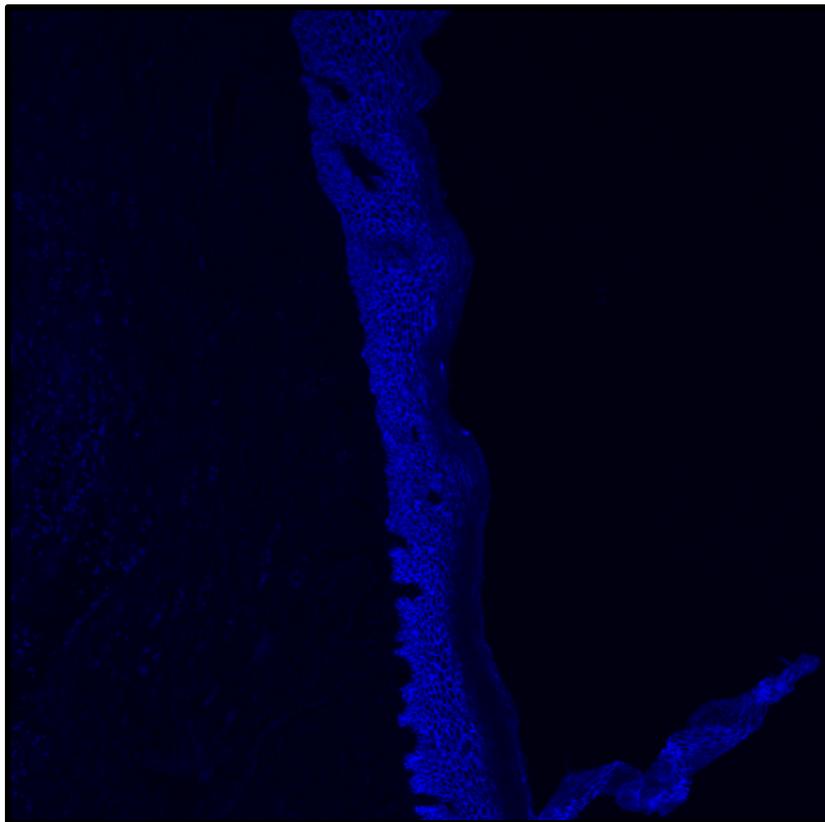


Figura 24 – Imagem representativa de ectocérvice histologicamente normal utilizando-se a técnica de imunofluorescência. A região superior do epitélio, que está em descamação, não apresenta expressão de E-caderina.

Na Figura 25 podemos observar a diminuição da expressão de E-caderina no frente de invasão.

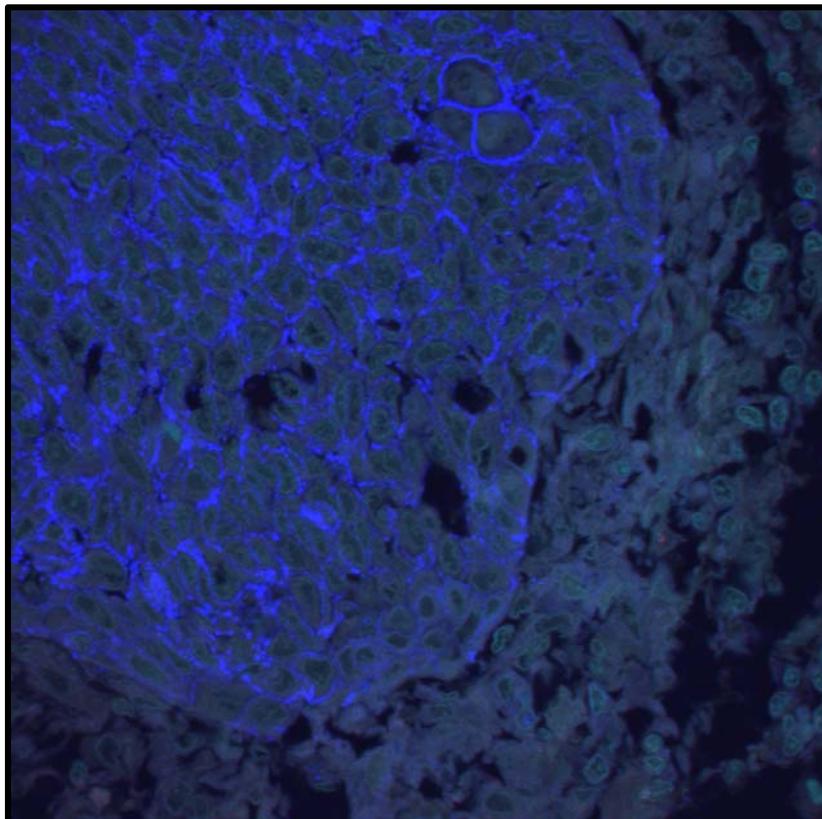


Figura 25 – Imagem representativa de carcinoma invasor, visto ao microscópio confocal com emissão para os canais azul escuro (E-caderina) e azul claro (DAPI). Esta imagem evidencia a diminuição na intensidade da expressão de E-caderina no frente de invasão, bem como a perda do padrão de marcação em anel completo.

A técnica de microscopia confocal nos permite visualizações sob um aumento de até 102x, o que possibilitou obter imagens dos brotamentos tumorais. Foi possível observar que os brotamentos re-expressam E-caderina, porém em uma intensidade moderada (Figura 26).

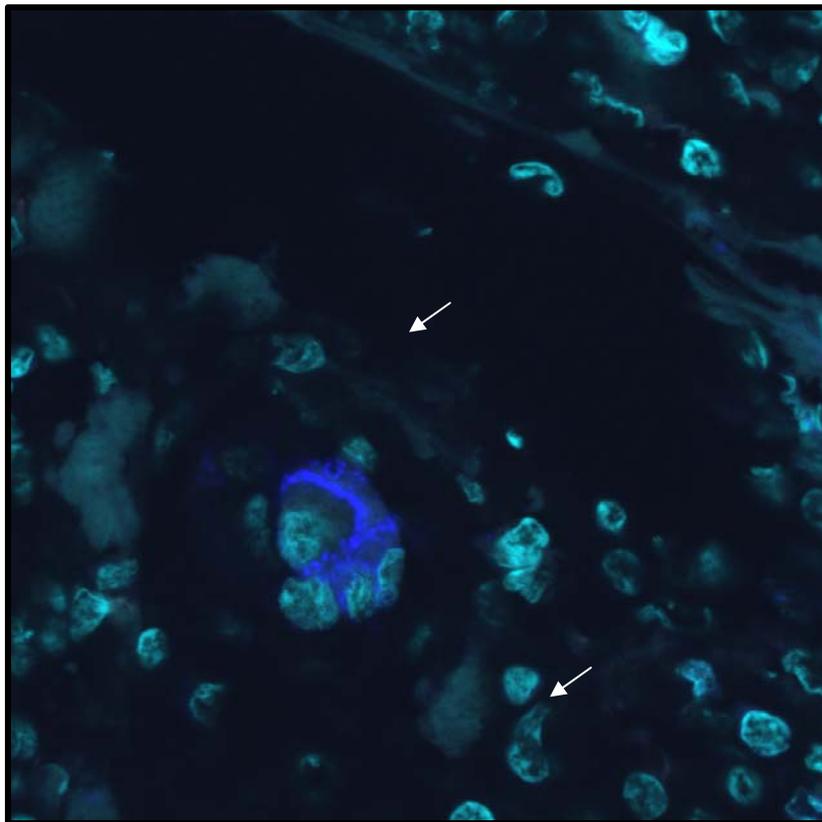


Figura 26 – Imagem representativa de brotamento tumoral, visto ao microscópio confocal com emissão para os canais azul escuro (E-caderina) e azul claro (DAPI), em maior aumento (102x). Nesta imagem podemos ver uma expressão de E-caderina moderada, nas regiões de contato entre as células.

4.4 PERDA DE EXPRESSÃO DE E-CADERINA E FORMAÇÃO DE BROTOS TUMORAIS DE INVASÃO

Uma vez que observamos diminuição da expressão de E-caderina no frente de invasão tumoral, testamos a hipótese de que quanto maior a perda de expressão da molécula de adesão, maior seria o número de brotos tumorais por área. Para tal, comparamos a expressão de E-caderina com a presença destes brotamentos por milímetro quadrado. Dividindo os casos em perda de E-caderina abaixo e acima da mediana (0,35 células

negativas). A comparação entre os grupos não mostrou diferenças significantes, sendo a média de brotamentos no grupo de menor perda de E-caderina foi de 12,70 brotamentos por mm^2 e no grupo com maior perda de expressão de E-caderina a foi de 11,88/ mm^2 .

5 DISCUSSÃO

O carcinoma epidermóide do colo uterino é uma doença que acomete e aflige uma população significativa, especialmente nos países em desenvolvimento. Uma vez que está associado à infecção pelo papilomavírus humano na quase totalidade dos casos, a introdução de programas de vacinação em massa poderá alterar a história natural desta doença em tempo relativamente curto. De qualquer maneira, o entendimento sobre a patogênese molecular é sempre interessante tornando o carcinoma epidermóide, em seus diferentes estágios de progressão um modelo para se entender o processo de invasão tumoral.

Nossos resultados demonstraram que as lesões de colo uterino apresentam uma variação na expressão de E-caderina. Interessantemente, a lesão intraepitelial de alto grau apresentou nível máximo de expressão de E-caderina, superior inclusive ao encontrado no carcinoma invasivo, mesmo quando se analisava a porção central do tumor. Na ectocérvice normal observa-se que praticamente todas as células expressam E-caderina. A mediana obtida pelo algoritmo foi de 97%. Estes cerca de 3% que não expressam E-caderina representam a camada ceratinizada, que é na verdade constituída por células mortas e portanto sem E-caderina expressa. Evitamos a inclusão desta camada sempre que possível, mas obviamente o desenho da área nem sempre é perfeito. Atentando-se para as intensidades de marcação, temos que na ectocérvice histologicamente normal, cerca de

61% das células apresentam marcação de 3+ e cerca de 35% tem marcação fraca (1+) e menos que 1% das células tem marcação em grau intermediário (2+). Este padrão onde a marcação por E-caderina é predominantemente forte e aproximadamente um terço das células a expressam fracamente pode ser melhor entendido ao considerarmos que o tecido escamoso estratificado da ectocérvice está em descamação, apresentando células que estão perdendo adesão em sua camada superior. O mesmo raciocínio é válido para a semelhança estatística na quantidade de células com marcação positiva para lesão de baixo grau: os valores referentes à ausência de E-caderina são devidos às células em descamação.

Outro aspecto observado é que um dos menores níveis de expressão de E-caderina está na mucosa endocervical normal. Entretanto, a mediana de quase 5% de células sem a marcação pelo anticorpo correspondem a borda secretora da glândula endocervical. No epitélio colunar simples que constitui a endocérvice, as células só estão em contato lateral e basal, sendo que a porção apical das células não faz contato com outras células. Isto seria 'lido' pelo algoritmo como uma quantidade menor de pixels marrons na área correspondente à célula, classificando então estas células como expressando fracamente a molécula analisada. No presente trabalho, não comparamos casos de adenocarcinoma e este resultado isolado será importante em trabalhos futuros quando analisarmos os adenocarcinomas endocervicais.

RAKHA et al. (2013) avaliaram a expressão de E-caderina em carcinoma de mama ductal invasivo e observaram que, utilizando-se um

anticorpo que reconhecia a porção extracelular cálcio-ligante da molécula 17 casos eram negativos. Quando utilizaram um anticorpo que reconhecia a porção citoplasmática da molécula 14 dos 17 casos apresentaram marcação positiva. Sabemos que a porção citoplasmática da E-caderina se liga a moléculas de beta-catenina, competindo deste modo com a ligação da mesma à receptores nucleares (HEASMAN et al. 1994; SANSON et al. 1996; ORSULIC et al. 1999). Isto poderia ter efeito suprimindo a via Wnt, influenciando diretamente a divisão celular.

Estas análises nos levaram a considerar que talvez resultados mais esclarecedores poderiam ser encontrados ao avaliar as diferentes porções da E-caderina que poderiam ser “encontradas” em cada região do tumor. O anticorpo utilizado no nosso estudo avaliou a porção citoplasmática, ligante a beta-catenina, e isto não nos fornece informação se, nos locais onde ela foi fracamente expressa, como no fronte de invasão, ela estava também com a porção extracelular e portanto participando da adesão celular, ou apenas expressando a porção citoplasmática.

Encontramos uma expressão de E-caderina nos brotamentos que, apesar de significativamente mais fraca do que no centro do tumor, era constante. Esta expressão de E-caderina não foi estatisticamente relacionada a densidade de brotamentos. KARDASH et al. (2010) realizaram um estudo em embriões de *zebrafish* onde demonstraram que células em migração interagem com células ao redor e que a ausência de expressão de E-caderina, mas não de integrinas- β 1, fazia com que a migração das células fosse dificultada; e que a interação entre a E-caderina e actina era crucial

para organização e função adequada de estruturas migratórias em células isoladas. Neste mesmo trabalho, foi evidenciado que as células que iriam iniciar o processo migratório re-expressam E-caderina, mas esta expressão é moderada. Células, que anormalmente apresentavam uma maior expressão de E-caderina, ao migrar exibiam taxas de migração mais lentas e tinham menores chances de alcançar o local alvo. Existe ainda na natureza outro exemplo onde a migração coletiva de células seria possibilitada por E-caderina: na oogênese de drosófilas, as células frontais migram como um fragmento de epitélio no qual duas células centrais mantêm a polaridade epitelial e as células periféricas são parcialmente despolarizadas. Tais células aumentam fortemente a expressão de DE-caderina pouco antes de começar migrar, a mantêm durante a sua migração e o silenciamento da DE-caderina bloqueia a migração das mesmas (NIEWIADOMSKA ET AL. 1999). Tomando estes relatos, podemos propor uma explicação para esta re-expressão moderada de E-caderina nos brotamentos tumorais que encontramos em nosso estudo: poderia ser uma forma destas células recém-liberadas do bloco tumoral percorrerem o estroma.

Quanto a proliferação celular, foi muito maior na lesão de alto grau, comparando-se com todas as outras condições analisadas, sendo que suas células estão se dividindo mais até mesmo que no tumor invasor. Sabemos que há alguns momentos durante a biologia tumoral onde seria desvantajoso se manter com altas taxas de proliferação. EVDOKIMOVA et al. (2009) demonstraram que a resistência a anoiquia e à apoptose está diretamente relacionada à diminuição da proliferação. Propõem ainda que a diminuição

da proliferação seja um evento das células com fenótipo migratório que sofreram TEM, importante na disseminação e sobrevivência da célula tumoral. O mecanismo pelo qual se dá esta diminuição pode estar relacionado com a diminuição da ancoragem das células tumorais ao estroma, já que a diminuição na proliferação se dá nos mesmo locais onde há diminuição de E-caderina. No fronte invasivo por exemplo, observamos que, tanto nas amostras de dupla marcação imunohistoquímica quanto nas de marcação simples por Ki-67, as taxas de proliferação são muito pequenas.

O mais importante do presente trabalho é que ele sugere como pode ocorrer a modulação da expressão de E-caderina e sua relação com a proliferação celular no tumor humano. Os dados existentes hoje na literatura desta relação baseiam-se em modelos experimentais, *in vitro*. O modelo *in vivo* mostra que esta relação é mais complexa e não é linear. Com base nos dados obtidos podemos inferir que a proliferação das lesões *in situ* é máxima e que não é acompanhada da perda da expressão de E-caderina. Em determinado momento, as células em adesão na membrana basal perdem a expressão de E-caderina, param de proliferar e invadem o estroma adjacente (Figura 15). E esta dinâmica se repete nos grandes blocos do carcinoma invasor. As células periféricas perdem a expressão de E-caderina, proliferam intensamente (Figura 17) e fazem os brotamentos que irão formar os brotamentos invasores. Nestes brotamentos as células tem pouca adesão, com baixa expressão de E-caderina, mas também com baixa proliferação celular (Figura 23). Estes blocos de pequenas células devem iniciar sua proliferação celular e, ao mesmo tempo, re-expressar E-caderina.

E o ciclo se repete. Desta forma, esta organização espacial determinada pela adesão e diferenciação celular é fundamental para que o tumor sobreviva, prolifere e se torne invasivo. Isto torna a expressão de E-caderina extremamente dinâmica, intimamente relacionada com a proliferação celular. A diminuição da expressão de E-caderina é essencial para a invasão, mas se esta não for readquirida e a adesão célula-a-célula restabelecida, o brotamento não conseguiria tornar-se um grande bloco tumoral (Figura 27). Talvez esta dinâmica explique os resultados contraditórios obtidos quando os trabalhos tentam correlacionar a expressão de E-caderina e o prognóstico das diversas neoplasias e que para que este marcador seja eficiente na capacidade de prever o comportamento biológico é necessário se observar os blocos invasores e não o tumor como um todo.

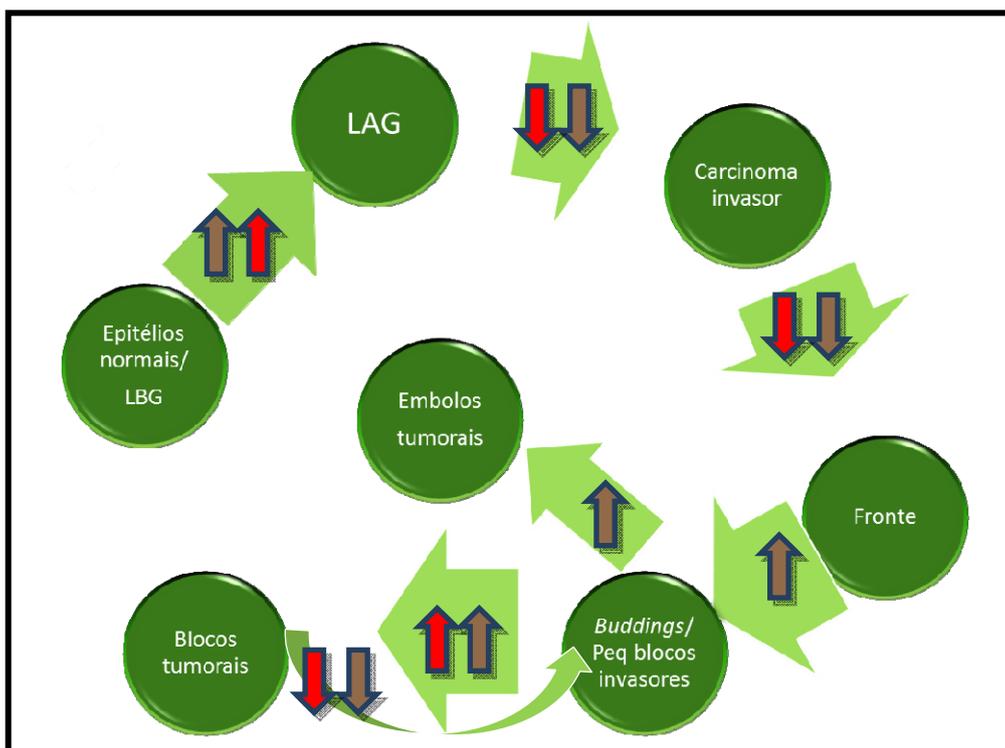


Figura 27 - Modelo de expressão de E-caderina e taxa de proliferação celular em neoplasias do colo uterino. LBG, lesões de baixo grau; LAG, lesões de alto grau.

6 CONCLUSÕES

- 1 Há perda da expressão de E-caderina a partir da lesão de baixo grau, sendo que o fronte de invasão é onde esta diminuição é mais marcada; o carcinoma *in situ* tem o índice de expressão mais alto;
- 2 O índice de proliferação medido pela expressão nuclear de Ki-67 é máximo nas lesões intraepiteliais de alto grau, seguido do centro de tumor, sendo que há uma diminuição desta proliferação no fronte de invasão;
- 3 Não há relação quantitativa entre a perda global da expressão de E-caderina com o índice proliferativo;
- 4 A análise qualitativa das colorações imunoistoquímicas sugere que a diminuição da expressão da E-caderina ocorre nas células mais indiferenciadas do bloco celular e que os pequenos brotamentos necessitam readquirir E-caderina para iniciar a proliferar;
- 5 Não há a relação do número de brotamentos invasivos com a perda de E-caderina.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andersen H, Mejlvang J, Mahmood S, et al. Immediate and delayed effects of E-cadherin inhibition on gene regulation and cell motility in human epidermoid carcinoma cells. **Mol Cell Biol** 2005; 25:9138-9150.

Angst BD, Marozzi C, Magee AI. The cadherin super family: diversity in form and function. **J Cell Sci** 2001; 114:629-641.

Bryne M, Boysen M, Alfsen CG, et al. The invasive front of carcinomas. the most important area for tumour prognosis? **Anticancer Res** 1998; 18:4757-64.

[CCR] Center for Cancer Research in the Journals. **Identifying molecular culprits of cervical cancer progression**. Available from: <URL:http://home.ccr.cancer.gov/inthejournals/PDFs/Gius_03.pdf> [2013 dez 12]

Cambruzzi E, Zettler CG, Alexandre CO. Expression of Ki-67 and squamous intraepithelial lesions are related with HPV in endocervical adenocarcinoma. **Pathol Oncol Res** 2005; 11:114-120.

Campos RS, Lopes A, Guimarães GC, Carvalho AL, Soares FA. E-cadherin, MMP-2, and MMP-9 as prognostic markers in penile cancer: analysis of 125 patients. **Urology** 2006; 67:797-802.

Carvalho AM SM. **Expressão da E-caderina e do Ki-67 nas lesões de colo uterino**. São José do Rio Preto; 2006. [Dissertação de Mestrado-Faculdade de Medicina de São José Do Rio Preto].

Christofori G. New signals from the invasive front. **Nature** 2006; 441:444-50.

De Wever O, Pauwels P, Craene BD, et al. Molecular and pathological signatures of epithelial-mesenchymal transitions at the cancer invasion front. **Histochem Cell Biol** 2008; 130:481-94.

Evdokimova V, Tognon C, Ng T, Sorensen PHB. Reduced proliferation and enhanced migration: two sides of the same coin? Molecular mechanisms of metastatic progression by YB-1. **Cell Cycle** 2009; 8:2901-6.

Faleiro-Rodrigues C, Lopes C. E-cadherin, CD44 and CD44v6 in squamous intraepithelial lesions and invasive carcinomas of the uterine cervix: an immunohistochemical study. **Pathobiology** 2004; 71:329-36.

Flatley JE, McNeir K, Balasubramani L, et al. Folate status and aberrant DNA methylation are associated with HPV infection and cervical pathogenesis. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2009; 18:2782-9.

Ginger OT, Comtesse SCM, Lugli A, Zlobec I, Kurrer MO. Intra-tumoral budding in preoperative biopsy specimens predicts lymph node and distant metastasis in patients with colorectal cancer **Mod Pathol** 2012; 25:1048-53.

Gottardi CJ, Wong E, Gumbiner BM. E-cadherin suppresses cellular transformation by inhibiting beta-catenin signaling in an adhesion-independent manner. **J Cell Biol** 2001; 153:1049-60.

Gotzmann J, Mikula M, Eger A, et al. Molecular aspects of epithelial cell plasticity: implications for local tumor invasion and metastasis. **Mutat Res** 2004; 566:9-20.

Grizzle WE, Srivastava S, Manne U. The biology of incipient, pre-invasive or intraepithelial neoplasia. **Cancer Biomarkers** 2011; 9:21-39.

Guerra MR, Gallo CVM, Mendonça GAS. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. **Rev Bras Epidemiol** 2005; 51:227-34.

Guimarães GC, Lopes A, Campos RS, et al. Front pattern of invasion in squamous cell carcinoma of the penis: new prognostic factor for predicting risk of lymph node metastases. **Urology** 2006; 68:148-53.

Heasman J, Crawford A, Goldstone K, et al. Overexpression of cadherins and underexpression of beta-catenin inhibit dorsal mesoderm induction in early xenopus embryos. **Cell** 1994; 79:791-803.

Herfs M, Hubert P, Kholod N, et al. Transforming growth factor-beta1-mediated Slug and Snail transcription factor up-regulation reduces the density of Langerhans cells in epithelial metaplasia by affecting E-cadherin expression. **Am J Pathol** 2008; 172:1391-402.

Hirohashi S, Kanai Y. Cell adhesion system and human cancer morphogenesis. **Cancer Sci** 2003; 94:575-81.

Jeanes A, Gottardi CJ, Yap AS. Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression? **Oncogene** 2008; 27:6920-9.

Kanazawa H, Mitomi H, Nishiyama Y, et al. Tumour budding at invasive margins and outcome in colorectal cancer. **Colorectal Dis** 2008; 10:41-7.

Kardash E, Reichman-Fried M, Maître JL, et al. A role for Rho GTPases and cell-cell adhesion in single-cell motility in vivo. **Nat Cell Biol** 2010; 12:47-53.

Kausch I, Lingnau A, Endl E, et al. Antisense treatment against Ki-67 mRNA inhibits proliferation and tumor growth in vitro and in vivo. **Int J Cancer** 2003; 105:710-6.

Kim NG, Koh E, Chen X, Gumbiner BM. E-cadherin mediates contact inhibition of proliferation through Hippo signaling-pathway components. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2011; 108:11930-35.

Koyuncuoglu M, Okyay E, Saatli B, Olgan S, Akin M, Saygili U. Tumor budding and e-cadherin expression in endometrial carcinoma: are they prognostic factors in endometrial cancer? **Gynecol Oncol** 2012; 125:208-13.

Kuphal F, Behrens J. E-cadherin modulates Wnt-dependent transcription in colorectal cancer cells but does not alter Wnt-independent gene expression in fibroblasts. **Exp Cell Res** 2006; 312, 4:457-67.

Leber MF, Efferth T. Molecular principles of cancer invasion and metastasis (review). **Int J Oncol** 2009; 34:881-95.

Lie AK, Kristensen G. Human papillomavirus E6/E7 mRNA testing as a predictive marker for cervical carcinoma. **Expert Rev Mol Diagn** 2008; 8:405-15.

Liotta LA, Stetler-Stevenson WG, Steeg PS. Cancer invasion and metastasis: positive and negative regulatory elements. **Cancer Invest** 1991; 9:543-51.

Mehlen P, Puisieux A. Metastasis: a question of life or death. **Nat Rev Cancer** 2006; 6:449-58.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Neoplasia intra-epitelial cervical–NIC. **Rev Bras Cancerol** 2000; 46:355-7.

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

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

Niewiadomska P, Godt D, Tepass U. DE-Cadherin is required for intercellular motility during *Drosophila* oogenesis. **J Cell Biol** 1999;144:533-47.

Orsulic S, Huber O, Aberle H, Arnold S, Kemler R. E-cadherin binding prevents beta-catenin nuclear localization and beta-catenin/LEF-1-mediated transactivation. **J Cell Sci** 1999; 112:1237-45.

Perl AK, Wilgenbus P, Dahl U, Semb H, Christofori G. A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma, **Nature** 1998; 392:190-3.

Perrais M, Chen X, Perez-Moreno M, Gumbiner BM. E-cadherin homophilic ligation inhibits cell growth and epidermal growth factor receptor signaling independently of other cell interactions. **Mol Biol Cell** 2007; 18:2013-25.

Rakha EA, Teoh TK, Lee AHS, Nolan CC, Ellis IO, Green AR. Further evidence that E-cadherin is not a tumour suppressor gene in invasive ductal carcinoma of the breast: an immunohistochemical study. **Histopathology** 2013; 62:695-701

Sanson B, White P, Vincent JP. Uncoupling cadherin-based adhesion from wingless signalling in *Drosophila*. **Nature** 1996; 383:627-30.

Schiffman M, Wentzensen N. From human papillomavirus to cervical cancer. **Obstet Gynecol** 2010; 116:177-85.

Shook D, Keller R. Mechanisms, mechanics and function of epithelial-mesenchymal transitions in early development. **Mech Dev** 2003; 120:1351-83.

Soares FA, da Cunha IW, Guimarães GC, Nonogaki S, Campos RS, Lopes A. The expression of metalloproteinases-2 and -9 is different according to the patterns of growth and invasion in squamous cell carcinoma of the penis. **Virchows Arch** 2006; 449:637-46.

Soto E, Yanagisawa M, Marlow LA, Copland JA, Perez EA, Anastasiadis PZ. p120 catenin induces opposing effects on tumor cell growth depending on E-cadherin expression. **J Cell Biol** 2008; 183: 737–749.

Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. **Science** 1991; 251:1451-5.

Tavassoli FA, Devilee P. **Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs**. Lyon: IARC; 2003. (IARC WHO Classification of Tumours, n° 4).

Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. **Nat Rev Cancer** 2002; 2:442-54.

Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2006; 7:131-42.

Tyring SK. Human papillomavirus infections: epidemiology, pathogenesis, and host immune response. **J Am Acad Dermatol** 2000; 43:S18-26.

Ueno H, Murphy J, Jass JR, et al. Tumour 'budding' as an index to estimate the potential of aggressiveness in rectal cancer. **Histopathology** 2002; 40:127-32.

Wijnhoven BP, Dinjens WN, Pignatelli M. E-cadherin–catenin cell–cell adhesion complex and human cancer. **Br J Surg** 2000; 87:992-1005.

Wu H, Shen MX, Liang YL, et al. Positive expression of e-cadherin retards more human breast carcinoma cells in G0/G1 phase and its molecular mechanism. **Progress Biochemistry Biophysics** 2003; 30:435-41.

Anexo 1 - Aprovação do projeto no Comitê de Ética em Pesquisa



**Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP**

São Paulo, 08 de Novembro de 2010.

Ao
Dr. Fernando Augusto Soares

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1468/10
“Análise da Transição Epitélio-Mesenquimal em câncer de colo de útero através da expressão de E-caderina e avaliação de sua relação com as taxas de proliferação celular”.

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 26/10/2010, **aprovaram** a realização do estudo em referência e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com as Resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Termo de Dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido;
- Declaração sobre os dados coletados, publicação dos dados e propriedade das informações geradas;
- Declaração sobre Uso e Destino do material Biológico, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Orçamento Financeiro Detalhado;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica.

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

Atenciosamente,

Dr. Jefferson Luiz Gross

1º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

Anexo 2 - Valores de porcentagem de pixels encontrados para os marcadores E-caderina (marrom) e Ki-67 (vermelho) e número de células analisadas em ectocérvice normal utilizando-se o software ImageScope (Aperio)

CASO	3+	2+	1+	ECAD+	ECAD-	BLUE	RED	BROWN	CELLS
43	61,60	1,35	34,10	97,05	2,95	95,12	1,03	95,97	7398
44	69,19	3,25	26,30	98,74	1,26	97,42	1,67	97,86	5011
45	50,71	0,04	46,33	97,08	2,92	98,45	0,31	94,06	18479
7	46,71	0,01	45,44	92,16	7,84	98,03	0,20	91,75	10131
8	61,70	0,03	35,32	97,05	2,95		0,33	99,42	7872
10	60,29	0,55	38,84	99,68	0,32	96,00	0,76	96,70	4027
18	73,58	0,00	26,25	99,83	0,17	96,47	3,09	98,41	2903
19	74,71	0,00	23,18	97,89	2,11	90,70	2,99	97,07	4120
46	60,83	0,56	38,42	99,81	0,19	98,02	0,87	99,57	2142
23	43,86	8,05	44,29	96,20	3,80	98,01	0,46	97,90	3423
26	64,37	0,21	32,23	96,81	3,19	98,07	0,65	97,65	4362
28	58,82	2,72	36,91	98,45	1,55	96,70	0,11	97,47	7873
29	70,34	2,88	25,37	98,59	1,41	97,02	1,35	98,49	2050
47	58,34	0,37	34,54	93,25	6,75	92,94	2,47	93,82	5146
48	65,90	3,50	28,87	98,27	1,73	99,31	0,45	98,36	1299
40	15,32	34,05	47,76	97,13	2,87	91,61	0,31	88,06	2734
49	68,00	0,74	30,98	99,72	0,28	97,59	1,64	96,34	3647
50	41,86	9,13	44,22	95,21	4,79	98,20	0,45	97,03	5545
51	66,50	0,52	32,03	99,05	0,95	97,29	0,82	97,50	3322
52	72,00	1,78	23,32	97,10	2,90	98,42	1,15	98,54	1518
Média	59,23	3,49	34,74	97,45	2,55	96,60	1,06	96,60	5150
Mediana	61,65	0,65	34,32	97,51	2,49	97,42	0,79	97,49	4074

Anexo 3 - Valores de porcentagem de pixels encontrados para os marcadores E-caderina (marrom) e Ki-67 (vermelho) e número de células analisadas em endocérvice normal utilizando-se o software ImageScope (Aperio)

CASO	3+	2+	1+	ECAD+	ECAD-	BLUE	RED	BROWN	CELLS
43	47,08	17,89	26,40	91,37	8,63	92,31	0,62	95,13	2364
44	25,76	36,80	31,73	94,29	5,71	93,91	0,18	94,63	3552
45	56,83	8,53	30,39	95,75	4,25	98,45	0,59	92,85	3574
3	72,80	0,20	25,56	98,56	1,44	90,54	0,63	97,98	1491
53	56,38	10,53	23,70	90,61	9,39	90,31	0,47	90,61	5896
4	25,53	16,38	43,09	85,00	15,00	96,93	0,19	95,27	3815
5	50,76	9,22	35,44	95,42	4,58	93,19	0,38	94,05	3798
6	47,75	7,89	39,93	95,57	4,43	93,39	0,68	95,25	1976
8	52,57	9,44	34,19	96,20	3,80		0,33	94,22	2182
12	20,24	30,05	47,79	98,08	1,92	89,16	0,22	91,15	5291
54	52,63	13,25	33,05	98,93	1,07	85,80	0,65	98,92	1389
19	67,04	11,26	20,51	98,81	1,19	72,77	0,87	95,30	3535
55	34,68	19,76	37,98	92,42	7,58	96,21	0,22	94,04	4028
38	14,35	31,43	49,26	95,04	4,96	89,12	0,33	93,41	3506
46	46,93	14,34	35,24	96,51	3,49	87,82	0,75	95,71	1206
51	61,11	11,80	24,16	97,07	2,93	90,90	0,89	97,03	4109
56	41,94	22,10	33,37	97,41	2,59	91,90	0,45	94,55	2077
48	24,91	35,47	39,25	99,63	0,37	89,67	0,23	97,26	1265
57	32,35	27,73	39,15	99,23	0,77	92,75	0,58	95,44	1799
58	41,92	2,87	31,84	76,63	23,37	78,56	1,20	94,92	1804
59	39,21	34,19	26,59	99,99	0,01	89,59	0,50	95,91	1737
60	29,39	38,64	31,06	99,09	0,91	93,28	0,32	96,43	1660
61	46,88	23,50	25,76	96,14	3,86	98,23	0,51	96,60	1681
62	47,62	16,34	29,80	93,76	6,24	91,91	0,36	92,54	1426
63	42,80	21,34	32,29	96,43	3,57	93,01	0,37	93,73	2404
Média	43,18	18,84	33,10	95,12	4,88	90,82	0,50	94,92	2703
Mediana	46,88	16,38	32,29	96,20	3,80	91,91	0,47	95,13	2182

Anexo 4 - Valores de porcentagem de pixels encontrados para os marcadores E-caderina (marrom) e Ki-67 (vermelho) e número de células analisadas em lesão de baixo grau utilizando-se o software ImageScope (Aperio)

CASO	3+	2+	1+	ECAD+	ECAD-	BLUE	RED	BROWN	CELLS
62	65,03	2,71	30,82	98,56	1,44	95,70	1,28	97,94	8942
44	55,81	4,47	34,90	95,18	4,82	97,44	1,26	97,21	6604
3	5,38	40,31	41,49	87,18	12,82	97,72	0,66	98,85	2452
53	24,38	30,01	33,17	87,56	12,44	97,24	0,30	92,06	14785
18	75,96	0,07	23,69	99,72	0,28	95,42	2,36	98,27	2820
52	60,46	3,79	31,17	95,42	4,58	98,43	1,04	98,14	2769
46	63,81	3,02	30,65	97,48	2,52	98,28	0,69	99,92	1206
64	58,45	5,30	35,19	98,94	1,06	98,20	0,71	97,32	2472
63	52,24	9,74	35,82	97,80	2,20	98,47	1,35	97,82	3388
56	53,22	4,57	40,64	98,43	1,57	99,56	0,61	97,19	11945
21	65,68	0,00	24,60	90,28	9,72	96,88	0,99	93,63	7326
58	60,46	18,36	15,90	94,72	5,28	95,99	2,37	96,94	2595
36	44,56	10,13	42,35	97,04	2,96	3,36	0,71	97,19	4526
47	72,40	2,59	21,88	96,87	3,13	85,31	2,66	95,46	3121
59	57,89	12,09	25,88	95,86	4,14	95,63	1,50	95,36	2728
48	67,39	6,65	25,53	99,57	0,43	96,67	0,65	98,69	2812
40	38,58	15,44	45,56	99,58	0,42	85,58	0,61	91,81	7755
57	70,03	0,23	29,18	99,44	0,56	98,12	1,13	97,48	2663
60	42,63	29,70	27,28	99,61	0,39	98,21	1,36	99,26	3061
653	60,33	0,82	36,20	97,35	2,65	97,37	1,24	96,24	5836
50	56,63	10,22	26,02	92,87	7,13	94,04	0,70	93,81	17914
66	59,63	6,65	31,02	97,30	2,70	97,83	0,59	98,85	5368
Média	55,04	9,86	31,32	96,22	3,78	91,88	1,13	96,79	5595
Mediana	59,04	5,97	30,92	97,33	2,68	97,31	1,02	97,27	3255

Anexo 5 - Valores de porcentagem de pixels encontrados para os marcadores E-caderina (marrom) e Ki-67 (vermelho) e número de células analisadas em lesão de alto grau utilizando-se o software ImageScope (Aperio)

CASO	3+	2+	1+	ECAD+	ECAD-	BLUE	RED	BROWN	CELLS
43	54,63	2,50	42,40	99,53	0,47	98,28	1,91	99,30	1841
61	80,37	0,08	19,43	99,88	0,12	98,23	7,44	96,60	1681
1	46,62	13,41	39,07	99,10	0,90	91,73	1,13	96,57	4543
44	74,17	1,38	24,37	99,92	0,08	98,53	7,13	99,65	2532
45	75,26	0,03	23,25	98,54	1,46	96,81	2,01	98,70	19064
2	62,35	0,75	35,81	98,91	1,09	99,14	1,44	99,41	5222
3	72,69	0,01	26,17	98,87	1,13	97,35	9,57	99,02	7557
53	71,82	0,00	27,99	99,81	0,19	97,49	13,54	98,01	1515
4	73,18	0,06	26,54	99,78	0,22	99,18	17,43	98,99	4933
5	72,79	0,00	26,52	99,31	0,69	98,15	5,16	99,32	6468
6	74,66	0,16	24,94	99,76	0,24	98,52	7,32	99,06	7442
7	69,65	0,15	29,42	99,22	0,78	99,26	3,35	99,12	3297
8	65,49	0,68	33,04	99,21	0,79		1,50	99,77	3538
9	75,60	0,15	23,66	99,41	0,59	90,75	5,13	97,64	8743
9	79,55	0,03	19,98	99,56	0,44	87,69	7,94	96,94	6661
67	38,91	26,83	34,21	99,95	0,05	98,96	8,10	98,94	5657
11	66,78	0,00	33,21	99,99	0,01	97,58	35,79	98,02	1060
12	66,52	3,13	30,20	99,85	0,15	99,59	3,53	99,50	10104
54	76,78	0,00	21,78	98,56	1,44	98,31	6,91	99,25	9812
14	74,90	0,05	24,92	99,87	0,13	94,70	17,57	96,98	38849
68	58,19	8,86	32,30	99,35	0,65	98,63	4,63	99,14	15682
17	71,29	0,55	27,79	99,63	0,37	97,22	4,46	99,08	8050
18	63,92	10,53	25,14	99,59	0,41	96,25	9,04	97,98	2450
19	70,78	2,10	27,10	99,98	0,02	95,79	29,54	98,43	1095
20	72,42	0,00	26,73	99,15	0,85	98,32	8,70	99,38	5077
69	76,06	5,70	17,70	99,46	0,54	99,27	9,14	98,91	6542
70	65,94	11,93	21,62	99,49	0,51	98,90	8,37	99,26	5540

Cont / Anexo 5

CASO	3+	2+	1+	ECAD+	ECAD-	BLUE	RED	BROWN	CELLS
71	79,71	4,21	15,91	99,83	0,17	98,08	11,24	98,87	5909
72	73,28	2,61	23,71	99,60	0,40	95,86	26,14	97,77	16068
73	21,89	31,16	45,77	98,82	1,18	78,11	1,63	99,91	4088
23	60,14	4,65	34,65	99,44	0,56	97,97	1,38	99,28	2170
74	79,10	3,50	17,12	99,72	0,28	98,18	6,99	99,80	3540
28	55,81	11,16	32,57	99,54	0,46	95,80	3,87	99,28	9269
29	24,89	40,20	34,66	99,75	0,25	97,38	3,41	99,28	9896
31	41,06	10,58	40,11	91,75	8,25	99,67	1,67	99,61	6973
33	48,18	0,99	48,19	97,36	2,64	98,93	0,60	99,51	4667
75	72,75	11,33	15,89	99,97	0,03	93,34	15,23	98,29	7041
36	47,87	19,85	31,90	99,62	0,38	97,76	2,30	99,27	17941
38	27,23	31,59	40,92	99,74	0,26	97,45	3,96	99,66	5714
76	78,48	0,50	21,02	100,00	0,00	98,65	5,33	99,86	2198
47	63,87	7,81	28,06	99,74	0,26	90,32	6,57	99,10	3443
39	37,33	35,58	27,03	99,94	0,06	91,96	3,75	98,85	4589
57	75,12	2,30	22,22	99,64	0,36	99,61	5,47	99,41	4658
41	70,40	0,73	28,05	99,18	0,82	98,45	12,50	96,98	20561
Média	63,83	7,00	28,48	99,30	0,70	96,56	7,95	98,81	7356
Mediana	64,04	7,10	28,16	99,30	0,70	96,52	8,09	98,80	7485

Anexo 6 - Valores de porcentagem de pixels encontrados para os marcadores E-caderina (marrom) e Ki-67 (vermelho) e número de células analisadas em *core* tumoral utilizando-se o software ImageScope (Aperio)

CASO	3+	2+	1+	ECAD+	ECAD-	BLUE	RED	BROWN	CELLS
1	23,87	34,60	40,96	99,43	0,57	89,24	1,32	96,86	8728
2	66,96	4,24	28,58	99,78	0,23	98,44	6,24	98,65	4486
3	75,90	0,00	23,39	99,29	0,71	98,89	6,30	99,49	10209
4	8,53	17,12	64,53	90,18	9,82	99,25	3,71	98,32	20375
5	73,51	0,17	26,12	99,80	0,20	98,66	0,98	99,73	26833
6	72,62	0,13	26,43	99,18	0,82	98,16	1,48	99,42	10025
7	66,44	0,19	30,86	97,49	2,51	97,72	1,83	98,71	7520
8	58,43	0,05	40,65	99,13	0,87		0,32	99,70	1946
9	67,23	2,13	29,51	98,87	1,13	93,71	0,87	98,20	14447
9	70,18	1,27	28,29	99,74	0,26	92,57	1,15	98,06	8537
10	52,65	19,53	27,70	99,88	0,12	98,52	0,75	99,54	7126
11	66,61	0,00	32,65	99,26	0,74	98,02	3,99	98,64	5672
12	13,35	14,64	65,78	93,77	6,23	99,25	1,03	98,51	15659
13	76,70	0,13	22,96	99,79	0,21	97,18	2,20	99,60	6068
14	43,47	20,76	35,54	99,77	0,23	95,93	2,52	98,55	6911
15	68,94	0,15	30,56	99,65	0,35	98,10	1,11	98,67	6066
16	76,58	0,15	22,88	99,61	0,39	94,61	1,53	98,86	9939
17	52,54	8,89	38,17	99,60	0,40	94,85	0,83	97,35	9797
18	8,55	53,14	37,76	99,45	0,55	97,63	1,26	99,05	14952
19	73,41	0,93	25,51	99,85	0,15	92,09	4,40	98,41	8202
20	72,73	1,19	25,63	99,55	0,45	97,48	8,16	98,82	9510
21	71,80	0,26	25,85	97,91	2,09	97,37	1,34	98,69	12394
22	0,57	58,31	40,79	99,67	0,33	82,18	0,76	96,39	3881
23	60,42	7,55	31,81	99,78	0,22	95,51	1,22	97,45	10946
24	17,16	37,95	44,39	99,50	0,50	94,34	0,49	98,51	7953
25	48,93	17,82	32,33	99,08	0,92	95,77	1,00	98,85	5203
26	6,06	4,23	60,06	70,35	29,65	94,20	0,32	91,27	7430
27	9,26	56,55	34,01	99,82	0,18	71,84	1,65	96,03	16181

Cont / Anexo 6

CASO	3+	2+	1+	ECAD+	ECAD-	BLUE	RED	BROWN	CELLS
28	44,68	15,47	36,85	97,00	3,00	95,54	2,89	98,93	2998
29	46,81	18,27	34,24	99,32	0,68	96,94	3,15	99,17	10376
30	27,36	30,41	41,65	99,42	0,58	98,32	0,93	99,31	11862
31	55,33	10,47	30,84	96,64	3,36	97,51	0,49	94,44	18338
32	65,44	6,55	27,69	99,68	0,32	95,19	0,35	92,52	1792
33	72,23	0,61	27,07	99,91	0,09	95,37	1,46	99,31	11524
34	1,64	26,52	67,88	96,04	3,96	96,21	0,27	96,46	14547
35	28,82	38,14	32,82	99,78	0,22	93,97	0,46	98,96	7218
36	1,06	17,41	76,95	95,42	4,58	96,66	0,27	95,95	5840
37	3,27	52,56	43,98	99,81	0,19	94,15	0,74	98,13	3299
38	0,39	26,88	68,72	95,99	4,01	93,86	0,46	93,99	10618
39	21,27	44,31	34,22	99,80	0,20	93,64	0,47	98,65	15777
40	36,11	25,61	37,76	99,48	0,52	86,12	0,65	96,29	12517
41	74,15	0,00	23,82	97,97	2,03	94,90	13,95	97,16	39956
42	15,45	17,29	57,01	89,75	10,25	98,49	7,48	96,77	4227
Média	44,13	16,11	37,56	97,80	2,20	94,97	2,16	98,28	10416
Mediana	58,43	4,24	32,33	99,45	0,55	97,06	1,32	98,67	8728

Anexo 7 – Valores de porcentagem de pixels encontrados para os marcadores E-caderina (marrom) e Ki-67 (vermelho) e número de células analisadas em frente de invasão tumoral utilizando-se o software ImageScope (Aperio)

CASO	3+	2+	1+	ECAD+	ECAD-	BLUE	RED	BROWN	CELLS
1	24,50	14,25	48,58	87,33	12,67	91,43	0,88	90,65	2849
2	8,49	15,40	69,23	93,12	6,88	97,47	1,87	95,69	2792
3	59,58	0,00	32,94	92,52	7,48	96,63	2,92	97,35	2644
4	8,29	16,13	68,61	93,03	6,97	97,51	2,05	96,40	1593
5	57,75	0,04	29,64	87,43	12,57	96,58	0,85	96,05	2689
6	32,78	4,04	58,85	95,67	4,33	98,22	8,07	95,20	4427
7	48,90	0,15	44,97	94,02	5,98	97,12	0,60	96,09	1321
8	74,20	0,00	25,49	99,69	0,31	95,26	1,56	98,65	1585
9	37,34	0,55	42,23	80,12	19,88	96,04	0,59	93,93	3640
9	36,68	0,49	42,75	79,92	20,08	96,35	0,52	94,07	4501
10	44,91	7,05	44,13	96,09	3,91	93,61	2,07	93,59	1149
11	39,98	1,23	40,31	81,52	18,48	94,21	2,02	95,04	1893
12	10,59	16,37	67,34	94,30	5,70	97,33	2,24	96,01	2890
13	55,99	0,63	39,12	95,74	4,26	95,34	1,63	96,51	1268
14	44,94	2,18	41,06	88,18	11,83	95,41	2,13	96,57	1471
15	43,10	0,70	53,58	97,38	2,62	98,74	0,50	98,10	993
16	46,48	0,88	39,87	87,23	12,77	96,53	0,48	93,75	5460
17	41,61	9,12	40,85	91,58	8,42	95,65	0,69	96,04	5897
18	6,57	43,43	46,54	96,54	3,46	95,43	1,61	96,25	1868
19	49,64	11,65	36,21	97,50	2,50	88,60	1,53	94,49	1922
20	53,10	2,76	30,58	86,44	13,56	95,10	2,82	93,29	4214
21	37,32	9,27	43,69	90,28	9,72	93,70	0,43	93,29	1554
22	0,18	10,13	59,06	69,37	30,63	90,03	0,37	87,24	1678
39	18,02	35,08	44,71	97,81	2,19	82,69	0,65	92,20	1049
23	38,99	4,28	38,90	82,17	17,83	96,54	0,53	95,47	2149
24	5,33	17,66	65,30	88,29	11,71	93,31	0,89	92,35	1631
25	18,52	37,27	41,97	97,76	2,24	85,10	0,38	91,98	1787
26	0,00	0,37	37,34	37,71	62,29	97,29	0,24	95,43	1795

Cont / Anexo 7

CASO	3+	2+	1+	ECAD+	ECAD-	BLUE	RED	BROWN	CELLS
27	8,79	33,48	45,55	87,82	12,18	83,35	0,73	89,52	2924
28	18,14	21,98	55,45	95,57	4,43	95,80	0,16	96,54	1174
29	39,08	9,59	42,18	90,85	9,15	96,77	1,15	96,45	1126
30	8,27	23,69	53,67	85,63	14,37	97,04	0,27	94,89	2655
31	25,10	7,21	49,35	81,66	18,34	96,20	0,35	94,44	3386
77	20,65	7,37	44,98	73,00	27,00	95,19	0,35	92,52	1792
33	28,61	12,40	48,54	89,55	10,45	93,76	0,60	94,33	2153
34	0,09	10,22	70,04	80,35	19,65	-5,90	0,32	92,70	4549
35	7,70	27,07	52,93	87,70	12,30	92,40	0,41	93,75	5445
36	2,17	18,56	69,36	90,09	9,91	95,37	0,40	90,32	2807
37	10,39	39,10	47,62	97,11	2,89	92,48	0,61	94,86	1666
38	10,67	30,81	51,78	93,26	6,74	95,30	0,26	96,19	1321
40	4,87	19,75	65,40	90,02	9,98	91,61	0,31	90,16	2734
41	45,94	0,10	30,99	77,03	22,97	93,23	4,25	93,82	7111
42	64,87	5,78	28,27	98,92	1,08	98,88	5,94	99,36	14766
Média	28,82	12,28	47,21	88,31	11,69	91,90	1,22	94,34	2891
Mediana	26,86	9,43	44,98	90,06	9,94	95,36	0,63	94,68	2036