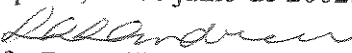


VERA LÚCIA LEITE BONFITTO

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, área de Anatomia Patológica da aluna Vera Lúcia Leite Bonfitto.

Campinas, 10 de julho de 2002.


Profa. Dra. Liliana Andrade
Orientadora

***EXPRESSÃO DO p53, RECEPTORES DE ESTRÓGENO E
PROGESTERONA EM MATERIAL DE CURETAGEM
DIAGNÓSTICA PARA ADENOCARCINOMA ENDOMETRIAL
E SUA CORRELAÇÃO COM OS DADOS MORFOLÓGICOS E
O ESTÁDIO DA DOENÇA, EM HISTERECTOMIAS***

CAMPINAS

2002

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

VERA LÚCIA LEITE BONFITTO

***EXPRESSÃO DO p53, RECEPTORES DE ESTRÓGENO E
PROGESTERONA EM MATERIAL DE CURETAGEM
DIAGNÓSTICA PARA ADENOCARCINOMA ENDOMETRIAL
E SUA CORRELAÇÃO COM OS DADOS MORFOLÓGICOS E
O ESTÁDIO DA DOENÇA, EM HISTERECTOMIAS***

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre
em Ciências Médicas, área de Anatomia Patológica.*

ORIENTADORA: PROF^a. Dr^a. LILIANA A. L. DE ANGELO ANDRADE

CAMPINAS

2002

NIDADE Be
CHAMADA T/UNICAMP
B641e
EX
DMBO BCI 51495
ROC 16.834/02
Dy
REÇO R\$ 11,00
ATA 13/11/02
CPD

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

CMO0176446-0

18 ID 267020

B641e Bonfitto, Vera Lúcia Leite
Expressão do p53, receptores de estrógeno e progesterona em material de curetagem diagnóstica para adenocarcinoma endometrial e sua correlação com os dados morfológicos e o estágio da doença, em histerectomias. / Vera Lúcia Leite Bonfitto. Campinas, SP : [s.n.], 2002.

Orientador : Liliana Aparecida Lucci de Angelo Andrade
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Cancer. 2. Endométrio. 3. Receptores celulares. 4.
Prognóstico. I. Liliana Aparecida Lucci de Angelo Andrade. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
III. Título.

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador(a) : Prof(a). Dr(a). Liliana Aparecida Lucci De Angelo Andrade

Membros:

- 1. Profa. Dra. Liliana Aparecida Lucci De Angelo Andrade**
 - 2. Profa. Dra. Aurea Akemi Abe Cairo**
 - 3. Profa. Dra. Celina Azevedo Sollero**
-

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 10/07.2002

1644501

DEDICATÓRIA

*Ao meu esposo Mario Bonfitto,
amor, companheirismo, dedicação e
apoio incondicional.*

*Aos meus filhos José Luís, João Felipe
e Pedro Henrique,
preciosos frutos e motivo de muito
orgulho.*

*Aos meus pais Zelinda e Argino,
pelo exemplo deixado, tenacidade e luz
que sempre me orientarão.*

*Aos meus mestres, difícil enumerá-los,
porém cada um deles tendo deixado
indelévels marcas.*

A Deus, pela bênção da vida, pelos percalços e dificuldades, tão importantes na formação do nosso caráter.

À Prof^a Dra. Liliana Aparecida Lucci De Angelo Andrade, pela preciosa e meticulosa orientação.

Ao Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, funcionários e amigos, por permitir a realização deste estudo.

Ao Laboratório de Patologia Experimental, pelo valioso auxílio na elaboração deste trabalho, e à Marisa de Almeida Matsura, pelo profissionalismo e dedicação.

À Prof^a Dra. Ilma Aparecida Paschoal, pelo incondicional apoio e amizade.

À Prof^a Dra. Áurea Akemi Abe Cairo, à Prof^a Dra. Celina de Paula A. Sollero, membros da banca examinadora, pelo profissionalismo e amizade.

À Prof^a Dra. Albina M. M. Alternani e à Prof^a Dra. Cecília A. F. Escanhoela, membros da pré-banca examinadora, pelo incentivo e amizade.

	PÁG.
RESUMO.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1. Generalidades.....	18
1.1.1. Frequência.....	18
1.1.2. Fatores de Risco.....	18
1.1.3. Tipos Histológicos.....	20
1.1.4. Fatores prognósticos.....	22
1.2. Carcinogênese.....	26
2. OBJETIVOS.....	36
2.1. Objetivos gerais.....	37
2.2. Objetivos específicos.....	37
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	38
3.1. Tamanho da Amostra.....	39
3.2. Seleção dos Sujeitos.....	39
3.3. Coleta de Dados.....	39
3.4. Critérios de Seguimento e Avaliação.....	39
3.5. Seleção do Material.....	40
3.6. Processamento Laboratorial.....	41
3.6.1. Técnica de Imunoistoquímica.....	41
3.6.2. Leitura das Lâminas.....	44
3.7. Aspectos Éticos.....	44

3.8. Método para a Análise dos Dados.....	44
3.8.1. Metodologia Estatística.....	45
4. RESULTADOS.....	46
4.1. Característica da Amostra.....	47
4.2. Marcadores e Tipo Histológico.....	49
4.3. Marcadores e Grau Histológico.....	55
4.4. Marcadores e Estádio Final da Doença.....	56
5. DISCUSSÃO.....	57
5.1. Expressão do p53.....	60
5.1.1. Em relação do tipo histológico.....	60
5.1.2. Em relação ao grau histológico.....	61
5.1.3. Em relação ao estágio da doença.....	62
5.2. Receptores de Estrógeno e de Progesterona.....	62
5.2.1. Em relação ao tipo histológico.....	62
5.2.2. Em relação ao grau histológico.....	63
5.2.3. Em relação do estágio da doença.....	64
5.3. Expressão global dos marcadores.....	64
6. CONCLUSÃO.....	65
7. SUMMARY.....	67
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
9. BIBLIOGRAFIAS DE NORMATIZAÇÕES.....	81
10. ANEXOS.....	83

LISTA DE ABREVIATURAS

AE	adenocarcinoma endometrióide
AM	adenocarcinoma misto
ANE	adenocarcinoma não endometrióide
CAISM	Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher
CDK	ciclin dependent kinases
CTG	curetagem
DAB	3,3 tetra-hidrocloreto de diamino-benzidina
DMSO	dimetil sulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucléico
E I, II, III, IV	estádios I, II, III, IV
EFD	estádio final da doença
ERE	estrogen response element
Fases G1, G2	gap1, gap2
S	sítese
M	mitose
R	repouso (parada do ciclo celular)
FIGO	Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
G I, II, III	Graus I, II, III
kb	kilobases
kd	kilodaltons
OMS	Organização Mundial da Saúde

p	teste exato de Fisher
PBS	phosphate buffer saline
RE	receptor de estrógeno
RP	receptor de progesterona
RNA_m	ácido ribonucleico mensageiro
SAS	Statistical Analysis System
SERM	Selective Estrogen Receptor Modulators
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
WHO	World Health Organization

p53	gene supressor de tumor que codifica proteína de 53 kilodaltons (kd).
p16, p27, p21	genes inibidores de CDK que codificam proteínas de 16 kd, 27 kd e 21 kd.
Genótipo	características do indivíduo dadas pelos genes.
Fenótipo	características do indivíduo que pode se ver ou mensurar como consequência da atividade do gene.
Alelo	forma alternativa do mesmo gene. Todos os genes existem em duas cópias e cada uma é um alelo.
Códons	seqüência de três nucleotídios.
Nucleotídeos	unidade do DNA e do RNA constituído por açúcar, fosfato e base nitrogenada.
Bases	compõem os ácidos nucléicos e são as purinas (adenina e guanina) e as pirimidinas (citosina e timina).
Exons	seqüências de bases que fazem parte da mensagem definitiva do gene.
Genoma	totalidade das mensagens codificadas numa molécula de DNA.
Transcrição	processo que converte o código de DNA para o RNAm complementar.
Translação	processo no qual aminoácidos específicos são incorporados na proteína, ditados pela seqüência de RNAm.
Translocação	recombinação de segmentos do código genético não homólogos.
Amplificação	presença de múltiplas cópias do gene na célula. Normalmente há somente duas cópias por célula somática.
Deleção	deleção de parte ou todo o gene através da remoção das seqüências de DNA.

Mutação	alteração no DNA.
Expressão	transcrição ativa de um gene para a molécula de RNA, seguida de transdução do produto protéico.
Heterozigose	duas diferentes formas do mesmo gene na célula. Os polimorfismos são responsáveis pelo status da heterozigose.
Perda da heterozigose	perda de regiões específicas do DNA de uma cópia de um cromossomo.
Polimorfismo	variação na exata sequência de bases.
Tipo selvagem	termo usado para descrever o gene normal ou o produto do gene. O gene que tem a sequência de DNA alterada é referido como gene mutante e o seu produto como proteína mutante.

	PÁG.
Tabela 1: Relação da idade das pacientes com o tipo histológico do tumor.....	47
Tabela 2: Distribuição dos casos conforme o grau histológico.....	47
Tabela 3: Comparação entre o tipo e o grau histológico no material de curetagem e na peça de histerectomia.....	48
Tabela 4: Distribuição dos casos conforme o estágio da doença.....	48
Tabela 5: Relação dos estádios com os tipos de carcinoma endometrióide e não endometrióide.....	49
Tabela 6: Relação entre os marcadores p53, RE e RP e tipos histológicos.....	55
Tabela 7: Relação entre marcadores p53, RE e RP e o grau histológico do adenocarcinoma endometrióide.....	55
Tabela 8: Relação entre receptores p53, RE e RP e estádios dos carcinomas....	56
Tabela 9: Relação entre receptores p53, RE e RP e estádios dos carcinomas agrupados.....	56

	PÁG.
Figura 1: Esquema do ciclo celular demonstrando as fases G0, G1, S, G2 e M, e sua correlação com os genes inibidores p21, p27 e p16, coordenada pelo p53 (LEWIN, 1997, mod.).....	31
Figura 2: Esquema representativo da resposta ao hormônio esteróide a nível molecular (ALBERTS et al, 1994, mod.).....	34
Figura 3: Esquema representativo do mecanismo de ação do estrógeno a nível celular (JORDAN, 1998, mod.).....	35
Figura 4: Adenocarcinoma endometrióide bem diferenciado (G I), mostrando predomínio de formação glandular (coloração HE; objetiva 20x).....	50
Figura 5: Coloração imunoistoquímica negativa para o p53, no adenocarcinoma bem diferenciado (G I) (objetiva 20x).....	50
Figura 6: Adenocarcinoma não-endometrióide, padrão de células claras, mostrando células de citoplasma amplo, vacuolado, com marcada atipia nuclear (coloração HE; objetiva 40x).....	51
Figura 7: Coloração imunoistoquímica positiva para o p53, no adenocarcinoma não-endometrióide, padrão de células claras; notar acentuada coloração nuclear (objetiva 20x).....	51
Figura 8: Adenocarcinoma não-endometrióide, padrão seroso-papilífero; notar papilas finas e delicadas com acentuada atipia nuclear (coloração HE; objetiva 10x).....	52
Figura 9: Coloração imunoistoquímica positiva para o p53, no adenocarcinoma não-endometrióide, padrão seroso-papilífero; notar acentuada coloração nuclear (objetiva 20x).....	52

Figura 10:	Adenocarcinoma endometrióide pouco diferenciado (G III), mostrando padrão sólido predominante (coloração HE; objetiva 20x).....	53
Figura 11:	Coloração imunoistoquímica positiva para o p53, no adenocarcinoma endometrióide pouco diferenciado (G III); notar núcleos fortemente corados (objetiva 20x).....	53
Figura 12:	Coloração imunoistoquímica positiva para receptor de estrógeno no adenocarcinoma endometrióide bem diferenciado (G I); notar núcleos fortemente corados (objetiva 20x).....	54
Figura 13:	Coloração imunoistoquímica positiva para receptor de progesterona no adenocarcinoma endometrióide bem diferenciado (G I); notar núcleos fortemente corados (objetiva 20x).....	54



RESUMO

Introdução: O estágio do diagnóstico é importante fator prognóstico no adenocarcinoma do endométrio. Além do tipo histológico e do grau de diferenciação da neoplasia, alguns marcadores parecem estar associados ao estágio e ao comportamento biológico da doença, entre eles, o p53 e os receptores de estrogênio (RE) e de progesterona (RP). O **objetivo** do presente trabalho foi comparar a expressão do p53, RE e RP no material de curetagem diagnóstica para adenocarcinoma do endométrio, relacionando-a com o tipo histológico, grau de diferenciação e estágio final da doença na peça de histerectomia. **Métodos:** 51 curetagens de adenocarcinoma foram estudadas através da reação imunoistoquímica com o método da avidina-biotina-peroxidase e os resultados obtidos foram comparados aos dados de histerectomia e estágio final da doença. **Resultados:** - **quanto ao tipo histológico:** dos 51 casos, 44 (86%) eram do tipo endometrióide (AE) e 7 (14%) não-endometrióide (ANE). A expressão do p53 foi observada em 16% do AE e em 71% dos ANE ($p < 0,05$). Embora a expressão dos RE fosse mais evidente nos AE (54%) do que nos ANE (29%), isto não foi estatisticamente significativo. A expressão do RP foi significativamente maior nos AE (70% X 14%, $p < 0,05$). - **quanto ao grau histológico:** os AE grau I expressaram RE e RP melhor do que os de grau II e III enquanto que a expressão do p53 foi demonstrada principalmente nos tumores de graus II e III. - **estádio da doença na peça de histerectomia:** as expressões do p53 e do RE na curetagem não foram relacionadas com o estágio da doença. Já a expressão do RP foi significativamente menor nos estádios avançados. **Conclusão:** A expressão do p53 é observada na maioria dos ANE e nos AE de alto grau, não estando relacionada com o estágio da doença. Os RE e RP são encontrados principalmente nos carcinomas endometrióides G I, porém apenas a falta de expressão do RP esteve associada significativamente ao estágio avançado da doença (E III).



1. INTRODUÇÃO

1.1. GENERALIDADES

1.1.1 Frequência:

O carcinoma de endométrio é responsável por cerca de 90% das neoplasias malignas do corpo uterino. É a quarta neoplasia mais comum da mulher ocidental e o câncer ginecológico mais freqüente nos países desenvolvidos (BALL et al., 1996). Também ocupa o segundo lugar em mortalidade (PARKER et al., 1996). No Brasil, o carcinoma de endométrio é a quinta neoplasia mais freqüente entre as mulheres e, dentre as de causa ginecológica, atinge o segundo lugar (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1993). A sua incidência no Estado de São Paulo é de 14/100.000 mulheres (FRANCO, 1994). Na Universidade Estadual de Campinas, a neoplasia maligna ginecológica é a causa de óbito mais freqüente entre os cânceres e dentre eles, a do corpo uterino está em segundo lugar (PEDRO et al., 1996).

A incidência do carcinoma endometrial é dependente da idade pois aos 40 anos, são citados 12 casos por 100.000 mulheres enquanto que aos 60 anos a proporção sobe para 84 casos por 100.000 mulheres (PARKER et al., 1996). Em 1994, em pesquisa realizada com 879 pacientes, GOMPEL & SILVERBERG (1994) verificaram que sua freqüência vem crescendo com o aumento da longevidade da população, porque 75% dos casos surgem após os 50 anos.

Após 1970, a incidência de câncer endometrial nos Estados Unidos que antes era de 20:100.000 mulheres, subiu para 30:100.000, acompanhando a maior utilização de estrógeno pelas mulheres menopausadas (ROSE, 1996). A partir de 1975, a diminuição dos casos de câncer ocorreu concomitantemente à diminuição do uso deste hormônio, reforçando-se a hipótese de que o excesso de exposição estrogênica está relacionado com a carcinogênese endometrial (PARKER et al., 1996).

1.1.2. Fatores de risco:

Estudos epidemiológicos apontam como fatores de risco associados ao câncer de endométrio: o uso de estrógeno exógeno pela mulher menopausada, fatores menstruais (menarca precoce, menopausa tardia), nuliparidade, doença dos ovários policísticos,

obesidade, hipertensão, diabete melito (MAHBOUBI, EYLER, WYNDER, 1982; GUSBERG & MULVIHLL, 1986; FOLEY & LEE, 1990).

Como fatores menstruais, a menarca precoce e a menopausa tardia são considerados fatores de risco devido à prolongada exposição do endométrio ao estrógeno. A maioria das mulheres jovens com carcinoma de endométrio ou são obesas ou têm altos níveis de estrógeno endógeno, possuindo anovulação crônica, assim como aquelas com doença dos ovários policísticos. Embora as concentrações de estrógeno e de progesterona aumentem durante a gravidez, é a progesterona o hormônio predominante. Por esse fato, a gravidez confere proteção contra o carcinoma de endométrio através da interrupção do contínuo estímulo estrogênico. A nuliparidade é pois, também um fator de risco.

A hipertensão e o diabete melito são citados como fatores de risco para o carcinoma de endométrio (COHEN & RAHAMAN, 1995; LAPINSKA et al., 1998) sendo o mecanismo carcinogênico controverso. Segundo GOMPEL & SILVERBERG (1994) não há relação com a hipótese estrogênica. Já GIANNONE et al.(1993) afirmam que estes fatores agem sob um denominador comum que é o hiperestrogenismo. Em pacientes com carcinoma endometrial, o risco relativo estimado para diabéticas é de 2,7 (DUBEAU, 1993). Já a hipertensão é avaliada como não sendo uma variável independente quando a correção é feita para outros fatores (COHEN & RAHAMAN, 1995). A análise clínica dos fatores de risco realizada entre 1983 – 1997, na Polônia, com 117 pacientes com carcinoma endometrial, apresentou 11,9% de pacientes diabéticas e 43,6%, hipertensas (LAPINSKA et al., 1998).

A obesidade, como fator de risco, é explicada tendo em vista que nos tecidos periféricos ricos em gordura, há a conversão de andrógenos, produzidos pela supra-renal e pelo ovário, em estrógenos, através da enzima aromatase, aumentando portanto o nível de estrona e estradiol. No entanto ainda não está claro se o risco atribuído à obesidade se deve unicamente à elevação estrogênica ou se outros mecanismos não hormonais podem também estar envolvidos (JUDD et al., 1982). O nível de risco está relacionado ao grau de obesidade, e está aumentado 10 vezes para mulheres com excesso de peso maior que 23 kg (DUBEAU et al., 1993).

Recentemente o uso do Tamoxifeno foi apontado como provável fator de risco. O Tamoxifeno é um composto anti-estrogênico não esteróide, que vem sendo usado no tratamento do câncer de mama e de metástases, nos quais haja receptores hormonais positivos (ROBINSON et al., 1995; EARLY BREAST CANCER TRIALISTS' COLLABORATIVE GROUP, 1998; OSBORNE, 1998). Seu mecanismo de ação não é conhecido com exatidão. Sabe-se que o Tamoxifeno é denominado um modulador seletivo de receptores de estrógeno (SERM – em inglês, selective estrogen receptor modulators); seletivo, porque ele possui um efeito agonista, ou antagonista, dependente do órgão em que atua (JORDAN, 1998; OSBORNE, 1998). No caso da mama, a ligação do SERM com o receptor estrogênico produzirá um efeito anti-estrogênico, inibindo-se portanto a atividade tumoral. Já no endométrio, ossos e artérias, a ligação do SERM com o receptor estrogênico produzirá um efeito semelhante ao estrógeno, favorecendo portanto, a proliferação de tumores que ocorreriam dependendo da dose e do tempo usados (ROBINSON et al., 1995). A relação do Tamoxifeno com o carcinoma do endométrio tem apresentado estudos a favor e contra. A relação de risco parece existir mas é dependente da dose e tempo de tratamento. Embora o Tamoxifeno aumente o risco, os dados ainda são conflitantes quanto ao predomínio de tumores endometrióides ou não endometrióides, talvez refletindo sua ação dualística (ROSE, 1996; SHERMAN, 2000).

Citados como fatores de proteção ao aparecimento do câncer uterino por agirem opondo-se aos efeitos estrogênicos estão os contraceptivos orais contendo progesterona, e o fumo que pode reduzir o risco de carcinoma endometrial por inativação do estrógeno, através da hidroxilação da posição 2-alfa (ROSE, 1996), sendo considerados fatores significativos (COHEN & RAHAMAN, 1995).

1.1.3. Tipos histológicos:

O carcinoma de endométrio varia tanto nos aspectos clínicos como nos histopatológicos. Histologicamente podemos subdividir o carcinoma de endométrio em dois grandes grupos distintos: os carcinomas endometrióides, mais freqüentes, e os não-endometrióides. Esta divisão tem sido didaticamente usada mais recentemente, tendo em

vista estudos de BOKHMAN (1983) propondo um modelo dualístico da carcinogênese endometrial. Segundo este modelo haveria duas vias: 1- a clássica, como sendo um mecanismo através do qual tumores indolentes se desenvolveriam a partir de lesões hiperplásicas, associados a altos níveis estrogênicos; 2- a alternativa, através da qual tumores mais agressivos surgem não associados a níveis estrogênicos, nem a lesões hiperplásicas.

Os carcinomas oriundos da via clássica são denominados tipo 1, e os demais, tipo 2.

De acordo com este modelo portanto, os carcinomas tipo 1 são os de tipo endometrióide, associados com hiperlipidemia, obesidade e sinais de hiperestrogenismo como: ciclos anovulatórios, infertilidade, menopausa tardia e hiperplasia endometrial.

A hiperplasia atípica é apontada como a lesão precursora freqüentemente associada aos carcinomas endometrióides (tipo 1), sendo que a grande maioria das hiperplasias sem atipias provavelmente representem lesões reversíveis (BURTON & WELLS, 1998; KAKU et al., 1999; SHERMAN, 2000).

Baseado nestas observações tem sido sugerida a correlação entre os carcinomas tipo 1 com o endometrióide, e o tipo 2 com o não-endometrióide, incluindo a maioria dos carcinomas mais agressivos como o seroso, o carcinoma de células claras, o carcinoma de células escamosas e o indiferenciado (MUTTER, 2000; MUTTER et al., 2000).

Evidências clínico-patológicas da existência de duas vias na carcinogênese endometrial já haviam sido observadas por HENDRICKSON (1982) pelo fato dos carcinomas serosos (tipo 2) serem responsáveis por 50% das recorrências em 256 casos estudados de carcinoma em estágio I. CARCANGIU et al., 1997, observaram carcinoma seroso associado a endométrio geralmente atrófico. Estudos histopatológicos posteriores (SHERMAN, 2000; WESHOFF et al., 2000) sugeriram que a maioria dos carcinomas serosos se desenvolve a partir de uma entidade histológica denominada carcinoma intraepitelial, que representaria a transformação maligna do endométrio atrófico, isto é, as células endometriais seriam substituídas por células anaplásicas semelhantes às do carcinoma seroso.

1.1.4. Fatores prognósticos:

Os fatores prognósticos das neoplasias do endométrio são elementos importantes para indicar o comportamento tumoral. Dentre eles destacam-se: aspectos morfológicos, tipo histológico, grau de diferenciação histológica, estágio e mais recentemente, fatores relacionados ao comportamento biológico do carcinoma do endométrio como a expressão do p-53 e dos receptores de estrógeno e progesterona.

1.1.4.1. Aspectos morfológicos:

Além do tamanho do tumor, o grau de invasão miometrial e cervical são parâmetros confiáveis que se correlacionam bem com o prognóstico. Para SCHINK et al. (1987) pacientes portadores de tumor com invasão miometrial de menos da metade da espessura não estariam propensos a apresentar metástases linfonodais. A invasão do colo uterino tem sido vista também como fator prognóstico importante apesar de outros autores considerarem não ser um fator significativamente associado com a recorrência da doença (DE PALO et al., 1982; BELINSON et al., 1985; CHEN, 1989; PODCZASKI et al., 1989; LURAIN et al., 1991; MORROW et al., 1991). Também são avaliados a presença ou não de invasão vascular, o padrão do endométrio residual adjacente não neoplásico e o acometimento ganglionar linfático e extrauterino. A invasão vascular é também um fator prognóstico e está relacionada ao tipo histológico, ao grau histológico, à invasão miometrial e às metástases ganglionares (SIDAWY & SILVERBERG, 1992).

1.1.4.2. Tipo histológico:

O tipo endometrióide é o mais comum e freqüentemente puro. Existem neoplasias que mostram além da diferenciação endometrióide, áreas com outra diferenciação (mucinosas, células claras, etc) que, se representam mais de 10% do tumor, são classificados como adenocarcinomas mistos, com prognóstico que se assemelha ao tipo Endometrióide (GOMPEL & SILVERBERG, 1994). As neoplasias não-endometrióides, como o carcinoma de células claras e o seroso, se apresentam como variáveis prognósticas independentes, mostrando alta agressividade e surgindo geralmente em mulheres em idade

mais avançada do que aquelas com adenocarcinoma endometrióide (NOGALES, 1997; BURTON & WELLS, 1998).

1.1.4.3. Grau de diferenciação histológica:

Segundo a Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO), a graduação histológica dos carcinomas de endométrio é feita de acordo com os seguintes critérios (Announcements: FIGO stages – 1988):

- Grau I – Adenocarcinomas que apresentam menos de 5% de áreas sólidas.
- Grau II – os que apresentam entre 5 a 50% de áreas sólidas.
- Grau III – os que apresentam mais de 50% de áreas sólidas.

Considerando-se a sobrevida em 5 anos, os adenocarcinomas Grau I têm apresentado o índice de 91,7%, os de Grau II, 86,7% e os de Grau III, 73,6% (FIGO Annual Report, 1998). No entanto esta regra é válida apenas para os carcinomas do tipo endometrióide. MORROW et al. (1991) e JONES et al. (1997) relataram que carcinomas Grau III têm risco quinze vezes maior do que carcinomas Grau I para a recorrência da doença.

A graduação histológica é usada para classificar o tipo histológico endometrióide, uma vez que os não-endometrióides têm comportamento independente de sua graduação.

1.1.4.4. Estádio:

O estágio clínico proposto pela FIGO (1988) surgiu com o objetivo de estabelecer um critério de uniformidade. Segundo este ficam conceituados como:

- Estádio I: quando o tumor está confinado ao corpo uterino sendo,
 - IA – tumor limitado ao endométrio.
 - IB – tumor invadindo menos da metade do miométrio.
 - IC – tumor invadindo mais da metade do miométrio.

- Estádio II: quando o tumor se estende ao colo uterino, sendo,

IIA – tumor se estendendo apenas ao epitélio glandular endocervical.

IIB – tumor invadindo o estroma do colo uterino.

- Estádio III: quando o tumor mostra extensão para a pelve sendo,

IIIA – tumor invadindo a serosa uterina e/ou anexos e/ou havendo positividade para células malignas na citologia peritonal.

IIIB – presença de metástases na vagina.

IIIC – presença de metástases para a pelve e/ou linfonodos para-aórticos.

- Estádio IV: quando o tumor apresenta extensão extra-pélvica, sendo,

IVA – invasão da bexiga e/ou mucosa intestinal.

IVB – presença de metástases à distância incluindo metástases intra-abdominais e/ou linfonodos inguinais.

Ficou demonstrado através de estudos (SIDAWY & SILVERBERG, 1992; SCHINK et al., 1991) que o risco para metástases em gânglios linfáticos pélvicos e para-aórticos está associado ao tipo histológico, ao grau de diferenciação histológica e à profundidade da invasão miometrial. Pacientes com tumores menores de 2 cm de diâmetro, com graus histológicos I ou II, e com invasão miometrial superficial são considerados de baixo risco para metástases ganglionares. Já nos tumores de grau histológico III ou com invasão miometrial profunda, este risco sobe para mais de 20%.

Segundo ROSE (1996) há três categorias de risco em carcinomas de endométrio:

- Baixo risco, com pacientes em estágio I, apresentando carcinoma de padrão endometrióide grau I ou II e com invasão de menos da metade do miométrio.

- Risco intermediário, com pacientes em estágio I apresentando carcinoma de padrão endometrióide de graus I a III, e com invasão de mais da metade do miométrio.
- Alto risco, com pacientes em estágio II, III e IV e apresentando carcinoma de padrão endometrióide ou qualquer estágio nos carcinomas de padrão não-endometrióide.

O estágio geralmente é pior para carcinomas serosos, de células claras, de células escamosas ou neoplasias indiferenciadas.

A partir de 1988 foi introduzido o estágio intra-operatório do carcinoma do endométrio, onde a avaliação dos dados morfológicos é muito importante e pode indicar a melhor conduta cirúrgica. Através destes dados é possível selecionar as pacientes que realmente se beneficiarão com a linfadenectomia retroperitoneal, quais as de maior risco para a doença extra-uterina, visto que a linfadenectomia é um procedimento que aumenta o tempo cirúrgico, elevando a morbidade principalmente nestas pacientes que são frequentemente idosas, obesas e hipertensas.

1.1.4.5. p53, receptores de estrógeno e de progesterona:

A expressão do gene p53 tem sido proposta como um parâmetro prognóstico significativo. ITO et al. (1994) estudaram 221 casos de adenocarcinoma de endométrio dos quais 21,3% mostraram positividade para o p53. Destes, 41,2% em estágio III e IV, e 50% dos casos estágio I e II eram os que mostravam pior prognóstico. Também a positividade para o p53 é muito freqüente nos carcinomas serosos. Portanto, os autores acreditam que a positividade para o p53 possa indicar um grupo de alto risco de recorrência.

A ausência ou baixos valores para os receptores de estrógeno e de progesterona estão associados aos estádios avançados, tipo e grau histológicos, de pior prognóstico (BERCHUCK et al., 1994; LUKES et al., 1994; BURTON & WELLS, 1998; FERNANDO et al., 2000; KOUNELES et al., 2000).

1.2. CARCINOGENESE

Os mecanismos para a carcinogênese têm sido bastante estudados nas últimas décadas. Sabe-se que o desenvolvimento do câncer está baseado nos seguintes princípios (COTRAN et al., 1999):

- as mutações ou danos genéticos podem ocorrer por ação de agentes ambientais como agentes químicos, irradiação ou vírus, ou podem ser herdadas (JENKINS et al., 1984; LEVINE et al., 1991).
- os principais alvos destas mutações são: os proto-oncogenes (que promovem o crescimento celular), os antioncogenes (que são os genes supressores inibindo o crescimento celular), os genes que regulam a morte celular programada ou apoptose, e ainda os genes que regulam o conserto do DNA danificado inclusive dos genes anteriormente citados.

A carcinogênese é um processo com múltiplas etapas, tanto em nível fenotípico quanto genotípico. Atributos fenotípicos como velocidade de crescimento, invasão local e metástases à distância vão ditar a progressão do tumor.

Os oncogenes ou genes que causam câncer são derivados dos proto-oncogenes, ocorrendo esta transformação a partir de transdução viral ou por outras influências que alterem o comportamento do gene dentro da célula. Os oncogenes codificam proteínas (oncoproteínas) que atuam de modo diferente das normais, não possuindo elementos reguladores e sua produção independentemente de fatores de crescimento ou outros sinais externos.

Como se sabe, a apoptose é o processo fisiológico no qual ocorre a deleção celular.

A resistência da célula em sofrer a apoptose pode ter um papel fundamental na carcinogênese. Este mecanismo molecular que regula a apoptose foi recentemente elucidado sendo que a identificação de alguns reguladores deste processo, como o gene supressor de tumor p53, tem permitido o entendimento do mecanismo da resposta tumoral (SPENCER et al., 1996; IOFFE et al., 1998).

Recentes avanços na biologia molecular têm trazido o conceito de que carcinomas surgem devido ao acúmulo de uma série de alterações genéticas envolvendo a ativação dos proto-oncogenes e inativação dos genes supressores de tumor (LANE, 1992; LODISH et al. 1996; COTRAN et al.1999).

O ciclo celular é ativado por fatores de regulação nuclear e se desenvolve em 4 fases: G1 (gap ou lacuna), S (síntese), G2 e M (mitose). Na fase G1 a célula acumula no citoplasma os materiais necessários para o desdobramento do DNA. Após, há uma pausa denominada primeira parada ou R, na qual haverá uma checagem da fita de DNA, antes da progressão do ciclo. Se houver alguma anormalidade na informação genética, a mesma deverá ser reparada neste ponto, caso contrário o processo não prosseguirá. Na fase S e na fase G2 há o armazenamento dos materiais necessários para a mitose. Por último ocorre a fase M onde há duplicação celular (CORTNER & WOUDE, 1997; GOMPEL & KOSS, 1997).

O controle do crescimento celular envolve 5 tipos de proteínas reguladoras:

I – Fatores do crescimento

II – Receptores dos fatores de crescimento e receptores intracelulares

III – Transdutores

IV – Fatores de transcrição

V – Proteínas que controlam o ciclo celular

Mutações na estrutura ou na expressão dos primeiros quatro tipos originam os chamados oncogenes predominantemente ativos. As proteínas do tipo V, atuam principalmente como supressores de tumor e mutações nos genes que as codificam originariam células tumorais de crescimento descontrolado e sobrevivência alterada (LODISH et al., 1996; COTRAN et al., 1999).

A progressão do ciclo celular é controlada por um grupo de proteínas reguladoras denominadas Ciclinas e Quinases dependentes das Ciclinas (CDK - em inglês, cyclin dependent kinases). Ambas agem inibindo ou ativando fases específicas do ciclo celular.

1.2.1. Genes supressores de tumor:

Codificam proteínas capazes de regular o crescimento celular, suprimindo o comportamento maligno das células. Dentre eles está o p53, talvez o gene supressor mais estudado, sendo suas mutações descritas em vários cânceres humanos como de mama, colo uterino, cólon, pulmão, fígado, próstata, bexiga e pele (BENNETT et al., 1991; THOR et al., 1992; SPENCER et al., 1996; BENJAMIN et al., 1996; GODWIN et al., 1997; SCHEISTROEN et al., 1999). Ele é assim chamado porque codifica a proteína nuclear de 53 kilodaltons (kd), localizando-se no braço curto do cromossoma 17, a nível da banda 13.1 (HONDA et al., 1993). O p53 é composto de 11 exons, e se estende ao longo de 16 a 20 kilobases (kb), transcrevendo-se como uma molécula de RNAm de 2,6 kb, que codifica uma proteína de 53 kd, a qual está presente no núcleo da célula em forma de tetrâmero. A inativação da proteína p53 ocorre por deleção ou mutação do gene. No gene p53 a mutação de um só alelo pode causar a transformação de células normais em células tumorais, devido ao efeito dominante que o alelo mutado exerce sobre o normal (LEWIN, 1997). A grande maioria das mutações descritas ocorre entre os aminoácidos localizados nos exons de 5 a 8 (LIVINGSTONE et al., 1992; HONDA et al., 1993; WOLF & WHARTON, 1996; SHAHIN et al., 2000), sendo seu efeito, alterações na estrutura terciária da proteína, provocar a sua inativação e conseqüente perda da sua capacidade de união ao DNA, ou seja perda da sua função de transcrição (MILNER & MEDCALF, 1991). Esta alteração estrutural produz uma estabilização da proteína, aumentando sua vida média e fazendo-a detectável mediante técnicas imuno-histoquímicas (THOR et al., 1992; LEVINE et al., 1991). A inativação da proteína p53 pode também ocorrer como conseqüência de uma infecção viral (JENKINS et al., 1984; LEVINE et al., 1991); isto se deve à propriedade desta proteína de formar complexos estáveis com outras proteínas, tais como as oncogênicas virais, dentre elas a proteína E6 do vírus do papiloma humano (HPV) tipo 16 (LEVINE et al., 1991; TENTI et al., 1998). Deste modo os vírus podem inativar a proteína p53 criando um efeito similar à proteína mutada, ocasionando o desenvolvimento de tumores. A expressão do p53 na forma nativa ou “wild” se faz através de proteínas que se localizam no núcleo celular e que têm vida média curta, de 6 a 20 minutos e nesta condição é dificilmente detectada por métodos imunoistoquímicos. Sua função é manter a integridade do genoma, protegendo a informação genética da célula (JENKINS et al., 1984;

LANE, 1992). Desta forma, quando existe algum dano no DNA celular, o gene p53 é ativado, parando o ciclo celular no ponto R, na fase G1, para permitir que o DNA recupere-se antes de prosseguir o ciclo (KASTAN et al., 1991; YIN et al., 1992). Assim, o gene p53, através de sua proteína, envia sinal para outros genes chamados inibidores de CDK/ciclina como o p16, p27 e o p21, havendo parada do ciclo celular (XIONG et al., 1993; NIKAIDO et al., 1996). Se houver reparo do DNA, o p21 sinaliza para o complexo CDK/ciclina para prosseguir o ciclo. Em condições normais, se não houver restauração do DNA, o gene p53 sinaliza para outros genes reguladores e há indução da apoptose, eliminando a célula com a informação genética avariada (BURTON et al., 1999; SALVESEN et al., 1999)(FIGURA 1).

No entanto sabe-se que mutações do gene p53 podem ocorrer após dano ao DNA por fontes endógenas ou exógenas. Nestes casos, a proteína p53 codificada pelo gene mutado passa a ter vida média mais longa, de 6 a 8 horas, o que a torna detectável por método imunoistoquímico. Em presença do gene p53 mutante, a alteração do DNA celular acaba não levando à apoptose e assim a célula geneticamente danificada pode dar origem eventualmente à neoplasia maligna (HONDA et al., 1993; ENOMOTO et al., 1993).

1.2.2. Receptores de esteróides:

A presença de receptores de esteróides tem sido relatada como sendo importante indicador prognóstico e um fator de ajuda na escolha da terapêutica sistêmica a ser usada em pacientes portadores de carcinoma de mama (MILLIS, HANBY, GIRLING, 1994). Também é descrita forte correlação entre carcinomas de mama de baixo grau e receptores de progesterona (MACGROGAN et al., 1996; TASKIN et al., 1997).

O ciclo endometrial segue eventos bem esquematizados de alterações morfológicas e fisiológicas, caracterizadas por proliferação, diferenciação secretória, degeneração e regeneração do endométrio. Essas alterações são controladas pela liberação cíclica do estradiol e da progesterona ovarianos. Conseqüentemente, o endométrio é um indicador altamente sensível do eixo hipotálamo-hipófise-ovário. O controle do

estrógeno sobre as células endometriais, epiteliais, estromais e possivelmente também as endoteliais é mediado através dos receptores de estrógeno e de progesterona. Esses receptores são proteínas específicas concentradas no núcleo das células, tendo alta afinidade de se ligar ao estrógeno e à progesterona. A concentração dos receptores de estrógeno e de progesterona no endométrio normal varia durante o ciclo menstrual de acordo com os níveis plasmáticos de estrógeno e de progesterona. O estrógeno promove a síntese de receptores de estrógeno e de progesterona, enquanto que a progesterona inibe a síntese de receptores de estrógeno. Estudos imunoistoquímicos demonstraram a presença de receptores de estrógeno mais no núcleo do que no citoplasma das células epiteliais endometriais ou das células estromais (KURMAN & NORRIS, 1994).

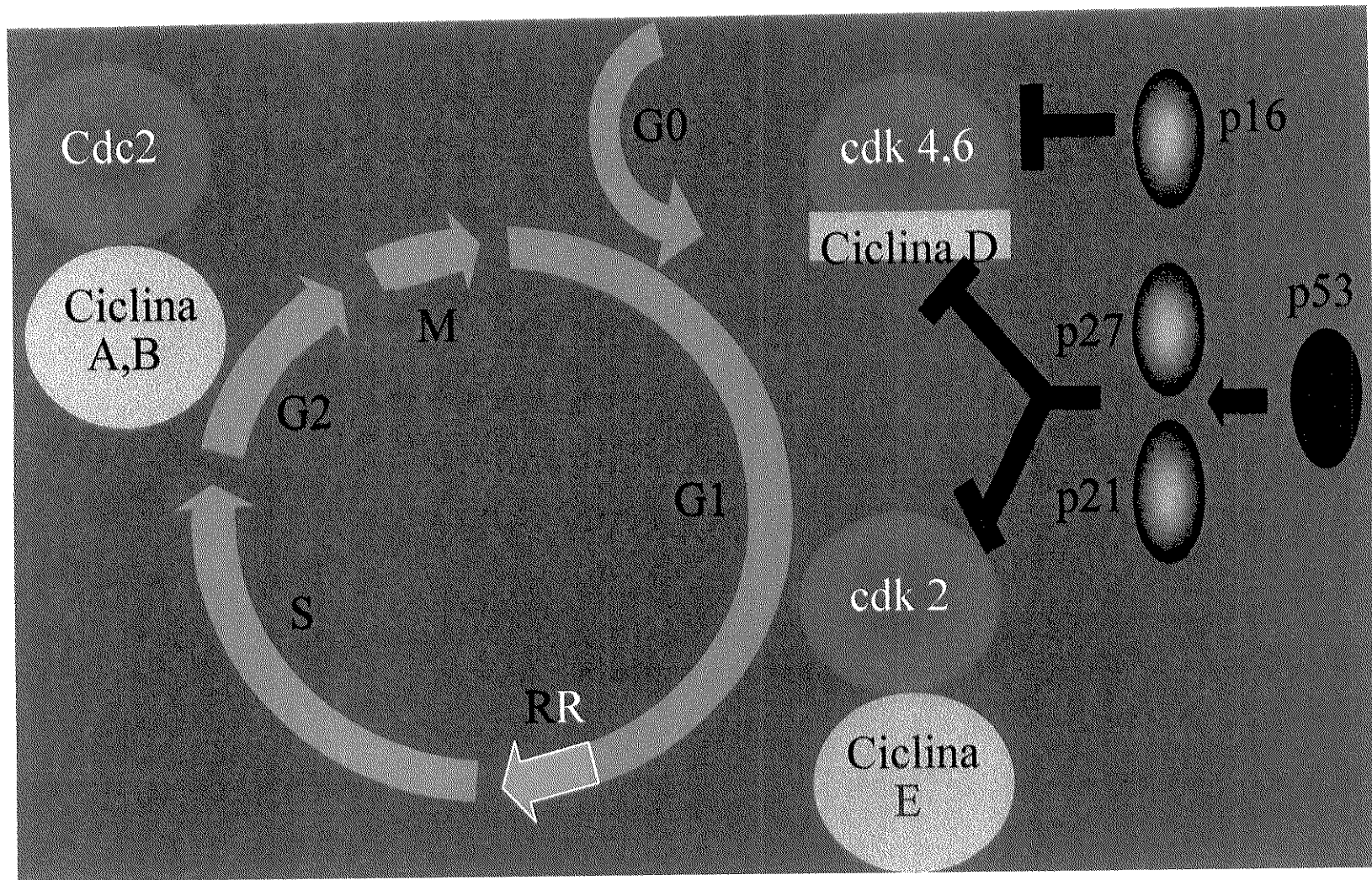


Figura 1: Esquema do ciclo celular demonstrando as fases G0, G1, S, G2 e M, e sua correlação com os genes inibidores p21, p27 e p16, coordenada pelo p53 (LEWIN, 1997, mod.)

Os esteróides são pequenas moléculas lipossolúveis que atravessam facilmente a membrana celular e ligam-se diretamente a um receptor de esteróide. Os hormônios esteróides reagem com os receptores no citoplasma da célula. O efeito final da ativação do receptor é geralmente a interação com o DNA no núcleo, através de uma série de etapas intermediárias. O complexo esteróide-receptor protéico funciona como um fator de transcrição que age sobre um determinado segmento de DNA no núcleo que é então acionado ou inibido (WALTER & TALBOT, 1996).

Os receptores são estruturas celulares de natureza protéica, não estáticas, pois podem mudar de posição e por outro lado, sua quantidade pode aumentar ou diminuir dependendo da ação do próprio hormônio ou de outros fatores (ALBERTS et al., 1994). Os hormônios esteróides difundem-se através da membrana plasmática da célula alvo e ligam-se a receptores protéicos intra-celulares. Esta ligação vai ativar os receptores que assim regulam diretamente a transcrição de genes específicos.

Os hormônios esteróides sendo insolúveis em água persistem por mais tempo (várias horas) na corrente sangüínea ou fluidos teciduais, tendendo a mediar respostas mais longas e duradouras. Os receptores intra-celulares de esteróides ligam-se a uma seqüência específica de DNA adjacente aos genes que o ligante regula. Esses receptores estão localizados primariamente no citoplasma e ligam-se ao DNA somente depois que o hormônio se ligou a ele. A ligação do hormônio com o receptor altera a conformação deste último que então ativa ou suprime a transcrição genética. A resposta ocorre em duas etapas: 1) a indução direta da transcrição de um pequeno número de genes específicos que dura aproximadamente 30 minutos e é conhecida como resposta primária; 2) os produtos destes genes ativados por sua vez ativam outros genes e produzem uma resposta tardia secundária; assim um simples estímulo hormonal pode causar uma complexa mudança no padrão de expressão genética. (ALBERTS et al., 1994) (FIGURA 2).

Os hormônios esteróides são sintetizados em resposta a uma atividade neuroendócrina e exercem os principais efeitos no crescimento e desenvolvimento tecidual e homeostase do organismo.

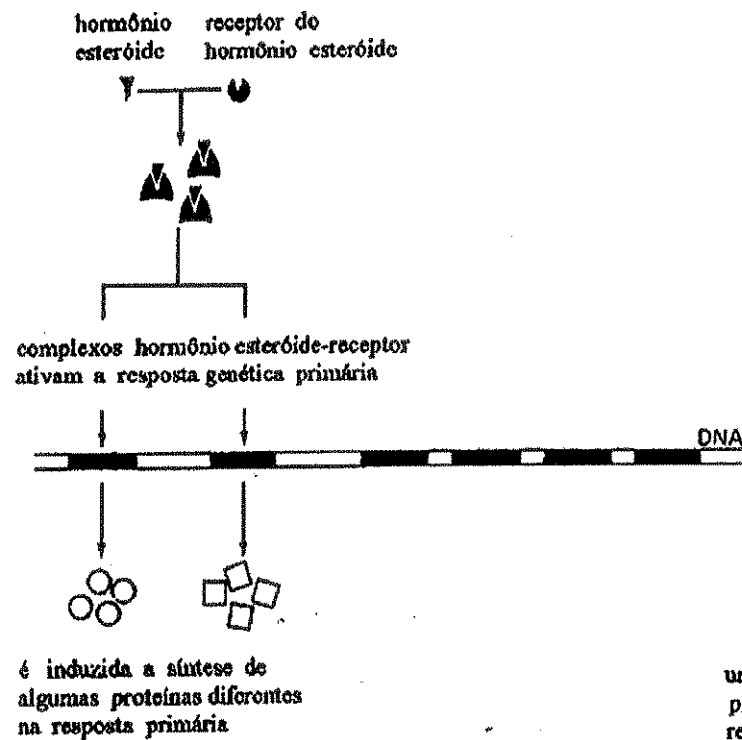
Os hormônios esteróides penetram na célula ligando-se a um receptor que está inativo, ativando-o, e esse complexo penetra no núcleo onde se liga a uma região específica do DNA, identificada como ERE (elemento de resposta ao estrógeno, em inglês, “estrogen response element”). O ERE está localizado em um amplificador na vizinhança comum de um gene que responde aos glicocorticóides. O ERE pode estar vários kb acima ou abaixo do gene promotor. Quando o complexo esteróide-receptor protéico liga-se ao amplificador, o gene promotor mais próximo é ativado e a transcrição aí se inicia. A ativação do amplificador produz um mecanismo geralmente pelo qual o esteróide regula um amplo espectro de genes alvo (FIGURA 3).

Assim como o endométrio normal, os carcinomas de endométrio freqüentemente mostram expressão de receptores de estrógeno e progesterona, sendo sua ausência geralmente associada com um pior prognóstico (LUKES et al., 1994; BERCHUCK et al., 1994; BURTON & WELLS, 1998) e sua presença associada a carcinoma bem diferenciado. Estes receptores são também identificados nas hiperplasias endometriais atípicas e nos carcinomas endometrióides de baixo grau histológico (RANDALL & KURMAN, 1997).

Frente a estes dados da literatura interrogamos como justificativas deste trabalho, se o material de curetagem pode contribuir para indicar, antes da histerectomia, se estamos frente a uma neoplasia mais agressiva, em estágio mais avançado, que mereça um planejamento cirúrgico para doença uterina com linfadenectomia obrigatória.

RESPOSTAS AO HORMÔNIO ESTERÓIDE

A) RESPOSTA PRIMÁRIA PRECOCE



B) RESPOSTA SECUNDÁRIA RETARDADA

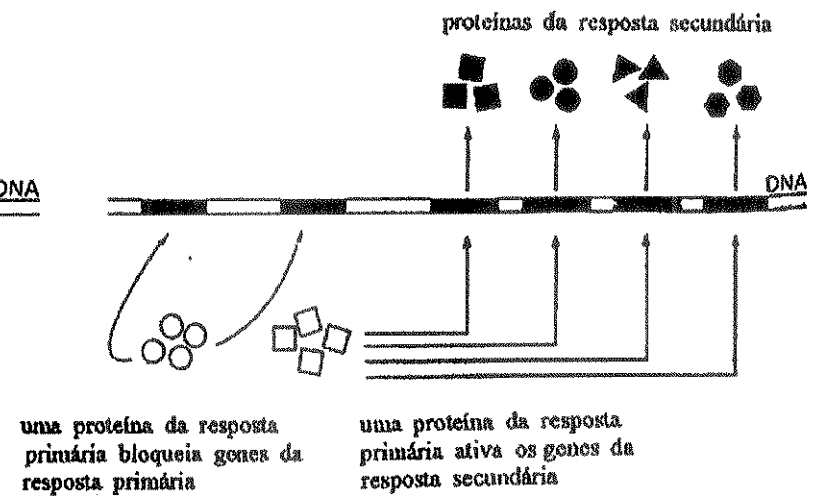


Figura 2: Esquema representativo da resposta ao hormônio esteróide a nível molecular (ALBERTS et al., 1994, mod.)

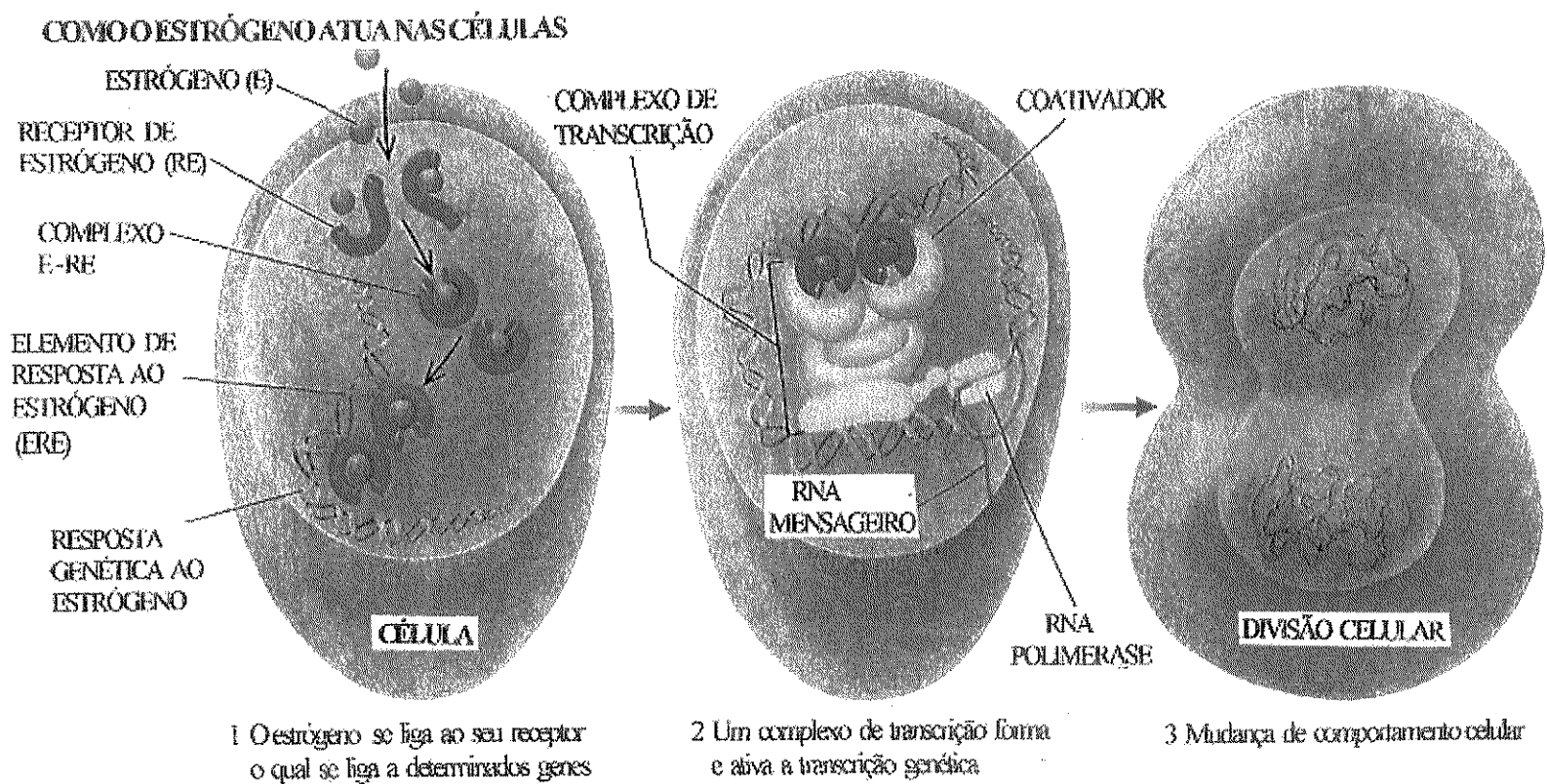


Figura 3: Esquema representativo do mecanismo de ação do estrógeno a nível celular (JORDAN, 1998, mod.)



2. OBJETIVOS

2.1. GERAIS

Avaliar se a expressão dos marcadores p53, RE e RP em material de curetagem prévia à histerectomia está relacionada ao estágio final da doença e a alguns aspectos morfológicos do adenocarcinoma do endométrio.

2.2. ESPECÍFICOS

1. Comparar o tipo e o grau histológico do adenocarcinoma endometrial no material da curetagem com o da peça de histerectomia.
2. Avaliar a expressão do p53, e dos receptores de estrógeno e progesterona no material de curetagem diagnóstica.
3. Relacionar a expressão dos marcadores com os dados morfológicos da peça de histerectomia, a saber: tipo e grau histológico e estágio pós-cirúrgico da doença.



3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. TAMANHO DA AMOSTRA

Foram levantados 51 casos de adenocarcinoma de endométrio dos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, no período de Janeiro de 1994 a Dezembro de 1998.

3.2. SELEÇÃO DOS SUJEITOS

Os sujeitos selecionados foram pacientes que apresentavam no nosso serviço a biópsia prévia, ou seja, material de curetagem, seguindo-se a histerectomia, o exame intra-operatório de congelação e o diagnóstico definitivo dos preparados em parafina. Este critério foi utilizado para que pudéssemos ter acesso ao material completo das diferentes amostras para o estudo histológico sistematizado e imunoistoquímico.

3.3. COLETA DE DADOS

As informações foram coletadas a partir dos prontuários das pacientes, em pastas arquivadas na Central de Arquivos do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM) da UNICAMP.

3.4. CRITÉRIOS DE SEGUIMENTO E AVALIAÇÃO

Todos os casos foram revistos pelas patologistas (orientadora e aluna) e novamente classificados quanto ao tipo e grau histológicos, tanto na curetagem prévia quanto no material da histerectomia.

A **classificação histológica** utilizada foi a da Organização Mundial da Saúde (OMS) que separa os tipos principais de carcinoma de endométrio em **endometrióides** e **não endometrióides**.

Segundo a FIGO (ANNOUCEMENTS: FIGO STAGES – 1988), quanto ao **grau de diferenciação histológica**, os adenocarcinomas endometrióides são subdivididos em:

- Bem diferenciados: grau I – quando apresentam menos 5% de áreas sólidas.
- Moderadamente diferenciados: grau II – quando apresentam de 5 a 50% de áreas sólidas.
- Pouco diferenciados: grau III – quando apresentam mais de 50% de áreas sólidas.

Quanto ao **estádio da doença**, os parâmetros histológicos avaliados em todas as histerectomias foram:

1) Profundidade de invasão miometrial

- M0 quando a neoplasia é restrita à mucosa;
- M1 quando há invasão até a metade do miométrio;
- M2 quando há invasão maior que a metade do miométrio.

2) Presença de êmbolos carcinomatosos no miométrio

3) Invasão do colo uterino (só epitelial ou estromal)

4) Presença de metástases ganglionares ou para outros locais

3.5. SELEÇÃO DO MATERIAL

Foram levantados do arquivo do Departamento de Anatomia Patológica da FCM UNICAMP blocos de parafina correspondentes às curetagens e às peças de histerectomia. Depois da avaliação histológica foram selecionados os melhores fragmentos e os blocos correspondentes para o estudo imunoistoquímico.

3.6. PROCESSAMENTO LABORATORIAL

Os blocos de parafina contendo o material de curetagem foram processados no Laboratório de Patologia Experimental do CAISM/UNICAMP, de acordo com a técnica a seguir descrita.

Foram feitas secções de 4 μ m de espessura e colocadas em lâminas lavadas, desengorduradas e tratadas em solução de organosilano a 25% em acetona (3-aminopropil-trietoxi-silano SIGMA cod A3648) para permitir melhor aderência dos cortes à lâmina.

3.6.1. Técnica de imunoistoquímica

1- Identificação dos anticorpos:

Foram utilizados anticorpos primários:

- para o p53, DAKO clone D07, cod M7001, com diluição 1:100;
- para o Receptor de Progesterona utilizou-se anticorpo 1 A 6, DAKO, cod M3529-1, com diluição 1:100;
- para o Receptor de Estrógeno utilizou-se anticorpo de procedência particular (Universidade de Toulouse, França), na diluição 1:2.000.

2- Reação de imunoperoxidase:

Etapas I : Desparafinização e preparo para a coloração:

As lâminas para a reação imunoistoquímica são colocadas por 1 hora a 110° C, antes de iniciar a reação. O xilol I também é colocado à mesma temperatura por aproximadamente 30 min., antes do uso.

- 1- As lâminas são imersas rapidamente no xilol I, aquecido para desparafinizar.
- 2- A seguir, são imersas no xilol II e III, à temperatura ambiente.
- 3- As lâminas são transferidas para banhos em álcool absoluto I, II, III, em temperatura ambiente.

- 4- A seguir, são lavadas em água corrente e destilada.
- 5- É realizado o bloqueio da peroxidase endógena, incubando-se por 15 min. em temperatura ambiente, em solução 3% de água oxigenada em metanol.

H₂O₂ (30%) 10 ml

Metanol 90 ml

- 6- É feita a lavagem em água corrente e em água destilada, sendo as lâminas colocadas em tampão PBS (“phosphate buffer saline”, em português, solução de tampão fosfato), pH 7,6.
- 7- As lâminas são colocadas em tampão citrato pH 6,0, em panela de vapor a 100° C (TAYLOR, SHI, COTE, 1993) por 3 min. e 30 seg., três vezes; e deixadas esfriar por 15 min.
- 8- A seguir adicionam-se os anticorpos primários específicos e incubam-se em câmara úmida a 37° C por 30 min. Coloca-se na geladeira a 4° C durante a noite.

Etapa II – Coloração:

- 1- As lâminas, após o período de incubação com o anticorpo primário são lavadas no agitador por 3 vezes, em PBS, 5 min. cada vez, à temperatura ambiente.
- 2- As lâminas são secas com papel de filtro e são adicionados sobre os cortes os anticorpos secundários biotinilados kit Multilink DAKO, cod E453.

Esse anticorpo liga-se ao anticorpo primário e conjuga-se à biotina, e o complexo de peroxidase liga-se à estreptavidina e à biotina. Incuba-se por uma hora na estufa a 37° C.

- 3- Fazem-se 3 lavagens no agitador, em PBS, de 5 min. cada, à temperatura ambiente.

4- As lâminas são secas com papel de filtro, acrescentando-se o complexo ABC (kit DAKO, cod K377) e incuba-se por 40 min. em estufa a 37° C.

5- Após a incubação, as lâminas são colocadas no tampão PBS, e prepara-se a solução DAB (3,3 tetra-hidrocloreto de diamino-benzidina, SIGMA cod D5637), cromógeno que impregna de cor marrom o local onde ocorre a reação:

DAB 60mg

PBS 100ml

Água oxigenada (30%) 500ul

DMSO (dimetil sulfóxido) 1ml

6- Essa solução é colocada sobre as lâminas para corar, por 5 min., e a seguir elas são lavadas em água corrente e posteriormente em água destilada. As lâminas são contracoradas com Hematoxilina de MAYER por 30 a 60 seg., e lavadas novamente.

7- Em seguida, são passadas por alguns segundos em água amoniacal, e de novo em água corrente e destilada.

8- Finalmente, são desidratadas por 3 passagens em álcool absoluto, 3 em xilol e as lâminas são montadas em resina Entelan®.

Para as reações imunoistoquímicas foram utilizados como controles positivos os seguintes tecidos: câncer de mama para os receptores de Estrógeno (RE) e de Progesterona (RP); e câncer de cólon para o p53. O controle de qualidade das reações foi feito pela leitura dos controles negativo e positivo das reações.

3.6.2. Leitura das lâminas

As colorações imunoistoquímicas dos materiais examinados para o p53, RE e RP ocorrem no núcleo celular que adquire a cor acastanhada, quando positiva. Sua intensidade foi avaliada de acordo com os seguintes critérios (ZHENG et al., 1996; NIKAIDO et al., 1996; TASKIN et al., 1997; SCHEISTROEN et al., 1999):

Negativa – ausência de coloração

+ se até 10% de núcleos corados

++ de 10 a 50% de núcleos corados

+++ mais de 50% de núcleos corados

3.7. ASPECTOS ÉTICOS

O estudo foi desenvolvido a partir de dados obtidos dos prontuários das pacientes, em pastas arquivadas na Central de Arquivos do CAISM/UNICAMP e também de lâminas e blocos de parafina do arquivo do Departamento de Anatomia Patológica da FCM-UNICAMP. As informações obtidas foram mantidas em sigilo, sendo que as pacientes foram identificadas apenas por um número. Tratou-se de estudo retrospectivo, que não implicou em retirada de novas amostras ou novos procedimentos nos pacientes.

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.

3.8. MÉTODOS PARA A ANÁLISE DOS DADOS

As informações referentes aos exames de cada paciente foram codificadas e digitadas em banco de dados no programa Excel 5.0; este foi submetido à análise estatística no programa Statistical Analysis System (SAS), com os seguintes objetivos:

- 1 – Realizar análise descritiva das variáveis no geral e por tipo histológico.
- 2 – Explicar e comparar a variável Estádio Final da Doença (EFD), estágio 1, 2, 3 e 4, em função das outras variáveis (Tipo histológico, Grau histológico, p53, RE e RP).

3.8.1. Metodologia estatística:

Na análise descritiva dos dados foram utilizadas tabelas de frequência para as variáveis categóricas (Tipo histológico, Grau histológico, EFD, p53, RE e RP) e medidas de dispersão e posição para a variável contínua (Idade).

Para a comparação da variável EFD (estádio 1, 2, 3 e 4) com relação às outras variáveis utilizou-se o teste exato de Fisher, sendo significativa a associação quando o valor de $p < 0,05$.

A regressão logística politômica que poderia explicar a variável EFD em função das outras variáveis não foi possível fazer, devido ao tamanho da amostra.



4. RESULTADOS

4.1. CARACTERÍSTICAS DA AMOSTRA

As 51 mulheres com carcinoma de endométrio tinham idade entre 43 e 83 anos quando foi realizado o diagnóstico da doença, obtendo-se uma média de idade de 64 anos. A relação da idade com o tipo histológico está demonstrada na Tabela 1.

Tabela 1: Relação da idade das pacientes com o tipo histológico do tumor

Idade (anos)	Nº de casos	Média	Mediana	Mínima	Máxima
AE	44	63,6	67	43	83
ANE	7	69,4	74	47	83
TOTAL	51	64,4	67	43	83

Dos 51 casos, 44 (86%) representavam carcinomas de endométrio de tipo histológico endometrióide e 7 (14%), carcinomas não-endometrióides. Destes, 6 eram carcinoma de células claras e 1 carcinoma seroso.

A avaliação histológica em HE segundo o grau de diferenciação histológica dos 44 carcinomas endometrióides está demonstrada na Tabela 2.

Tabela 2: Distribuição dos casos conforme o grau histológico

GRAU	TOTAL	%
G I	26	59,1
G II	13	29,5
G III	5	11,4
TOTAL	44	100,0

Dos 44 casos de carcinomas endometrióides, 10 não eram puros, apresentando diferenciação mista, e sendo denominados adenocarcinomas mistos. Os resultados de curetagem foram comparados com os de histerectomia quanto à concordância, sendo anotados na Tabela 3, a seguir.

Tabela 3: Comparação entre o tipo e o grau histológico no material de curetagem e na peça de histerectomia

CTG	Histerectomia					TOTAL
	G I	G II	G III	AM	ANE	
G I	15	4	1	1	0	21
G II	0	5	2	0	0	7
G III	0	1	4	0	0	5
AM	1	0	0	9	0	10
ANE	0	0	0	0	7	7
TOTAL	16	10	7	10	7	50

Observação: Houve uma paciente com diagnóstico na curetagem de Adenocarcinoma G II e ausência de neoplasia residual na peça de histerectomia.

Os dados da Tabela 3 mostraram concordância diagnóstica em 40 casos (80%).

O estudo histológico das peças de histerectomia, associado aos dados clínicos referidos nos prontuários das pacientes demonstrou a seguinte distribuição da amostra conforme o estágio da doença (Tabela 4):

Tabela 4: Distribuição dos casos conforme o estágio da doença

Estádio final da doença	Casos	(%)
E I	29	56,9
E II	12	23,5
E III	7	13,7
E IV	3	5,9

A tabela abaixo relaciona os diferentes estádios da doença com os tipos de carcinomas endometrióides e não-endometrióides.

Tabela 5: Relação dos estádios com os tipos de carcinoma endometrióide e não endometrióide

Estádio final da doença	AE	(%)	ANE	(%)	Total
E I	27	(61)	2	(29)	29
E II, III, IV	17	(39)	5	(71)	22
Total	44	(100)	7	(100)	51

Pela Tabela 5 observamos que a maioria dos carcinomas endometrióides foi diagnosticada em estágio I (61%), enquanto que o carcinoma não-endometrióide predominou em estádios mais avançados (71%), embora esta relação não tenha sido estatisticamente significante na amostra estudada.

4.2. MARCADORES E TIPO HISTOLÓGICO

Com relação à expressão dos marcadores quanto ao tipo histológico do carcinoma, observou-se que o p53 foi positivo em 16% dos carcinomas endometrióides e em 71% dos carcinomas não endometrióides (Figuras 4, 5, 6, 7, 8, 9), resultando em um valor de $p < 0,05$, estatisticamente significativo (Tabela 6).

O receptor de estrógeno apresentou 54% de positividade nos carcinomas endometrióides versus 29% nos carcinomas não-endometrióides, porém não significativo. Já o receptor de progesterona foi significativamente maior nos carcinomas endometrióides, com 70% versus 14% nos não-endometrióides (Tabela 6).

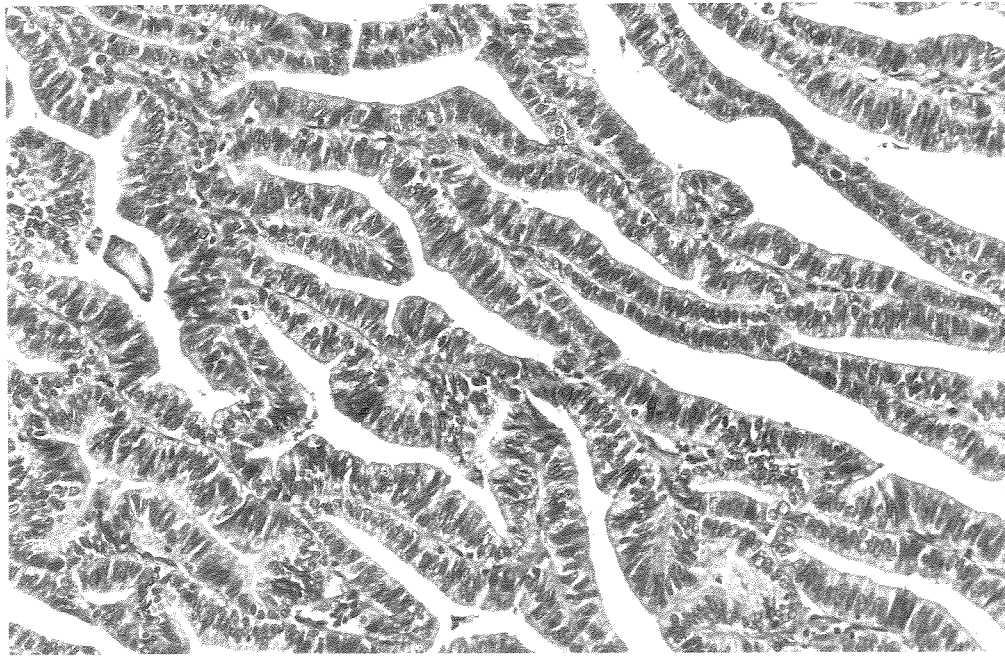


Figura 4: Adenocarcinoma endometrióide bem diferenciado (G I), mostrando predomínio de formação glandular (coloração HE; objetiva 20x)

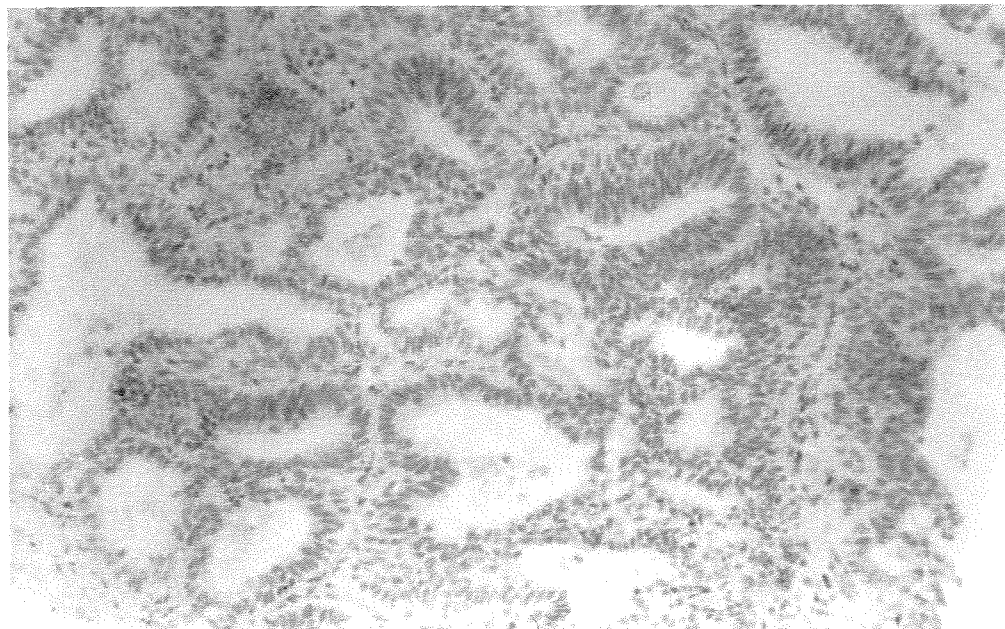


Figura 5: Coloração imunoistoquímica negativa para o p53, no adenocarcinoma bem diferenciado (G I) (objetiva 20x)

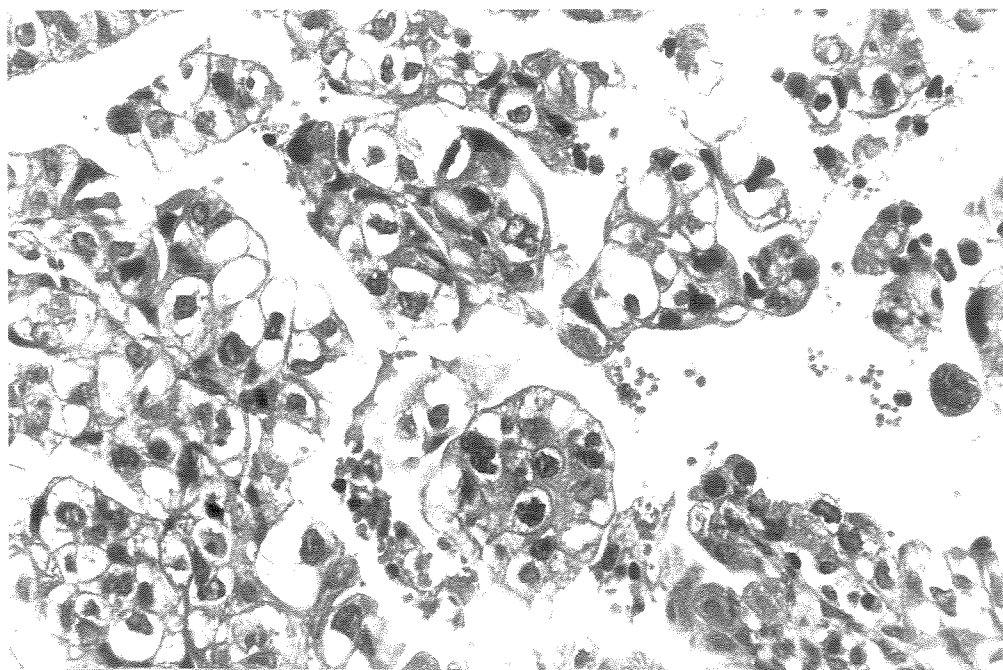


Figura 6: Adenocarcinoma não-endometrióide, padrão de células claras, mostrando células de citoplasma amplo, vacuolado, com marcada atipia nuclear (coloração HE; objetiva 40x)

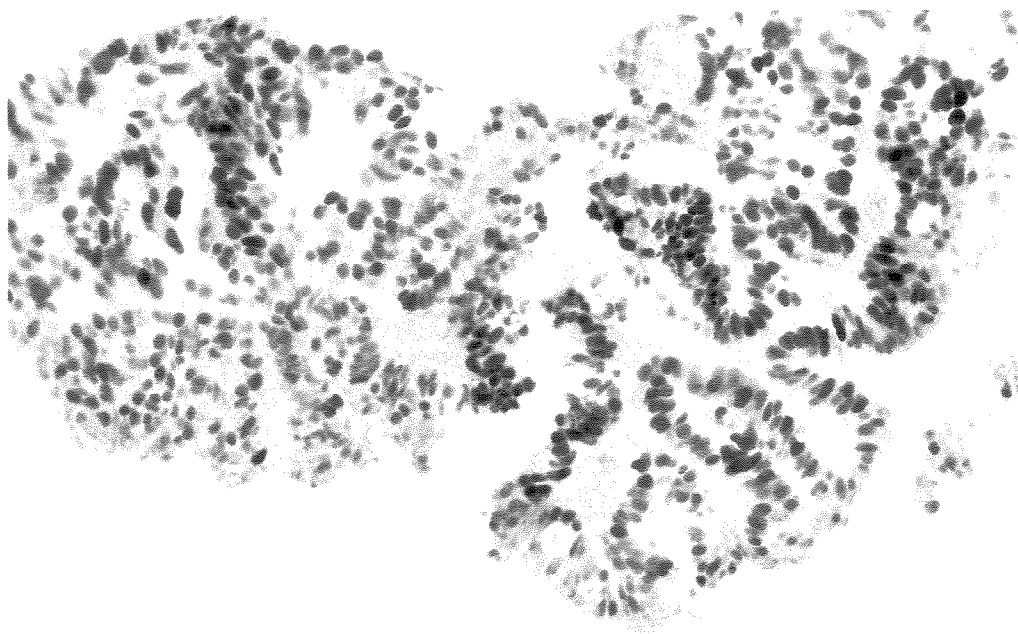


Figura 7: Coloração imunoistoquímica positiva para o p53, no adenocarcinoma não-endometrióide, padrão de células claras; notar acentuada coloração nuclear (objetiva 20x)

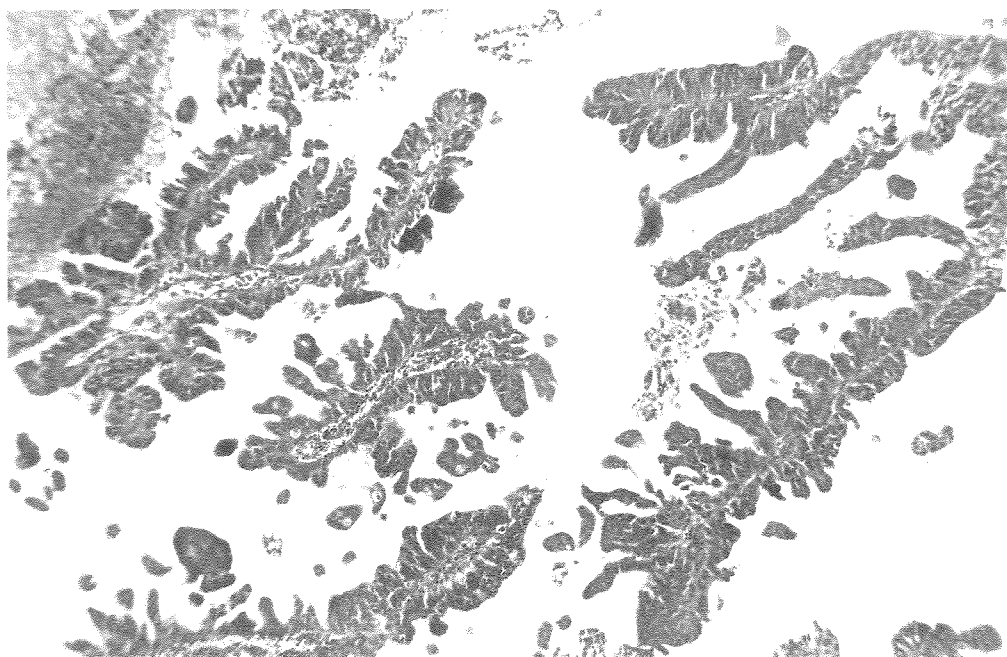


Figura 8: Adenocarcinoma não-endometrióide, padrão seroso-papilífero; notar papilas finas e delicadas com acentuada atipia nuclear (coloração HE; objetiva 10x)

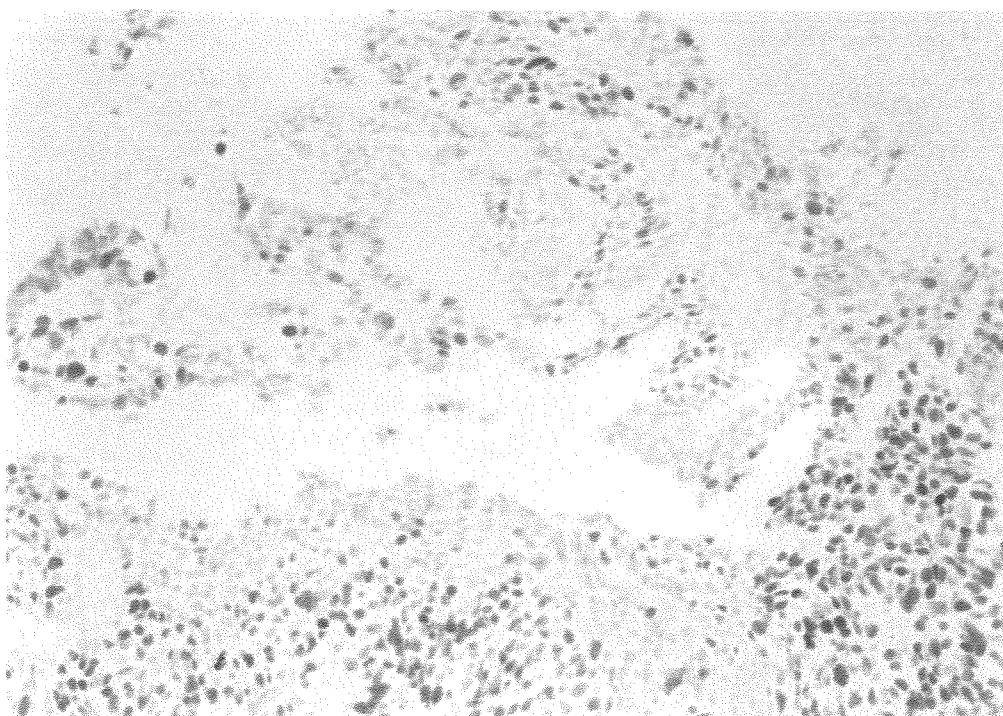


Figura 9: Coloração imunoistoquímica positiva para o p53, no adenocarcinoma não-endometrióide, padrão seroso-papilífero; notar acentuada coloração nuclear (objetiva 20x)

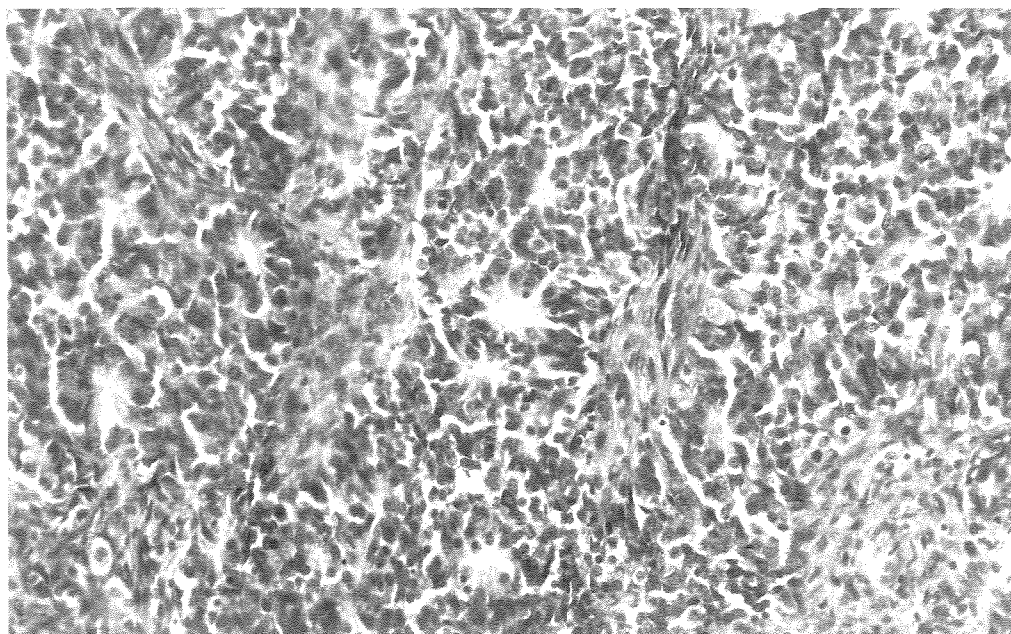


Figura 10: Adenocarcinoma endometrióide pouco diferenciado (G III), mostrando padrão sólido predominante (coloração HE; objetiva 20x)

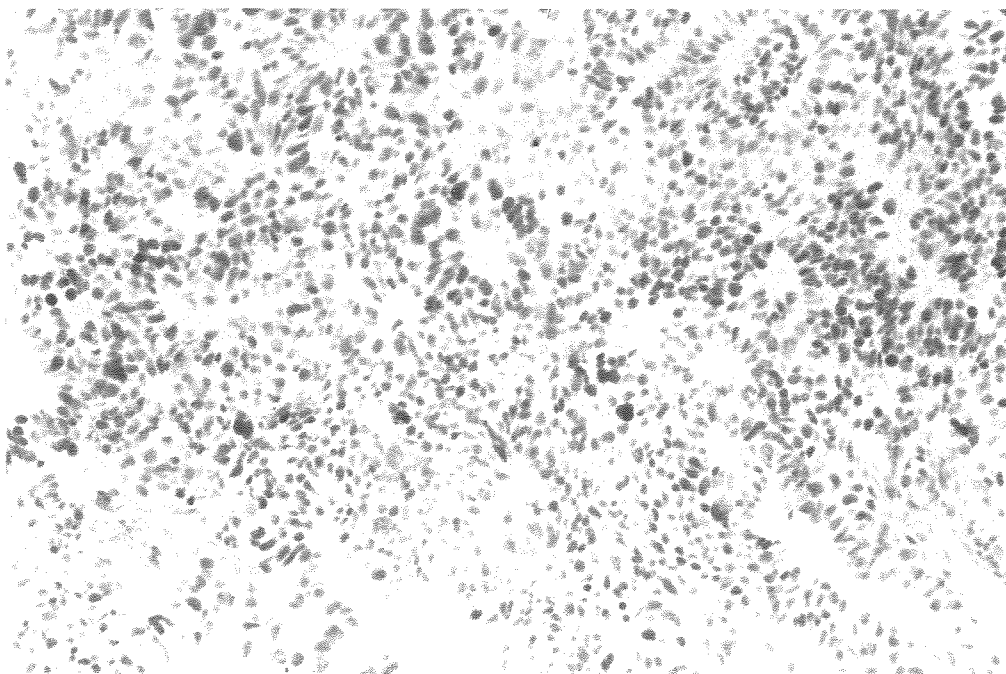


Figura 11: Coloração imunoistoquímica positiva para o p53, no adenocarcinoma endometrióide pouco diferenciado (G III); notar núcleos fortemente corados (objetiva 20x)

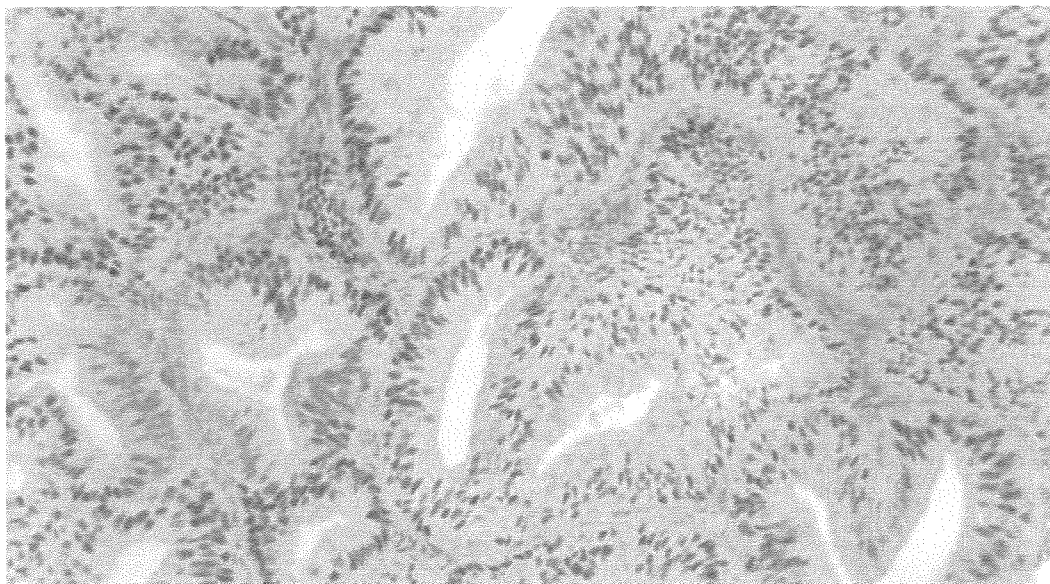


Figura 12: Coloração imunoistoquímica positiva para receptor de estrógeno no adenocarcinoma endometrióide bem diferenciado (G I); notar núcleos fortemente corados (objetiva 20x)

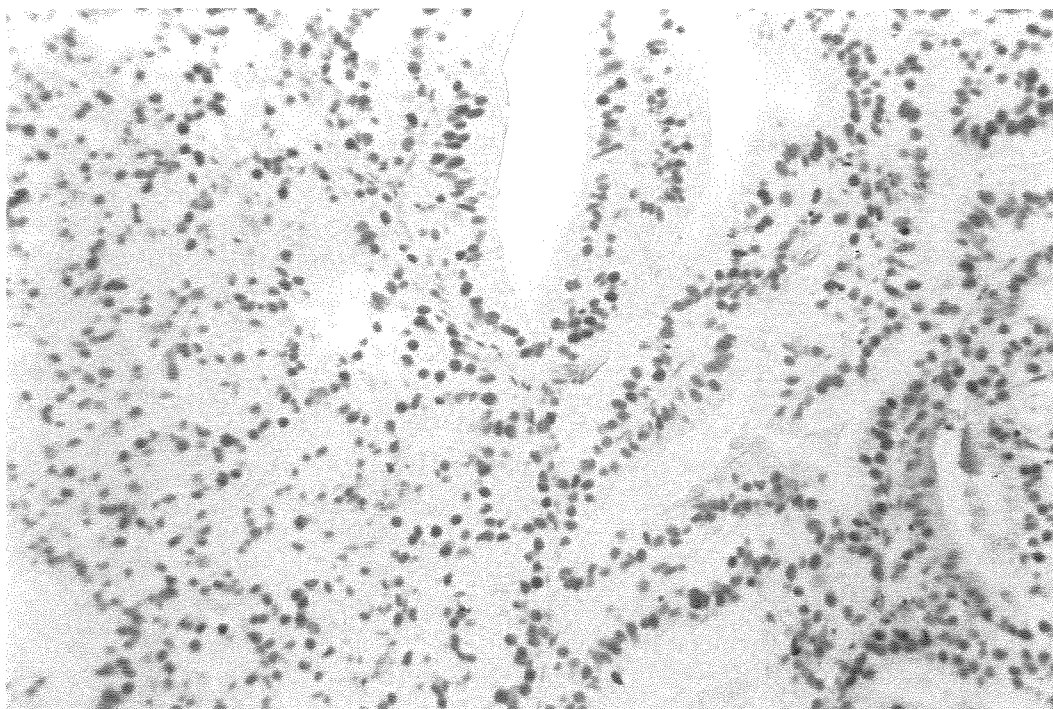


Figura 13: Coloração imunoistoquímica positiva para receptor de progesterona no adenocarcinoma endometrióide bem diferenciado (G I); notar núcleos fortemente corados (objetiva 20x)

Tabela 6: Relação entre os marcadores p53, RE e RP e tipos histológicos

MARCADORES	AE	(%)	ANE	(%)	p
p53	7	(16)	5	(71)	0,005
RE	24	(54)	2	(29)	0,248
RP	31	(70)	1	(14)	0,007
TOTAL	44	-	7	-	-

4.3. MARCADORES E GRAU HISTOLÓGICO

O grau histológico só foi avaliado nos carcinomas de tipo endometrióide.

A expressão dos marcadores em relação ao Grau Histológico nos 44 adenocarcinomas endometrióides mostra que, embora o p53 tenha ocorrido em apenas 7 dos 44 casos (16%) ela foi maior nos carcinomas pouco diferenciados (Figuras 10 e 11), sendo 2 positivos em 5 carcinomas pouco diferenciados (Tabela 7).

Nos 24 casos positivos para RE, houve um predomínio da expressão nos bem diferenciados (Figura 12), com 15 casos positivos (63%). O mesmo foi observado com o RP em que dos 31 casos positivos, 21 (68%) ocorreram no G I (Figura 13).

Apesar desta distribuição observada, os dados não foram significativos do ponto de vista estatístico ($p < 0,05$).

Tabela 7: Relação entre marcadores p53, RE e RP e o grau histológico do adenocarcinoma endometrióide

MARCADORES	AE G I	AE G II	AE G III	TOTAL (%)	p
p53	2	3	2	7 (16)	0,103
RE	15	6	3	24 (54)	0,829
RP	21	6	4	31 (70)	0,079
TOTAL	26	13	5	44 -	-

4.4. MARCADORES E ESTÁDIO FINAL DA DOENÇA

Pela Tabela 8 podemos observar que a expressão do p53 não variou significativamente com o estágio da doença. O mesmo foi observado em relação ao RE. A baixa expressão do RP no estágio avançado E III foi o único valor estatisticamente significativo.

Tabela 8: Relação entre receptores p53, RE e RP e estádios dos carcinomas

MARCADORES	E I	(%)	E II	(%)	E III	(%)	E IV	(%)	TOTAL	(%)	p
p53	5	(17)	4	(33)	2	(28)	0	(0)	11	(22)	0,614
RE	15	(51)	6	(50)	4	(57)	1	(33)	26	(51)	1,000
RP	19	(65)	10	(83)	1	(14)	2	(67)	32	(63)	0,023
TOTAL	29	-	12	-	7	-	3	-	51	-	-

Avaliando esta distribuição em apenas 2 grupos, correspondentes a:

Grupo 1 - estágio I

Grupo 2 – estádios II, III e IV, vemos na Tabela 9 que o p53 foi menos freqüente no estágio I (17%), em relação aos outros estádios (27%), porém esta variação não foi significativa ($p=0,497$). Os receptores de estrógeno e de progesterona não mostram variação entre os grupos.

Tabela 9: Relação entre receptores p53, RE e RP e estádios dos carcinomas agrupados

MARCADORES	GRUPO 1	(%)	GRUPO 2	(%)	TOTAL	(%)	p
p53	5	(17)	6	(27)	11	(22)	0,497
RE	15	(51)	11	(50)	26	(51)	1,000
RP	19	(65)	13	(59)	32	(63)	0,771
TOTAL	29	-	22	-	51	-	-



5. DISCUSSÃO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar se a expressão dos marcadores p53, RE e RP em material de curetagem prévia à histerectomia para o adenocarcinoma do endométrio se relacionou com o estágio final da doença. Também comparou-se o diagnóstico do tipo e o grau histológicos do carcinoma endometrial no material de curetagem com o da peça cirúrgica. A expressão dos marcadores estudados foi ainda relacionada aos dados morfológicos da peça de histerectomia, a saber: tipo e grau histológicos, e estágio pós-cirúrgico da doença.

A amostra consistindo de 51 pacientes mostrou variação de idade entre 43 e 83 anos, com uma média de idade de 64 anos. Tal dado confirma o fato já clássico na literatura de que o carcinoma de endométrio é uma doença de mulher adulta acima de 40 anos, cuja incidência é altamente dependente da idade, aumentando significativamente após os 40 anos (ROSE, 1996).

Dos 51 casos, 44 (86%) representavam carcinomas do tipo endometrióide e 7 (14%), carcinomas do tipo não endometrióide; destes últimos, 6 casos eram de carcinoma de células claras e 1 caso, carcinoma seroso-papilífero. Na nossa amostragem, a média de idade das pacientes com carcinoma endometrióide foi de 63,6 anos e a das pacientes com carcinoma não endometrióide foi de 69,4 anos (Tabela 1). Isto também concorda com a literatura que descreve os carcinomas endometrióides em pacientes com idade média de 59 anos, enquanto que os carcinomas não endometrióides, em pacientes mais idosas, com idade média de 67 anos (KURMAN & NORRIS, 1994; MILLIS et al., 1994; GOMPEL & SILVERBERG, 1994); a prevalência dos carcinomas não endometrióides, segundo KURMAN & NORRIS (1994) e GOMPEL & SILVERBERG (1994) varia de 1% a 4%. Para BURTON & WELLS (1998), os carcinomas endometrióides, mais freqüentes, se apresentam em mulheres mais jovens, ao contrário dos carcinomas serosos-papilíferos e de células claras, menos freqüentes, que são observados em mulheres mais idosas e na pós-menopausa. Neste nosso estudo a maior prevalência dos carcinomas não endometrióides (14%) deve-se provavelmente ao pequeno número de casos da amostra.

Quanto ao grau histológico, LAPINSKA et al. (1998) observaram que dentre 117 mulheres com carcinoma de endométrio, o tipo histológico mais comum (82,5%) era o adenocarcinoma bem diferenciado. Já SUNG et al. (2000) numa amostragem de 125

pacientes com carcinoma endometrial encontrou 20% de carcinomas Grau I, 40% de Grau II e 40% de Grau III. ROSE (1996), em artigo de revisão, apresenta valores de 30% como carcinomas Grau I, 42% como Grau II e 27% como Grau III. Na nossa casuística pudemos observar que os carcinomas bem diferenciados (Grau I) ocupam a maioria dos casos (59,1%) enquanto que os de Graus II e III mostram respectivamente valores de 29,5% e 11,4%. Apesar de usarmos os critérios de graduação histológica definidos pela FIGO (1998), sabemos que existem algumas variações na aplicação de tais critérios, o que pode justificar as diferenças encontradas na literatura.

A comparação entre tipo e grau histológico no material de curetagem e na peça de histerectomia mostrou concordância diagnóstica em 80% dos casos, sendo tais valores semelhantes aos encontrados em trabalho de NOUMOFF et al. (1991). Isto é explicado tendo em vista que a amostragem, na curetagem, é aleatória e menos representativa do que a peça de histerectomia, que possibilita o exame completo de todo o tumor.

O estudo histológico das peças de histerectomia associado aos dados referidos nos prontuários das pacientes demonstrou que a maioria delas, 56,9%, encontrava-se no estágio I; 23,5%, no estágio II; 13,7%, no estágio III e 5,9%, no estágio IV. Pela literatura (KURMAN & NORRIS, 1994; GOMPEL & SILVERBERG, 1994; KOUNELIS et al., 2000), a maioria dos carcinomas endometrióides é diagnosticada no estágio I, concordando com os nossos dados. BURTON & WELLS (1998), em trabalho de revisão, relatam que a maioria das pacientes mais jovens se encontra no estágio I (75 a 80%). Considerando como pacientes mais jovens aquelas com idade até 65 anos, encontramos na nossa amostra 50% no estágio I. Entretanto entende-se que, sendo a maioria dos carcinomas do tipo histológico endometrióide, com evolução mais arrastada e menos agressivo, qualquer sintoma de sangramento em pacientes menopausadas é valorizado e a preocupação sempre existe em se afastar a probabilidade de neoplasia, o que favorece o diagnóstico mais precocemente. KOUNELIS et al. (2000) observaram que adenocarcinomas endometrióides usualmente são de baixo grau e estão nos estádios iniciais, ao contrário dos carcinomas serosos que são de alto grau e geralmente encontram-se nos estádios avançados. Entretanto, BEHBAKHT et al. (1994) encontraram em estudo retrospectivo, numa amostra de 137 pacientes com carcinoma de endométrio em estágio III e IV, que a maioria (83%) era adenocarcinoma do tipo endometrióide, e que os carcinomas serosos e de células claras somavam 17%.

BURTON & WELLS (1998) observaram que os carcinomas serosos e de células claras comportam-se mais agressivamente, estágio a estágio, em comparação aos endometrióides. CARCANGIU et al. (1997) observaram uma mortalidade de 17% em pacientes em estágio I com carcinomas serosos. MALPICA et al. (1995) demonstraram que pacientes com carcinoma de células claras em estágio I tinham uma sobrevida similar a tumores endometrióides no estágio III.

Embora os nossos casos de carcinoma não-endometrióide tenham se apresentado predominantemente nos estádios II e III, devido ao pequeno número de casos, não encontramos dados estatisticamente significantes que correlacionassem o tipo histológico com o estágio da doença ($p=0,216$).

5.1. EXPRESSÃO DO p53

5.1.1. Em relação ao tipo histológico

Observamos positividade do p53 em 16% dos carcinomas endometrióides e em 71% dos carcinomas não-endometrióides, sendo este resultado estatisticamente significativo ($p=0,005$). Resultados semelhantes foram observados por LAX et al. (2000) com 93% de positividade para os carcinomas serosos-papilíferos e 17% para carcinoma endometrióide; para GEISLER et al. (1999), numa amostragem de 137 pacientes obteve-se 57% de positividade em carcinomas endometrióides e 94% em carcinomas não endometrióides; para KOUNELIS et al. (2000) em 61 pacientes, o p53 foi positivo em 35% dos carcinomas endometrióides, e 76% dos carcinomas serosos-papilíferos. Outros autores como CHHIENG et al. (1995), AMBROS et al. (1994) e ELHAFFEY et al. (2001) apresentaram a correlação do p53 com lesões precursoras do carcinoma do endométrio obtendo 17% de positividade para o p53 nas hiperplasias complexas atípicas e em torno de 40% de positividade nos carcinomas endometrióides.

A expressão do gene p53 tem sido proposta como um parâmetro prognóstico significativo, estando associado a neoplasias de pior prognóstico como os não-endometrióides, dentre elas, o carcinoma de células claras e o seroso-papilífero. Segundo BOKHMAN (1983), na chamada via alternativa de carcinogênese endometrial, estes tumores não se relacionam nem a níveis estrogênicos elevados, nem a lesões hiperplásicas pregressas, sendo o endométrio de origem do tumor de padrão geralmente atrófico.

A diferença de expressão observada nos 2 tipos de carcinoma do endométrio inclui não só a positividade do p53, mas também a causa e o tempo em que ocorreram alterações no gene (AMBROS et al., 1996; KOUNELIS et al., 2000). Nos carcinomas serosos a expressão do p53 correlaciona-se com a presença de mutações no gene, levando à perda de suas funções (TASHIRO et al., 1997). Nos carcinomas endometrióides o acúmulo da proteína p53 pode ocorrer sem a mutação detectável do gene, pois segundo trabalhos de AMBROS et al. (1996) e WOLF & WARTON (1996), apesar de 21 a 52% dos adenocarcinomas endometrióides mostrarem positividade para o p53, somente 14 a 23% apresentaram mutação do gene. Uma possível explicação para o fenômeno da expressão do p53 sem ocorrer mutação, nos carcinomas endometrióides, é a ocorrência de mudança de conformação molecular pós-transcricional da proteína “wild” ou nativa, o que ocorreria quando a molécula do p53 forma novo complexo com outras proteínas nucleares tais como o mdm-2, que é produto de um oncogene celular (XIANGWEI et al., 1993; WU et al., 1993; AMBROS et al., 1996; STEWART et al., 1998; KOUNELIS et al., 2000). Nos carcinomas endometrióides foi verificada uma correlação seletiva entre a expressão do mdm-2 e o p53, sugerindo um papel ativo do mdm-2 em se ligar e inativar a proteína p53; já nos carcinomas não-endometrióides isto não foi observado (AMBROS et al., 1996). A ausência de mutações do p53 nas hiperplasias atípicas do endométrio mostra que a ocorrência de alterações do p53 na patogênese dos tumores endometrióides é um fenômeno tardio (KOHLER et al., 1992; ITO et al., 1994; HAMEL et al., 1996). Já nos não-endometrióides, a expressão do p53 e a observação de sua mutação genética nos carcinomas intraepiteliais do endométrio, como lesões precursoras dos carcinomas serosos, recentemente identificados (MUTTER, 2000; MUTTER et al., 2000), mostraram a ocorrência precoce de mutações do p53 neste processo de carcinogênese.

5.1.2. Em relação ao grau histológico

Observamos que a positividade do p53 é baixa nos carcinomas endometrióides (16%); destes, apenas 29% eram de carcinomas de grau I enquanto que os demais 71% estavam distribuídos nos graus II e III. Apesar de menos de 1/3 dos positivos ser grau I, tais valores não foram estatisticamente significativos ($p=0,103$), provavelmente devido ao

tamanho da amostra. A maioria dos trabalhos no entanto reforça a informação de que o p53 está significativamente relacionado ao grau histológico (TASKIN et al., 1997; ÖZSARAN et al., 1999; ITO et al., 1994; GEISLER et al., 1996; FERNANDO et al., 2000; ELHAFEY et al., 2001; KOUNELIS et al., 2000), sendo que quanto maior o grau histológico, maior a positividade para a expressão do p53. Em termos de oncogênese poderíamos dizer que ocorrem alterações tardias no gene p53, o que refletiria na via de patogênese dos carcinomas endometrióides (KOHLEH et al., 1992; ITO et al., 1994; HAMEL et al., 1996).

5.1.3. Em relação ao estágio da doença

A expressão do p53 no material de curetagem não variou significativamente com o estágio final da doença ($p=0,614$). Um dos nossos objetivos foi o de correlacionar a expressão dos marcadores no material da curetagem com o estágio final da doença. Apesar da observação já clássica na literatura de que o p53 está associado ao estágio avançado (BEHBAKHT et al., 1994; COPPOLA et al., 1998; SUNG et al., 2000; KOUNELIS et al., 2000) não pudemos corroborar esta afirmação mesmo quando agrupamos os estágios em dois: grupo 1, estágio I e grupo 2, estágios II, III e IV, notando-se discreta elevação da frequência no grupo 2, (17%, versus 27%), porém, não significativa ($p=0,497$).

5.2. RECEPTORES DE ESTRÓGENO E DE PROGESTERONA

5.2.1. Em relação ao tipo histológico

Os receptores de estrógeno mostraram 54% de positividade nos carcinomas endometrióides e 29% nos carcinomas não-endometrióides (Tabela 5), sendo tal dado não significativo. Entretanto, o receptor de progesterona foi significativamente mais expresso nos carcinomas endometrióides com 70%, versus 14% nos carcinomas não endometrióides. FERNANDO et al. (2000), BERCHUCK et al. (1994), KOUNELIS et al. (2000) e ROSE (1996) relacionaram em seus trabalhos a positividade do p53 à negatividade dos receptores de estrógeno e de progesterona, sinalizando que a positividade destes está relacionada tanto

a melhor prognóstico como a tumores mais bem diferenciados. KOUNELIS et al. (2000) chegam a observar que os receptores de estrógeno e de progesterona são freqüentemente mais expressos nos carcinomas endometrióides do que nos carcinomas serosos.

De acordo com a visão dualística da carcinogênese endometrial proposta por BOKHMAN (1983), o carcinoma endometrióide seria enquadrado na via clássica, caracterizada por altos níveis estrogênicos e cursando geralmente com alterações no endométrio como as hiperplasias.

Carcinomas endometrióides são vistos na literatura como hormônios-sexuais dependentes, e que freqüentemente expressam RE e RP. Já a baixa expressão destes receptores nos carcinomas não endometrióides foi associada à baixa resposta destes tumores à terapêutica progesteronal. Pelos nossos dados, não verificamos a associação do tipo histológico com a expressão do RE, porém isto foi demonstrado com o RP. Atribuímos esta diferença de comportamento, diversa do esperado, ao fato de termos usado anticorpos de diferente procedência, um comercializado e outro não comercializado; interpretamos que, muito provavelmente, isto deva indicar diferentes padrões de qualidade dos anticorpos empregados.

5.2.2. Em relação ao grau histológico

Pela literatura, os RE e RP se relacionam aos carcinomas endometrióides mais diferenciados (KOUNELIS et al., 2000; BURTON & WELLS, 1998; FERNANDO et al., 2000). Observamos pela Tabela 6 que os carcinomas endometrióides grau I expressaram mais freqüentemente RE e RP do que os carcinomas de graus II e III, pois do total de 24 casos de RE positivos, 15 eram de carcinoma grau I (63%) e dos 31 casos de RP positivos, 21 eram de carcinoma grau I (68%). Embora tenhamos encontrado expressões diferentes, pelo tamanho amostral, tais resultados não se mostraram significativos à análise estatística, com $p=0,829$ e $p=0,079$, respectivamente.

5.2.3. Em relação ao estágio final da doença

A expressão do receptor de estrógeno no material de curetagem não variou com o estágio final da doença avaliado nas peças de histerectomia ($p=1,000$). Já o receptor de progesterona mostrou variação significativa ($p=0,020$) em relação ao estágio final da doença, notando-se uma diminuição de sua expressão em relação ao estágio III. Como é um dado isolado, do ponto de vista clínico, é de importância discutível e interpretamos que esta observação não pode ser também comprovada no estágio IV pelo fato de haver apenas 3 casos neste grupo.

5.3. EXPRESSÃO GLOBAL DOS MARCADORES

Pela avaliação conjunta dos marcadores estudados no material de curetagem verificamos que não houve dados que superassem os aspectos histológicos clássicos como tipo e grau histológicos em coloração HE de rotina, que contribuíssem para a previsão do estágio final da doença na amostra estudada.



6. CONCLUSÃO

- 1) O tipo e o grau histológicos na curetagem concordaram com a peça de histerectomia em 80% dos casos.
- 2) O carcinoma endometrióide é o tipo mais freqüente ocorrendo em 86% dos casos, em mulheres com média de idade mais jovem (63,6 anos) que o carcinoma não-endometrióide (69,4 anos).
- 3) A expressão do p53 foi significativamente associada ao tipo histológico não endometrióide e foi mais freqüente nos adenocarcinomas endometrióides menos diferenciados (G II e G III).
- 4) A expressão do p53 no material de curetagem não se correlacionou ao estágio final da doença.
- 5) A expressão do RE não se relacionou ao tipo histológico, nem ao grau histológico e nem ao estágio final da doença.
- 6) A expressão do RP associou-se significativamente ao tipo histológico endometrióide e foi menos expresso apenas no estágio avançado E III.
- 7) O estudo imunoistoquímico dos marcadores p53, RE e RP no material de curetagem prévia à histerectomia não forneceu dados que contribuíssem para a previsão do estágio final da doença na amostra estudada.



7. SUMMARY

Introduction: The diagnostic stage is an important prognostic factor of endometrium adenocarcinoma. Apart from the histological type and the histological grade, some markers seem to be associated to the stage and biological behavior of the disease, among them are p53, and estrogen (ER) and progesterone receptors (PR). The **objective** of the present study was to compare p53, ER and PR expressions in the diagnostic curettage samples for endometrium adenocarcinoma, relating then to the histological type, the histological grade and the final stage of the disease in the hysterectomy specimen. **Methods:** Fifty one samples were studied through immunohistochemical reaction with the avidin-biotin-peroxidase method and the results were compared to the hysterectomy data and to the final stage of the disease. **Results: - according to the histological type:** out of 51 cases, 44 (86%) were endometrioid type (EC) and 7 (14%) non-endometrioid (NEC). The p53 expression was observed in 16% of the EC and in 71% of the NEC ($p<0.05$). Although ER expression was more evident in EC (54%) than in NEC (29%), this was not statistically significant. The PR expression was significantly higher in EC (70% X 14%, $p<0.05$). – **according to the histological grade:** EC grade 1 expressed better ER and PR than in grades II and III, while the p53 expression was mainly reported in grade II and III tumors. – **disease stage in the hysterectomy:** p53 and ER expressions in curettage were not related to the stage of the disease. The PR expression, however, was significantly smaller in the advanced stages. **Conclusion:** p53 expression is observed in the majority of NEC and EC of high grade, not being related to the disease stage. ER and PR are mainly found in endometrioid carcinomas G I, however only the lack of PR expression was significantly associated to the advanced stage of the disease (S III).



8. *REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. – General Principles of Cell Signaling. In: _____ - **Molecular Biology of the Cell**. 3rd. ed., New York, Garland Publishing, 1994. p. 729-31.
- AMBROS, R.A.; VIGNA, P.A.; FIGGE, J.; KALLAKURY, B.V.; MASTRANGELO, A.; EASTMAN, A.; MOLFETANO, J.; ROSS, J. – Observations on Tumor and Metastatic Suppressor Gene Status in Endometrial Carcinoma with Particular Emphasis on p53. **Cancer**, **73** : 1686-92, 1994.
- AMBROS, R. A.; SHEEHAN, C. E.; KALLAKURY, B. V.; ROSS, J.; MOLFETANA, J.; PAUNOVICH, E.; FIGGE, J. – MDM-2 and p53 protein expression in the histologic subtypes of endometrial carcinoma. **Mod. Pathol.**, **9**: 1165-9, 1996.
- BALL, H. G.; BLESSING, J. A.; LENTZ, S. S.; MUTCH, D. G. – A phase of paclitaxel in patients with advanced or recurrent adenocarcinoma of the endometrium: a Gynecologic Oncology Group Study. **Gynecol. Oncol.**, **62**: 278-81, 1996.
- BEHBAKHT, K.; YORDAN, E.L.; CASEY, C.; DEGEEST, K.; MASSAD, L.S.; KIRSCHNER, C.V.; WILBANKS, G.D. - Prognostic Indicators of Survival Endometrial Cancer. **Gynecol. Oncol.**, **55**:363-7, 1994.
- BELINSON, J. L.; SPIROU, B.; McCLURE, M.; BADGER, G.; PRETORIUS, R. G.; ROLAND, T. A. – Stage I carcinoma of the endometrium: a 5-year experience utilizing preoperative cesium. **Gynecol. Oncol.**, **20**: 325-35, 1985.
- BENNETT, W.P.; HOLLSTEIN, M.C.; HE, A.; ZHU, S.M.; RESAU, J.H.; TRUMP, B.F.; METCALF, R.A.; WELSH, J.A.; MIDGLEY, C.; LANE, D.P.; HARRIS, C.C. – Archival analysis of p53 genetic and protein alterations in Chinese esophageal cancer. **Oncogene**, **6**: 1779-84, 1991.
- BENJAMIN, I.; SAIGO, P.; FINSTAD, C.; TAKAHASHI, H.; FREDERICI, M.; RUBIN, S.; BOYD, J. – Expression and mutational analysis of p53 in stage I B and II A cervical cancers. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **175**: 1266-71, 1996.
- BERCHUCK, A.; KOHLER, M.F.; MARKS, J.R.; WISEMAN, R.; BOYD, J.; BAST, R.C. – The p53 tumor suppressor gene frequently is altered in gynecologic cancers. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **170**: 246-52, 1994.

- BOKHMAN, J. V. – Two Pathogenetic Types of Endometrial Carcinoma. **Gynecol. Oncol.**, **15**: 10-7, 1983.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, INSTITUTO NACIONAL DO CâNCER, COORDENAÇÃO DE PROGRAMAS DE CONTROLE DE CâNCER - Pró-câncer no Brasil: dados dos registros de base hospitalar, Rio de Janeiro: Pró-onco, 1993.
- BURTON, J.L. & WELLS, M. – Recent advances in the histopathology and molecular pathology of carcinoma of the endometrium. **Histopathology**, **33**: 297-303, 1998.
- BURTON, J.L.; STEWART, R.L.; HEALTLEY, M.K.; ROYDS, J.A.; WELLS, M. – p53 expression, p21 expression and the apoptotic index in endometrioid endometrial adenocarcinoma. **Histopathology**, **35**: 221-9, 1999.
- CARCANGIU, M. L.; TAN, L. K.; CHAMBERS, J. T. – Stage IA Uterine Serous Carcinoma (A Study of 13 Cases). **Am. J. Surg. Pathol.**, **21**: 1507-14, 1997.
- CHEN, S. S. – Operative treatment in stage I endometrial carcinoma with deep myometrial invasion and/or grade 3 tumor surgical limited to the corpus uteri no recurrence with only primary surgery. **Cancer**, **63**: 1843-45, 1989.
- CHHIENG, D.C.; ROSS, J.S.; AMBROS, R.A. - bcl-2 Expression and the Development of Endometrial Carcinoma. **Mod. Pathol.**, **9**: 402-4, 1995.
- COHEN, C.J. & RAHAMAN, J. – Endometrial cancer – Management of high risk and recurrence including the tamoxifen controversy. **Cancer**, **76**: 2044-52, 1995.
- COPPOLA, D.; FU, L.; NICOSIA, S.V.; KOUNELIS, S.; JONES, M. – Prognostic Significance of p53, bcl-2, Vimentin and S100 Protein-Positive Langerhans Cells in Endometrial Carcinoma. **Hum. Pathol.**, **29**: 455-62, 1998.
- CORTNER, J. & WOUDE, G. F. V. – Essencials of molecular biology, In: DeVITA Jr., V. T.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S. A. – **Cancer: principles & practice of oncology**. 5th. ed., Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers, 1997. p.121-33.
- COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. – Neoplasia. In: _____ - **Robbins Pathologic Basis of Disease**. 6th. ed., Philadelphia, London, Tokio, W. B. Saunders Company, 1999. p. 260-327.

- DE PALO, G.; KENDA, R.; ANDREOLA, S.; LUCIANI, L.; MUSEMECI, R.; RILKE, F.
– Endometrial carcinoma: stage I. A retrospective analysis of 262 patients. **Obstet. Gynecol.**, **60**: 225-31, 1982.
- DUBEAU, I. – Etiology and detection of gynecologic cancer. In: MORROW, C. P.; CURTIN, J. P.; TOWNSEND, D. E., eds. – **Synopsis of gynecologic oncology**. 4th ed. New York, Churchill Livingstone, 1993. p. 1-22.
- EARLY BREAST CANCER TRIALISTS' COLLABORATIVE GROUP – Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomized trials. **Lancet**, **351**: 1451-67, 1998.
- ELHAFEY, A.S.; PAPADIMITRIOU, J.C.; EL-HAKIM, M.S.; EL-SAID, A.I.; GHANNAM, B.B.; SILVERBERG, S.G. – Computerized Image Analysis of p53 and Proliferating Cell Nuclear Antigen Expression in Benign, Hyperplastic, and Malignant Endometrium. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, **125**: 872-9, 2001.
- ENOMOTO, T.; FUJITA, M.; INOUE, M.; RICE, J. M.; NAKAJIMA, R.; TANIZAWA, O.; NOMURA, T. – Alterations of the p53 tumor suppressor gene and its association with activation of the c-K-ras-2 protooncogene in premalignant lesions of the human uterine endometrium. **Cancer Res.**, **53**: 1883-8, 1993.
- FERNANDO, S.S.E.; WU, X.; PERERA, L. – p53 Overexpression and Steroid Hormone Receptor Status in Endometrial Carcinoma. **Int. J. Surg. Pathol.**, **8**: 213-22, 2000.
- FIGO stages: 1988: revision. **Gynecol. Oncol.**, **35**: 125-7, 1989.
- FIGO ANNUAL REPORT ON THE RESULTS OF TREATMENT IN _____ GYNAECOLOGICAL CANCER. Milano, FIGO, 1998. 34p. (**J. Epidemiol. Biostat.**, **23**)
- FRANCO, E. L. – Epidemiologia do câncer mamário e ginecológico. In: ABRÃO, F. A. – **Tratado de oncologia genital e mamária**. São Paulo, Roca, 1994. p.3-16.
- FOLEY, K. & LEE, R. B. – Surgical complications of obese patients with endometrial carcinoma. **Gynecol. Oncol.**, **39**: 171-4, 1990.

- GEISLER, J.P.; GEISLER, H.E.; WIEMANN, M.C.; ZHOU, Z.; MILLER, G.A.; CRABTREE, W. – p53 Expression as a Prognostic Indicator of 5-Years Survival in Endometrial Cancer. **Gynecol. Oncol.**, **74**: 468-71, 1999.
- GEISLER, J. P.; WIEMANN, M.; ZHOU, Z.; MILLER, G.A.; GEISLER, H.E. – p53 as a prognostic indicator in endometrial cancer. **Gynecol. Oncol.**, **61**: 245-8, 1996.
- GIANNONE, R.; BERNORIO, R.; POLI, M. – I fattori di rischio del carcinoma dell'endometrio. **Minerva Ginecol.**, **45**: 361-4, 1993.
- GODWIN, A. K.; SCHULTZ, D. C.; HAMILTON, T. C.; KNUDSON Jr., A. G. – Oncogenes and tumor suppressor genes. In: HOSKINS, W. J.; PEREZ, C. A.; YOUNG, R. C. – **Principles and practice of gynecology oncology**. 2nd. ed. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers, 1997. p. 107-48.
- GOMPEL, C. & KOSS, L. G. – Princípios de biologia molecular – As funções celulares. In: _____ – **Citologia ginecológica e suas bases anatomoclínicas**. São Paulo, Manole Ltda., 1997. p. 13-21.
- GOMPEL, C. & SILVERBERG, S. G. – Corpus uteri. In: _____, eds. **Pathology in Gynecology and Obstetrics**. 4th ed. J. B. Lippincott Company, 1994. p.163-283.
- GUSBERG, S. B. & MULVIHILL, M. N. – Epidemiology. **Clin. Obstet. Gynecol.**, **13**: 665-72, 1986.
- HAMEL, N.W.; SEBO, T.J.; WILSON, T.O.; KEENEY, G.L.; ROCHE, P.C.; SUMAM, V.J.; HU, T.C.; PODRATZ, K.C. - Prognostic Value of p53 and Proliferating Cell Nuclear Antigen Expression in Endometrial Carcinoma. **Gynecol. Oncol.**, **62**: 192-8, 1996.
- HENDRICKSON, M.; ROSS, J.; EIFEL, P. J.; COX, R. S. MARTINEZ, A.; KEMPSON, R. – Adenocarcinoma of the endometrium: Analysis of 256 cases with carcinoma limited to the uterine corpus. **Gynecol. Oncol.**, **13**: 373-92, 1982.
- HONDA, T.; KATO, H.; IMAMURA, T.; GIMA, T.; NISHIDA, J.; SASAKI, M.; HOSHI, K.; SATO, A.; WAKE, N. – Involvement of p53 gene mutations in human endometrial carcinomas. **Int. J. Cancer**, **53**: 963-7, 1993.

- IOFFE, O.; PAPADIMITRIOU, J.; DRACHENBER, C. – Correlation of proliferation indices, apoptosis, and related oncogene expression (bcl-2 and c-erbB-2) and p53 in proliferative, hyperplastic and malignant endometrium. **Hum. Pathol.**, **29**: 1150-9, 1998.
- ITO, K.; WATANABE, K.; NASIM, S.; SASANO, H.; SATO, S.; YALIMA, A.; SILVERBERG, S.G.; GARRET, C.T. – Prognostic Significance of p53 Overexpression in Endometrial Cancer. **Cancer Res.**, **54**: 4667-70, 1994.
- JENKINS, J.R.; RUDGE, K.S.; CURRIE, G.A. – Cellular immortalization by a cDNA clone encoding the transformation-associated phosphoprotein p53. **Nature**, **312**: 651-4, 1984.
- JONES, M. W.; KOUNELIS, S.; HSU, C.; PAPADAKI, H.; BAKKER, A.; SWALSKY, P. A.; FINKELSTEIN, S. D. – Prognostic value of p53 and K-ras-2 Topographic Genotyping in Endometrial Carcinoma: a Clinicopathologic and Molecular Comparison. **Int. J. Gynecol. Pathol.**, **16**: 354-60, 1997.
- JORDAN, V.C. – Designer estrogens. **Scientific American**, -: 36-43, Oct, 1998.
- JUDD, H. L.; SHAMONKI, I. M.; FRUMAR, A. M.; LAGASSE, L. D. – Origin of serum estradiol in postmenopausal women. **Obstet. Gynecol.**, **59**: 680-6, 1982.
- KAKU, T.; KAMURA, T.; KIRAKAWA, T.; SAKAI, K.; AMADA, S.; KOBAYASHI, H.; NAKANO, H. – Endometrial Carcinoma Associated with Hyperplasia – Immunohistochemical Study of Angiogenesis and p53 Expression. **Gynecol. Oncol.**, **72**: 51-5, 1999.
- KASTAN, M.B.; ONYEKWERE, O.; SIDRANIKY, D.; VOGELSTEIN, B.; CRAIG, R. – Participation of p53 Protein in the Cellular Response to DNA Damage. **Cancer Res.**, **51**: 6304-11, 1991.
- KOUNELIS, S.; KAPRANOS, N.; KOURI, E.; COPPOLA, D.; PAPADAKI, H.; JONES, M. – Immunohistochemical Profile of Endometrial Adenocarcinoma: A Study of 61 Cases and Review of the Literature. **Mod. Pathol.**, **13**: 379-88, 2000.
- KOHLER, M.F.; BERCHUCK, A.; DAVIDOFF, A.M.; et al - Over-expression and mutation of p53 in endometrial carcinoma. **Cancer Res.** **52**: 1622-7, 1992.

- KURMAN, R.J.; NORRIS, H.J. Endometrial carcinoma. In: Kurman RJ, ed. **Blaustein's pathology of the female genital tract**, 4th ed., Berlin, Springer-Verlag, 1994. p. 338.
- LANE, D.P. – p53, guardian of the genome. **Nature**, **358**: 15-6, 1992.
- LAPINSKA, S.; OLSZEWSKI, J.; MAKAREWIEZ, H.; EMERICH, J.; DEBNIAK, J. – A clinical analysis of risk factors in women operated because of endometrial cancer. **Ginekol. Pol.**, **69**: 252-7, 1998.
- LAX, S.F.; KENDALL, B.; TASHIRO, H.; SLEBOS, R.J.C.; ELLENSON, L.H. – The Frequency of p53, K-ras Mutations, and Microsatellite Instability Differs in Uterine Endometrioid and Serous Carcinoma. – Evidence of distinct molecular genetic pathway. **Cancer**, **88**: 814-24, 2000.
- LEVINE, A.J.; MOMAND, J.; FINLAY, C.A. – The p53 tumor suppressor gene – review article. **Nature**, **351**: 453-6, 1991.
- LEWIN, B. – Oncogenes and cancer. In: _____ – **Genes**. 6th. ed., Oxford, New York, Tokyo, Oxford University Press, 1997. p. 1162-72.
- LIVINGSTONE, L.R.; WHITE, A.; SPROUSE, J.; LIVANOS, E.; JACKS, T.; TISTY, T.D. – Altered Cell Cycle Arrest and Gene Amplification Potential Accompany Loss of Wild-Type p53. **Cell**, **70**: 923-35, 1992.
- LODISH, H.; BALTIMORE, D.; BERK, A.; ZIPURSKY, S. L.; MATSUDAIRA, P.; DARNELL, J. – Cancer. In: _____ - **Molecular Cell Biology**, 3rd. ed., New York, Scientific American Books, 1996. p. 1247-94.
- LUKES, A.S.; KOHLER, M.F.; PIEPER, C.F.; KERNS, B.J.; BENTLEY, R.; RODRIGUEZ, G.C.; SOPER, J.T.; CLARKE-PEARSON, D.L.; BAST, R.C.; BERCHUCK, A. – Multivariable Analysis of DNA Ploidy, p53 and HER-2/neu as Prognostic Factors in Endometrial Cancer. **Cancer**, **73**: 2380-5, 1994.
- LURAIN, J. R.; RICE, B. L.; RADEMAKER, A. W.; POGGENSEE, L. E.; SCHINK, J. C.; MILLER, D. S. – Prognostic factors associated with recurrence in clinical stage I adenocarcinoma of endometrium. **Obstet. Gynecol.**, **78**: 63-9, 1991.

- MAHBOUBI, E.; EYLER, N.; WYNDER, E. L. – Epidemiology of cancer of the endometrium. **Cin. Obstet. Gynecol.**, **25**: 5-17, 1982.
- MACGROGAN, G.; SOUBEYRAN, I.; DE MASCAREL, I.; WAFFLART, J.; BONICHON, F.; DURAND, M.; AVRIL, A.; MAURIAC, L.; TROJANI, M.; COINDRE, J.M. – Immunohistochemical Detection of Progesterone Receptors in Breast Invasive Ductal Carcinomas – A correlative study of 942 cases. **Appl. Immunohistochem.**, **4**: 219-27, 1996.
- MALPICA, A.; TORNOS, C.; BURKE, T. W.; SILVA, E. G. – Low-Stage Clear-Cell Carcinoma of the Endometrium. **Am. J. Surg. Pathol.**, **19**: 769-74, 1995.
- MILLIS, R. R.; HANBY, A. M.; GIRLING, A. C. – The breast. In: STERNBERG, S. S. – **Diagnostic Surgical Pathology**, 2nd. ed., Philadelphia, Lippincott-Raven, 1994. p. 327-30.
- MILNER, J.; MEDCALF, E.A. – Cotranslation of Activated Mutant p53 with Wild Type Drives the Wild-Type p53 Protein into the Mutant Conformation. **Cell**, **65**: 765-74, 1991.
- MORROW, C. P.; BUNDY, B. N.; KURMAN, R. J.; CREASMAN, W. T.; HELLER, P.; HOMESLEY, H. D.; GRAHAM, J. E. – Relationship between surgical-pathological risk factors and outcome in clinical stage I and II carcinoma of the endometrium: A Gynecologic Oncology Group Study. **Gynecol. Oncol.**, **40**: 55-65, 1991.
- MUTTER, G. L. – I. Histopathology of Genetically Defined Endometrial Precancers (International Society of Gynecological Pathologists Symposium on Endometrial Hyperplasia). **Int. J. Gynecol. Pathol.**, **19**: 301-9, 2000.
- MUTTER, G. L. and The Endometrial Collaborative Group – Endometrial Intraepithelial Neoplasia (EIN): Will It Bring Order to Chaos? (Commentary) – **Gynecol. Oncol.**, **76**: 287-90, 2000.
- NIKAIDO, T.; LI, S.; SHIOZAWA, T.; FIJIL, S. - Coabnormal Expression of Cyclin D1 and p53 Protein in Human Uterine Endometrial Carcinomas. **Cancer** **78**:1248-53, 1996.

- NOGALES, F. – Factores pronosticos en adenocarcinoma de endometrio. In: Controversias y adelantos en Patologia Quirurgica, XXI CONGRESSO BRASILEIRO DE PATOLOGIA, Brasília, 1997.
- NOUMOFF, J.S.; MENZIN, A.; MIKUTA, J.; LUSK, E.J.; MORGAN, M.; LIVOLSI, V.A. – The Ability to Evaluate Prognostic Variable no Frozen Section in Hysterectomies Performed for Endometrial Carcinoma. *Gynecol. Oncol.*, **42**: 202-8, 1991.
- OSBORNE, C.K. – Tamoxifen in the Treatment of Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.*, **339**: 1609-18, 1998.
- ÖZSARAN, A.A.; TÜRKER, S.; DIKMEN, Y.; ERHAN, Y.; ITIL, I.; TEREK, C.; ÖZDEMİR, N. – p53 staining as a prognostic indicator in endometrial carcinoma. *Eur. J. Gynecol. Oncol.*, **20**: 156-9, 1999.
- PARKER, S.L.; TONG, T.; BOLDEN, S.; WINGO, P.A. – Cancer Statistics. *CA Cancer J. Clin.*, **46**: 5-27, 1996.
- PEDRO, A.O.; PINTO – NETO, A.M.; COSTA – PAIVA, L.H.S.; BORGES, M. H.; LANE, E. – A neoplasia maligna como causa de óbito feminino no complexo hospitalar da UNICAMP. Um aspecto de transição epidemiológica. *Rev. Bras. Ginec. Obst.* **18**: 349-53, 1996.
- PODCZASKI, E. S.; KAMINSKI, P.; MANETTA, A.; LOUK, D.; ANDREWS, C.; LARSON, J.; DEGEEST, K.; MORTEL, R. – Stage II endometrial carcinoma treated with external-beam radiotherapy, intracavitary application of cesium, and surgery. *Gynecol. Oncol.*, **35**: 251-4, 1989.
- RANDALL, T. C. & KURMAN, R. J. – Progestin treatment of atypical hyperplasia and well-differentiated carcinoma of the endometrium in women under 40. *Obstet. Gynecol.*, **90**: 434-40, 1997.
- ROBINSON, D.C.; BLOSS, J.D.; SCHIANO, M.A. – A Retrospective Study of Tamoxifen and Endometrial Cancer in Breast Cancer Patients. *Gynecol. Oncol.*, **59**:186-90, 1995.

- ROSE, P.G. – Endometrial Carcinoma (Review Article). *N. Eng. J. Med.* **335**: 640-9, 1996.
- SALVESEN, H.; IVERSEN, O.E.; AKSLEN, L.A. – Prognostic Significance of Angiogenesis and Ki-67, p53, and p21 Expression: A Population-Based Endometrial Carcinoma Study. *J. Clin. Oncol.*, **17**: 1382-90, 1999.
- SCHEISTROEN, M.; TROPÉ, C.; PETTERSEN, E.O.; NESLAND, J.M. – p53 Protein Expression in Squamous Cell Carcinoma of the Vulva. *Cancer*, **85**: 1133-8, 1999.
- SCHINK, J.C.; LURAIN, J. R.; WALLEMARK, C.B.; CHMIEL, J. S. – Tumor size in endometrial cancer: A prognostic factor for lymph node metastasis. *Obstet. Gynecol.*, **70**: 216-9, 1987.
- SCHINK, J. C.; RADEMAKER, A. W.; MILLER, D. S.; LURAIN, J. R. – Tumor size in endometrial cancer. *Cancer*, **67**: 2791-4, 1991.
- SHAIN, M.S.; HUGHES, J.H.; SOOD, A.K.; BULLER, R.E. – The Prognostic Significance of p53 Tumor Suppressor Gene Alterations in Ovarian Carcinoma. *Cancer*, **89**: 2006-17, 2000.
- SHERMAN, M.E. – Theories of Endometrial Carcinogenesis: A Multidisciplinary Approach. *Mod. Pathol.*, **13**: 295-308, 2000.
- SIDAWY, M. K. & SILVERBERG, S. G. – Endometrial carcinoma, pathologic factors of therapeutic and prognostic significance. *Pathol. Annual*, **27**:153-85, 1992.
- SPENCER, S.J.; CATALDO, N.A.; JAFFE, R.B. - Apoptosis in the Human Female Reproductive Tract. *Obstetrical and Gynecological Survey*, **51**: 314-23, 1996.
- STEWART, R.L. ROYDS, J.A.; BURTON, J.L.; HEATLEY, M.K.; WELLS, M. – Direct sequencing of the p53 gene shows absence of mutations in endometrioid endometrial adenocarcinomas expressing p53 protein. *Histopathology*, **33**: 440-5, 1998.
- SUNG, C.J.; ZHENG, Y.; QUDDUS, M.R.; KANG, X.; ZANG, Z.-F.; LAUHLAN, S.C.; ZHENG, W. – p53 as a significant prognostic marker in endometrial carcinoma. *Int. J. Gynecol. Cancer*, **10**: 119-27, 2000.

- TASHIRO, H.; ISACSON, C.; LEVINE, R.; KURMAN, R. J.; CHO, K. R.; HEDRICK, L. - p53 gene mutations are common in uterine serous carcinoma and occur early in their pathogenesis. *Am. J. Pathol.*, **150**: 177-85, 1997.
- TASKIN, M.; LALLAS, T.A.; BARBER, H.R.K.; SHEVCHUK, M.M. - bcl-2 and p-53 in Endometrial Adenocarcinoma. *Mod. Pathol.*, **10**: 728-34, 1997.
- TAYLOR, C.R.; SHI, S.R.; COTE, R.J. - Antigen retrieval for immunohistochemistry. *Appl. Immunohist.*, **4**: 144-66, 1996.
- TEMPLETON, A. C. - Reporting of myometrial invasion by endometrial cancer. *Histopathology*, **6**: 733-7, 1982.
- TENTI, P.; PAVANELLO, S.; PADOVAN, L.; SPINILLO, A.; VESENTINI, N.; ZAPPATORE, R.; MIGLIORA, P.; ZARA, C.; RANZANI, G.N.; CARNEVALI, L. - Analysis and Clinical Implications of p53 Gene Mutations and Human Papillomavirus Type 16 and 18 in Primary Adenocarcinoma of the Uterine Cervix. *Am. J. Pathol.*, **152**: 1057-63, 1998.
- THOR, A.D.; MOORE, D.H.; EDGERTON, S.M.; KAWASAKI, E.S.; REIHS AUS, E.; LYNCH, H.T.; MARCUS, J.N.; SCHWARTZ, L.; CHEN, L.-C.; MAYALL, B.H.; SMITH, H.S. - Accumulation of p53 Tumor Suppressor Gene Protein: An Independent Marker of Prognosis in Breast Cancers. *J. Natl. Cancer Inst.*, **84**: 845-55, 1992.
- XIANGWEI, W.; BAYLE, J. H.; OLSON, D.; LEVINE, A. J. - The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes and Development*, **7**: 1126-32, 1993.
- XIONG, Y.; HANNON, G.J.; ZHANG, H.; CASSO, D.; KOBAYASHI, R.; BEACH, D. - p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature*, **366**: 701-4, 1993.
- YIN, Y.; TAINSKY, M.A.; BISHOFF, F.Z.; STRONG, L.C.; WAHL, G.M. - Wild-Type p53 Restores Cell Cycle Control and Inhibits Gene Amplification in Cells with Mutant p53 Alleles. *Cell*, **70**: 937-48, 1992.
- WALTER, J.B. & TALBOT, I. C. - The normal cell. In: _____
- **General Pathology**. 7th ed., New York, Churchill Livingstone, 1996. p. 23-58.

- WESTHOFF, C.; HELLER, D.; DROSINOS, S.; TANCER, L. – Risk factors for hyperplasia-associated versus atrophy-associated endometrial carcinoma. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, **182**: 506-8, 2000.
- WOLF, J.K. & WHARTON, J.T. – Wild-Type p53 Overexpression: What Role in Tumorigenesis? – Editorial – **Gynecol. Oncol.**, **60**: 337-8, 1996.
- WU, X.; BAYLE, J.H.; OLSON, D.; LEVINE, A.J. – The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. **Genes & Dev.**, **7**: 1126-32, 1993.
- ZHENG, W.; CAO, P.; ZHENG, M.; KRAMER, E.E.; GODWIN, T.A. - p53 Overexpression and bcl-2 Persistence in Endometrial Carcinoma: Comparison of Papillary Serous and Endometrioid Subtypes. **Gynecol. Oncol.**, **61**: 167-74, 1996.



9. BIBLIOGRAFIAS DE NORMATIZAÇÕES

1. HERANI, M. L. G. – Normas para apresentação de dissertações e teses. BIREME, São Paulo, 1991, 45p.
2. Normas e procedimentos para publicação de dissertações e teses. Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP. Ed. SAD – OF. CIRC./PRPG/06/95 – Normas ABNT. DELIBERAÇÃO CCPG – 01/98. 6p.



10. ANEXOS

BANCO DE DADOS

CARCINOMA DE ENDOMETRIO E FATORES PROGNÓSTICOS

Nº	idade	TIPO HISTOLÓGICO	GR. HIST.	E.F.D.	p53	RE	RP	HTA
1	56	AE	GI	E 1 b	N	P+++	P++	A E (G I)
2	72	AM	GI	E 1 a	N	N	N	AM
3	57	AE	GI	E 3 a	N	P+	P++	A E (G II)
4	73	AM	GI	E 1 b	N	P+	P+	AM
5	53	AE GLASSY	G III	E 1 b	P+(i)	P+++	P++	A E GLASSY (G III)
6	54	AE	G II	E 1 a	P++	P+	N	*
7	47	ACELS CLARAS	G III	E 3 c	N	N	N	ACELS CLARAS (G II)
8	78	AE	GI	E 1 b	N	P+++	P+++	A E (G I)
9	55	AE	GI	E 2 b	N	P+++	P+++	A E (G I)
10	69	AE	GI	E 4	N	N	P+++	A E (G I)
11	60	ASERO PAP	G II	E 2 b	P++	P+	N	ASERO PAP (G II)
12	69	AE	GI	E 2 a	N	P+++	P+++	A E (G I)
13	49	AE	GI	E 3 c	N	P++	N	A E (G III)
14	79	AE	GI	E 1 b	N	P+++	P+++	A E (G I)
15	58	A E E S	G II	E 3 c	N	N	N	A E (G III)
16	76	ACELS CLARAS		E 3 c	P+++	N	N	ACELS CLARAS
17	67	A E E S	GI	E 1 b	N	N	P++	AM
18	66	A E E S	G II	E 1 b	N	N	N	A E E S (G II)
19	69	A E E S	GI	E 2 a	N	P+	P++	A E E S (G I)
20	70	AM	G II	E 1 b	P+	P+++	P++	AM
21	70	AE	G III	E 2 b	P+++	P+	P+	A E (G III)
22	74	ACELS CLARAS		E 1 b	N	N	N	ACELS CLARAS
23	60	A E E S	G II	E 1 c	P+	P+++	N	A E E S (G II)
24	51	AE	GI	E 3 a	N	P+++	N	A E (G I)
25	78	ACELS CLARAS		E 3 c	P+	P+	N	ACELS CLARAS
26	61	AM	GI	E 1 b	N	P+	P+++	AM
27	67	AE	GI	E 1 b	N	P+	P+++	A E (G I)
28	43	AE	GI	E 1 b	P+	N	P+++	A E (G I)
29	83	AE	G II	E 1 b	N	N	P+	A E (G III)
30	50	AE	G II	E 1 b	N	N	N	A E (G II)
31	73	A E E S	GI	E 2 a	N	N	P+++	A E (G II)
32	59	AE	GI	E 1 a	N	N	N	A E (G I)
33	60	A E E S	G III	E 2 b	N	N	P+++	A E E S (G III)
34	72	A E E S	G II	E 2 a	N	N	N	A E E S (G II)
35	44	AE	GI	E 1 a	N	P+	P++	A E (G I)
36	72	AM	GI	E 1 a	N	N	P+++	A E (G I)
37	58	A E E S	G II	E 2 b	N	P+	P+++	A E E S (G II)
38	55	AE	GI	E 1 b	N	P+	P+	A E (G II)
39	62	AM	G II	E 1 b	N	N	N	AM
40	67	AM	GI	E 1 b	N	N	P+	AM
41	68	AM	G II	E 1 b	N	N	N	AM
42	83	ACELS CLARAS		E 2 a	P++ (i)	N	P++	ACELS CLARAS
43	78	AM	G II	E 1 b	N	P++	P+	AM
44	68	ACELS CLARAS	GI	E 1 b	P+	N	N	ACELS CLARAS

45	56	A M	G II	E 1 b	N	P ++	P ++	A M
46	71	A E	G I	E 1 b	N	N	P ++	A E (G I)
47	82	A E E S	G III	E 2 b	N	N	P +	A E (G II)
48	60	A E E S	G I	E 2 b	P +	N	P +++	A E (G II)
49	56	A E	G I	E 4 (atual)	N	N	N	A E (G I)
50	57	A E	G III	E 4	N	P ++ (i)	P ++ (i)	A E (G III)
51	70	A E E S	G I	E 1 b	N	P ++	P ++	A E (G I)

A E - adenocarcinoma padrão endometrióide

A M - adenocarcinoma padrão misto

A E GLASSY - adenocarcinoma padrão endometrióide com "glassy cells"

A CELS CLARAS - adenocarcinoma de células claras

A SERO PAP - adenocarcinoma seroso papilífero

A E E S - adenocarcinoma padrão endometrióide com diferenciação escamosa

GR. HIST. - grau histológico

E. F. D. - estágio final da doença

RE - receptor de estrogênio

RP - receptor de progesterona

HTA - histerectomia

G - grau; E - estágio

P - positivo; N - negativo

* - não foi encontrado tumor