



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação *Stricto sensu***

Cláudia Bessa Pereira Chaves

**Mecanismos Moleculares Envolvidos na Progressão e
Recidiva do Câncer de Endométrio**

Orientador (es): Prof. Dr. Luis Felipe Ribeiro Pinto
Prof. Dr. Miguel Angelo Martins Moreira
Prof. Dra. Tatiana de Almeida Simão

RIO DE JANEIRO

2014



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação *Stricto sensu***

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

Pós-Graduação em Oncologia

Cláudia Bessa Pereira Chaves

**Mecanismos Moleculares Envolvidos na Progressão e
Recidiva do Câncer de Endométrio**

Tese apresentada ao Instituto Nacional de Câncer
como parte dos requisitos para obtenção do título
de Doutor em Oncologia

Orientador (es): Prof. Dr. Luis Felipe Ribeiro Pinto
Prof. Dr. Miguel Angelo Martins Moreira
Prof. Dra. Tatiana de Almeida Simão

**RIO DE JANEIRO
2014**

C512m Chaves, Cláudia Bessa Pereira.

Mecanismos moleculares envolvidos na progressão e recidiva do câncer de endométrio. / Cláudia Bessa Pereira Chaves. □ Rio de Janeiro, 2014.

xx, 188 f.: il. color.

Tese (Doutorado em Oncologia) – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2014.

Orientadores: Luis Felipe Ribeiro Pinto; Miguel Ângelo Martins Moreira; Tatiana de Almeida Simão.

1. Adenocarcinoma de Endométrio. 2. Recidiva Tumoral. 3. PGR. 4. ESR1. 5. GREB1. I. Pinto, Luis Felipe Ribeiro (orient.). II. Moreira, Miguel Ângelo Martins (orient.). III. Simão, Tatiana de Almeida (orient.). IV. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. V. Título.

616.99466



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação *Stricto sensu***

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia**

Cláudia Bessa Pereira Chaves

**Mecanismos Moleculares Envolvidos na Progressão e
Recidiva do Câncer de Endométrio**

ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. Luis Felipe Ribeiro Pinto
Prof. Dr. Miguel Angelo Martins Moreira
Prof. Dra. Tatiana de Almeida Simão

Aprovada em: 25 / 09 / 2014

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Luiz Cláudio Santos Thuler
Prof. Dr. Francisco José Barcellos Sampaio
Prof. Dra. Raquel Ciivalschi Maia
Prof. Dr. Ruy Garcia Marques
Prof. Dra. Liz Maria de Almeida
Prof. Dr. Robson Queiroz Monteiro

**RIO DE JANEIRO
2014**

AGRADECIMENTOS

Minha mãe Judice e meus irmãos Lucas e Álvaro, pelo apoio e incentivo incondicionais e infinita paciência.

Dr. Luis Felipe Ribeiro Pinto e Dr. Miguel Angelo Martins Moreira, meus orientadores e grandes amigos, pela atenção, paciência e confiança dispensadas a uma cirurgiã que decidiu se enveredar pela pesquisa translacional.

Dra. Tatiana de Almeida Simão, mais que amiga e também orientadora, presença fundamental em todas as etapas deste projeto, uma irmã para todas as horas.

Dra. Anke Bergmann, grande amiga, sempre disponível e paciente, ajuda fundamental para organizar um banco de dados de mais de 1.100 casos e efetuar todas as suas análises estatísticas.

Dr. Reinaldo Rondinelli e Dr. Luiz Augusto Maltoni Jr., mais que colegas de equipe e amigos, irmãos mais velhos, pelo apoio e compreensão pelas muitas ausências impostas pela realização deste projeto.

Dr. Marcos José Pereira Renni, atual diretor do HC II, pela confiança e apoio fundamentais para o prosseguimento e conclusão deste projeto.

Dra. Janina Ferreira Loureiro Huguenin, pela importante participação no levantamento de 300 prontuários incluídos neste banco de dados.

Dr. Pedro Nicolau Neto, pela imensa ajuda na realização da etapa prática dos experimentos de microarranjo de DNA e nas análises de PCR em tempo real.

Paulo Thiago Souza Santos, pela realização da análise estatística dos dados do microarranjo de DNA.

Dr. Davy Carlos Mendes Rapozo, pela importante ajuda nos experimentos de imuno-histoquímica.

Lilian Brewer Lisboa, pela ajuda imprescindível na realização de todas as etapas da metodologia de PCR em tempo real.

Dr. Luiz Figueiredo Mathias (*in memoriam*), chefe da Seção de Ginecologia Oncológica até julho de 2014, pelo apoio durante os primeiros anos deste projeto.

Dr. José Carlos de Jesus Conceição, atual chefe da Seção de Ginecologia Oncológica, pelo incentivo e apoio permanentes.

Dr. Marcus Vinícius Dantas de Campos Martins e Dr. José Roberto Magno de Jesus, chefe e vice-chefe do Serviço de Cirurgia Geral do Hospital Municipal Lourenço Jorge, pela compreensão, apoio e amizade.

Luciana Medeiros de Castro, bióloga e atual Coordenadora do BNT, por toda a atenção e dedicação dispensadas nas etapas de utilização das amostras armazenadas naquela seção.

Fernando Martins, técnico do BNT, pela disponibilidade e presteza, sua ajuda foi fundamental.

Paulo Moraes e Adriana Muniz Gouvea, técnicos da sala de congelação do HCII, pela indispensável ajuda na coleta de amostras das peças cirúrgicas no per-operatório.

Dr. Paulo Faria, ex-chefe da DIPAT, pela concordância na participação da sua seção neste estudo.

Dra. Ivanir Martins, atual chefe da DIPAT, por ceder alíquotas de dois dos anticorpos utilizados na etapa de imuno-histoquímica.

Conceição Ribeiro Magalhães Katayama e Edna Maria Gonçalves Martins, secretárias da Seção de Ginecologia Oncológica, pelo auxílio na entrega dos termos de consentimento às pacientes.

Marcele Rozeno de Freitas, pela ajuda na realização dos experimentos de imuno-histoquímica.

Dr. Fábio Carvalho de Barros Moreira, patologista envolvido no projeto, pela amizade e presteza em efetuar todas as análises que envolveram o parecer da especialidade.

Dr. Bruno Biancchi, patologista, pela ajuda nas análises de imuno-histoquímica.

Vanessa Paiva Leite de Sousa, pela ajuda na etapa de corte dos blocos de tumores para extração de RNA para a metodologia de PCR em tempo real.

Laboratório de Bioquímica da UERJ, onde foi realizada a metodologia de imuno-histoquímica.

Funcionários do Arquivo Médico do HC II, sobretudo o chefe do setor Paulo César Leite, pela presteza e eficiência em separar e resgatar os mais de 1.100 prontuários necessários para este estudo, muitos deles em outras unidades do INCA e no *multistock*.

Monique de Souza Almeida Lopes, técnica do Laboratório do Programa de Carcinogênese Molecular, por toda a atenção e ajuda que dispôs ao longo da realização deste projeto.

Dr. Vagner Bernardo, pela ajuda dispensada após a realização da metodologia de imuno-histoquímica.

Dra. Maria Theresa Accioly e Rafaela de Oliveira (DIPAT), pela ajuda na etapa de separação dos blocos e confecção das lâminas para a realização da metodologia de imuno-histoquímica.

Alunos do Programa Carcinogênese Molecular, pela amizade e apoio ao longo dos últimos quatro anos.

FAPERJ, CAPES, CNPq e INCA, pelo apoio financeiro.

Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação *Stricto sensu*

Mecanismos Moleculares Envolvidos na Progressão e Recidiva do Câncer de Endométrio

TESE DE DOUTORADO

Cláudia Bessa Pereira Chaves

RESUMO

O câncer de endométrio é responsável por mais de 90% dos casos de câncer de corpo de útero. É considerada a quinta neoplasia maligna mais incidente entre mulheres no mundo, sendo estimados 319.605 novos casos e 76.155 óbitos para o ano de 2012 (IARC). A maior ocorrência é observada nos países desenvolvidos, mas a doença vem progredindo em alguns países em desenvolvimento. No Brasil, é observado um crescente aumento com 5.900 novos casos estimados para 2014. O tipo histológico mais frequente é o adenocarcinoma, sendo o tipo endometriode (Tipo I) o mais comum. A sobrevida na doença localizada, na localmente avançada e na metastática é de 96%, 66% e 24%, respectivamente. Entretanto, uma parcela das pacientes com critérios clínico-patológicos de bom prognóstico pode evoluir com recidiva e apresentar resposta limitada ao tratamento. Por isto, a identificação e compreensão das características clínico-patológicas e da biologia molecular do câncer de endométrio são fundamentais para o entendimento da evolução da doença. Já foram descritas algumas alterações moleculares características dos subtipos de adenocarcinoma, porém ainda não está bem estabelecida associação destes marcadores ao risco de progressão e recidiva. Assim, o objetivo principal deste estudo foi identificar tanto fatores clínico-patológicos quanto alterações moleculares que possam prever um pior prognóstico das pacientes com câncer de endométrio. Para tal, inicialmente foram analisadas as frequências descritivas, a sobrevida livre de doença (SLD) e a sobrevida global (SG) de 1.132 pacientes com o diagnóstico de “adenocarcinoma de endométrio”, matriculadas e tratadas no período de 2000 a 2011. A idade mediana foi de 63,7 anos. Os tumores Tipo I, de baixo grau e diagnosticados nos estádios precoces foram os mais frequentes. Recidiva e óbito ocorreram mais nos tumores Tipo II ($p < 0,001$ cada). Entre diversas variáveis estudadas, a análise multivariada da SLD apontou estadiamento e presença de invasão linfovascular como fatores prognósticos independentes para o risco de recidiva em todas as populações estudadas; para SG apontou o estadiamento como o fator prognóstico independente para o risco de óbito. A partir da conclusão deste banco de dados, foi realizada análise por microarranjo para identificação das possíveis alterações na expressão gênica em tumores Tipo I de pacientes que apresentaram ou não recidiva, em amostras de 21 casos dos estádios I, II e III (11 com e 10 sem recidiva). Após análise de agrupamento supervisionada, foram identificados 62 genes diferencialmente expressos. Três genes foram selecionados (*PGR*, *ESR1* e *GREB1*) para validação da expressão gênica com PCRq e avaliação da expressão proteica por imuno-histoquímica, em número maior de amostras armazenadas em parafina ($n=107$). Foi observada aumento significativo da expressão do RNAm de *ESR1* nas recidivas em comparação aos tumores sem recidiva ($p < 0,0001$), porém não houve diferença para a expressão de *PGR* e *GREB1* entre os dois grupos. A expressão proteica dos receptores de estrogênio e progesterona não foi diferente entre os casos com e sem recidiva, e também não foi associada ao risco de recidiva. Foram observados baixos níveis de expressão para o RNAm de *GREB1*, mas houve associação entre os resultados da expressão proteica positiva e os casos sem recidiva, conferindo proteção ($p=0,0196$).

ABSTRACT

Endometrial cancer accounts for over 90% of corpus uteri cancer. It is the fifth malignancy among women, with 319,605 new cases and 76,155 related deaths worldwide in 2012 (IARC). Most cases occur in developed countries, but its incidence is increasing in developing countries as well. Incidence rates in Brazil are raising and 5,900 new cases are expected for 2014. Adenocarcinomas are the most common histologic type and endometrioid adenocarcinomas (Type I) are diagnosed more often. Overall survival in disease confined in the uterus, in locally advanced disease and in metastatic disease is 96%, 66% and 24%, respectively. However, a group of patients whom present clinicopathological characteristics of good prognosis can develop recurrence with poor response to treatment. For this reason it is essential to improve knowledge about clinicopathological features and molecular biology of endometrial cancer. Some molecular aberrations on specific histologic subtypes have already been reported, but its association with risk of progression and relapse has not been determined yet. Therefore, the main purpose of this study was the evaluation of possible associations of clinicopatological variables, as well as molecular alterations that can predict a worse prognosis for endometrial cancer patients. For this, firstly, clinical and pathological frequencies, disease-free survival (DFS) and overall survival (OS) were studied in a population of 1,132 patients who were diagnosed on "endometrial adenocarcinoma" and underwent surgical treatment from 2000 to 2011. Median age was 63.7 years-old. Type I, low grade and early stage tumors were more frequent. Relapse and death occurred more often in Type II tumors ($p < 0,001$ each). Staging and lymphovascular invasion emerged as independent prognostic factors for recurrence when DFS was assessed by multivariate analysis in all groups, and staging was considered an independent prognostic factor for death when OS was evaluated. Once this data bank was concluded, a microarray analysis was performed in order to identify alterations in gene expression in Type I tumors of patients who present recurrence and who did not. Tumor samples of 21 cases diagnosed in stages I, II and III (11 recurrent tumors; 10 with no relapse) were studied. Sixty two differentially expressed genes were identified by supervised cluster analysis. Three genes were selected (*PGR*, *ESR1* and *GREB1*) for mRNA expression assessment by qPCR and protein expression by immunohistochemistry, in 107 paraffin-embedded tumors. *ESR1* mRNA was up-regulated in recurrent tumors in comparison to those that didn't recurred ($p < 0,0001$). However, there was no significant difference for *PGR* and *GREB1* mRNA expression between both groups. No statistical significant distinction was observed in protein expression of estrogen receptor and progesterone receptor between both groups either, with no association with risk of relapse. *GREB1* mRNA expression was poor, but association between positive protein expression and recurrence absence was significant and induced protection ($p = 0,0196$).

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iv
RESUMO.....	vii
ABSTRACT	viii
SUMÁRIO.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
ÍNDICE DE TABELAS	xiv
ÍNDICE DE QUADROS	xviii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xix
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Epidemiologia.....	1
1.2 Fatores de Risco.....	6
1.2.1 Exposição Contínua e/ou Prolongada ao Estrogênio	6
1.2.2 Obesidade	8
1.2.3 Diabetes, Hipertensão Arterial Sistêmica e Cardiopatia	10
1.2.4 Idade.....	11
1.2.5 Nuliparidade.....	11
1.2.6 Câncer de Mama	12
1.2.7 Hiperplasia de Endométrio.....	12
1.2.8 Fatores Hereditários	13
1.2.9 Fatores Protetores	14
1.3 Aspectos Clínicos e Diagnóstico.....	14
1.3.1 Rastreamento	14
1.3.2 Manifestações Clínicas	15
1.3.3 Métodos para Diagnóstico	16
1.4 Patologia do Câncer de Endométrio	17
1.4.1 Tipos de Adenocarcinoma	17
1.4.2 Graus de Diferenciação Histológica.....	18
1.4.3 Invasão Miometrial.....	19
1.4.4 Padrões de Disseminação	20
1.5 Estadiamento, Prognóstico e Tratamento	21

1.5.1 Estadiamento e Fatores Prognósticos Anátomo-Patológicos	21
1.5.2 Tratamento	24
1.6 Alterações Moleculares	26
1.6.1 Alterações Moleculares e Associação com Tipos Histológicos	26
1.6.2 Outras Alterações Moleculares e Prognóstico	29
2. JUSTIFICATIVA DO PROJETO E OBJETIVOS	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1 Seleção de Pacientes para o Estudo	35
3.2 Coleta de Dados	36
3.3 População de Estudo	36
3.4 Definição das Variáveis de Estudo	39
3.4.1 Desfechos	39
3.4.2 Variáveis independentes e descritivas	39
3.4.3 Variáveis moleculares	44
3.5 Expressão Gênica Global por Análise de Microarranjo	44
3.5.1 Extração de RNA de Tecido Tumoral Fresco Congelado	44
3.5.2 Quantificação e Análise da Integridade do RNA	45
3.5.3 Síntese de cDNA	45
3.5.4 Síntese e Purificação do cRNA	46
3.5.5 Segundo ciclo de síntese de cDNA	47
3.5.6 Fragmentação e Hibridação	47
3.5.7 Leitura dos <i>Chips</i> e Aquisição dos Valores de Expressão	48
3.6 Expressão Gênica por PCR em Tempo Real	49
3.6.1 Extração de RNA de Tecido Tumoral Armazenado em Blocos de Parafina	49
3.6.2 Síntese de cDNA - Reação da Transcriptase Reversa	50
3.6.3 PCR em Tempo Real	51
3.7 Expressão Proteica por Imuno-Histoquímica	54
3.8 Análises Estatísticas	57
4. RESULTADOS ANÁLISES CLÍNICO-PATOLÓGICAS	59
4.1 Frequências da População Geral e por Período	59

4.2	Frequências da População por Subtipo Histológico.....	66
4.3	Sobrevida Livre de Doença – Análise Univariada da População Geral.....	73
4.4	Sobrevida Livre de Doença – Análise Univariada dos Tumores Tipo I	79
4.5	Sobrevida Livre de Doença – Análise Univariada dos Tumores Tipo II	84
4.6	Sobrevida Global – Análise Univariada da População Geral	89
4.7	Sobrevida Global – Análise Univariada dos Tumores Tipo I	94
4.8	Sobrevida Global - Análise Univariada dos Tumores Tipo II.....	99
4.9	Sobrevida Livre de Doença – Regressão de Cox	104
4.10	Sobrevida Global – Regressão de Cox.....	106
5.	RESULTADOS ANÁLISES MOLECULARES.....	109
5.1	Análise Randômica por Microarranjo	109
5.2	Análise de Expressão Gênica por PCR em Tempo Real	117
5.3	Análise de Expressão Proteica por Imuno-Histoquímica	124
6.	DISCUSSÃO	139
7.	CONCLUSÕES	154
8.	REFERÊNCIAS.....	155
9.	ANEXOS	180
9.1	Anexo 1: Carta de Aprovação do CEP	180
9.2	Anexo 2: Ficha Clínica para Levantamento de Dados Clínico-Patológicos....	181
9.3	Anexo 3: Escala de <i>Performance Status</i>	182
9.4	Anexo 4: Protocolo de Silanização de Lâminas para Imuno-Histoquímica	182
9.5	Anexo 5: Tabelas com Genes Discriminantes do “ <i>Status Recidiva</i> ” – Análise Não Supervisionada (n=95)	183
9.6	Anexo 6: Tabelas com Genes Discriminantes do “ <i>Status Recidiva</i> ” – Análise Supervisionada (n=62).....	185
9.7	Anexo 7: Vias Geradas a Partir dos Genes Discriminantes do “ <i>Status Recidiva</i> ” (n=62) – <i>Ingenuity Systems INC</i> [®]	187

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estimativa da incidência mundial de câncer de corpo de útero ajustada por idade por 100.000 mulheres (GLOBOCAN, 2012. IARC).....	1
Figura 2: Estimativa da mortalidade mundial por câncer de corpo de útero ajustada por idade por 100.000 mulheres (GLOBOCAN, 2012. IARC).....	3
Figura 3: Representação espacial das taxas brutas de incidência de câncer de corpo de útero por 100 mil mulheres, estimadas para 2014, segundo as Unidades da Federação (Estimativa 2014, INCA/MS)	5
Figura 4: Fluxograma das pacientes elegíveis para o estudo	38
Figura 5: Curvas de Melting relativas a <i>PGR</i> , <i>ESR1</i> e <i>GREB1</i>	53
Figura 6: Fluxograma representativo da sequência das análises moleculares em amostras de adenocarcinoma Tipo I no Ec I (de <i>PGR</i> , <i>ESR1</i> e <i>GREB1</i>).....	57
Figura 7: Gráfico representativo da frequência dos sítios de segundo tumor primário (n=60).....	61
Figura 8: Curva de sobrevida livre de doença da população geral (n=1.038)	74
Figura 9: Curva de sobrevida livre de doença nos tumores Tipo I (n=912)	79
Figura 10: Curva de sobrevida livre de doença nos tumores Tipo II (n=108)	84
Figura 11: Curva de sobrevida global da população geral (n=1.038)	89
Figura 12: Curva de sobrevida global nos tumores Tipo I (n=912).....	94
Figura 13: Curva de sobrevida global nos tumores Tipo II (n=108).....	99
Figura 14: <i>Heatmap</i> representativo do agrupamento dos casos de adenocarcinoma Tipo I, no estágio I, com e sem recidiva (n=10).....	112
Figura 15: <i>Heatmap</i> representativo do agrupamento dos casos de adenocarcinoma Tipo I, nos estádios I, II e III, com e sem recidiva (n=21).	114
Figura 16: Esquema representativo de via com genes mais expressos nos casos de recidiva de adenocarcinoma Tipo I, no estágio I, e os genes selecionados para validação	116
Figura 17: PCRq de <i>PGR</i> , <i>ESR1</i> e <i>GREB1</i> (normalizados por <i>GAPDH</i>) das amostras de adenocarcinoma Tipo I no Ec I, analisadas por microarranjo (5 casos com recidiva e 5 casos sem recidiva) - n=10.	118
Figura 18: Gráfico da expressão gênica de <i>ESR1</i> por PCRq em amostras de adenocarcinoma Tipo I no estágio I, com recidiva (n=22) e sem recidiva (n=42), relativas a <i>GAPDH</i>	119

Figura 19: Curva ROC representativa da sensibilidade e especificidade da expressão gênica de <i>ESR1</i> por PCRq em amostras de adenocarcinoma Tipo I no Ec I, com recidiva (n=22) e sem recidiva (n=42).	120
Figura 20: Gráfico da expressão gênica de <i>PGR</i> por PCRq em amostras de adenocarcinoma Tipo I no Ec I, com recidiva (n=19) e sem recidiva (n=19), relativas a <i>GAPDH</i>	121
Figura 21: Gráfico da expressão gênica de <i>GREB1</i> por PCRq em amostras de adenocarcinoma Tipo I no Ec I, com recidiva (n=2) e sem recidiva (n=13), relativas a <i>GAPDH</i>	122
Figura 22: Gráfico da expressão gênica de <i>GREB1</i> por PCRq em amostras frescas congeladas de adenocarcinoma Tipo I no Ec I, relativas a <i>GAPDH</i> (n=12)	123
Figura 23: Amostras representativas dos diferentes <i>scores</i> de classificação da expressão proteica do receptor de estrogênio (ER), de acordo com a intensidade de marcação e com o percentual de células marcadas.	127
Figura 24: Amostras representativas dos diferentes <i>scores</i> de classificação da expressão proteica do receptor de progesterona (PR), de acordo com a intensidade de marcação e com o percentual de células marcadas.	128
Figura 25: Classificação da expressão proteica de <i>GREB1</i> , de acordo com o percentual de células com marcação nuclear.	129
Figura 26: Representação gráfica da associação entre expressão de RNAm de <i>PGR</i> e expressão proteica de PR.	138
Figura 27: Representação gráfica da associação entre expressão de RNAm de <i>ESR1</i> e expressão proteica de ER.	138

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Análise descritiva das características clínicas da população ao diagnóstico de câncer de endométrio, por período de matrícula (n=1.132)	60
Tabela 2: Análise descritiva das características relacionadas à história ginecológica da população, por período de matrícula (n=1.132)	62
Tabela 3: Análise descritiva das características relacionadas ao tratamento da população, por período de matrícula (n=1.132)	63
Tabela 4: Análise descritiva das características anátomo-patológicas da população, por período de matrícula (n=1.132)	65
Tabela 5: Análise descritiva dos fatores prognósticos da população, por período de matrícula (n=1.132)	66
Tabela 6: Análise descritiva das características clínicas da população ao diagnóstico de câncer de endométrio, por subtipo histológico (n=1.113)	68
Tabela 7: Análise descritiva das características relacionadas à história ginecológica da população, por subtipo histológico (n=1.113)	69
Tabela 8: - Análise descritiva das características relacionadas ao tratamento da população, por subtipo histológico (n=1.113)	70
Tabela 9: Análise descritiva das características anátomo-patológicas da população, por subtipo histológico (n=1.113)	72
Tabela 10: Análise descritiva dos fatores prognósticos da população, por subtipo histológico (n=1.113)	73
Tabela 11: Análise de Kaplan Meier da sobrevida livre de doença conforme as características clínicas da população geral (n=1.038)	75
Tabela 12: Análise de Kaplan Meier da sobrevida livre de doença conforme as características relacionadas à história ginecológica da população geral (n=1.038) ..	76
Tabela 13: Análise de Kaplan Meier da sobrevida livre de doença conforme características relacionadas ao tratamento da população geral (n=1.038)	77
Tabela 14: Análise de Kaplan Meier da sobrevida livre de doença conforme características anátomo-patológicas da população geral (n=1.038)	78
Tabela 15: Análise de Kaplan Meier da sobrevida livre de doença conforme as características clínicas dos casos de adenocarcinoma Tipo I (n=912)	80
Tabela 16: Análise de Kaplan Meier da sobrevida livre de doença conforme as características relacionadas à história ginecológica dos casos de adenocarcinoma Tipo I (n=912)	81

Tabela 17: Análise de Kaplan Meier da sobrevida livre de doença conforme características relacionadas ao tratamento dos casos de adenocarcinoma Tipo I (n=912).....	82
Tabela 18: Análise de Kaplan Meier da sobrevida livre de doença conforme características anátomo-patológicas dos casos de adenocarcinoma Tipo I (n=912)	83
Tabela 19: Análise de Kaplan Meier da sobrevida livre de doença conforme as características clínicas dos casos de adenocarcinoma Tipo II (n=108).....	85
Tabela 20: Análise de Kaplan Meier da sobrevida livre de doença conforme as características relacionadas à história ginecológica dos casos de adenocarcinoma Tipo II (n=108).....	86
Tabela 21: Análise de Kaplan Meier da sobrevida livre de doença conforme características relacionadas ao tratamento dos casos de adenocarcinoma Tipo II (n=108).....	87
Tabela 22: Análise de Kaplan Meier da sobrevida livre de doença conforme características anátomo-patológicas dos casos de adenocarcinoma Tipo II (n=108)	88
Tabela 23: Análise de Kaplan Meier da sobrevida global conforme as características clínicas da população geral (n=1.038).....	90
Tabela 24: Análise de Kaplan Meier da sobrevida global conforme as características relacionadas à história ginecológica da população geral (n=1.038).....	91
Tabela 25: Análise de Kaplan Meier da sobrevida global conforme características relacionadas ao tratamento e prognóstico da população geral (n=1.038).....	92
Tabela 26: Análise de Kaplan Meier da sobrevida global conforme características anátomo-patológicas da população geral (n=1.038)	93
Tabela 27: Análise de Kaplan Meier da sobrevida global conforme as características clínicas dos casos de adenocarcinoma Tipo I (n=912).....	95
Tabela 28: Análise de Kaplan Meier da sobrevida global conforme as características relacionadas à história ginecológica dos casos de adenocarcinoma Tipo I (n=912)	96
Tabela 29: Análise de Kaplan Meier da sobrevida global conforme características relacionadas ao tratamento e prognóstico dos casos de adenocarcinoma Tipo I (n=912).....	97
Tabela 30: Análise de Kaplan Meier da sobrevida global conforme características anátomo-patológicas dos casos de adenocarcinoma Tipo I (n=912)	98
Tabela 31: Análise de Kaplan Meier da sobrevida global conforme as características clínicas dos casos de adenocarcinoma Tipo II (n=108).....	100

Tabela 32: Análise de Kaplan Meier da sobrevida global conforme as características relacionadas à história ginecológica dos casos de adenocarcinoma Tipo II (n=108)	101
Tabela 33: Análise de Kaplan Meier da sobrevida global conforme características relacionadas ao tratamento e prognóstico dos casos de adenocarcinoma Tipo II (n=108).....	102
Tabela 34: Análise de Kaplan Meier da sobrevida global conforme características anátomo-patológicas dos casos de adenocarcinoma Tipo II (n=108)	103
Tabela 35: Análise da sobrevida livre de doença da população geral – Regressão de Cox (n=1.038)	104
Tabela 36: Análise da sobrevida livre de doença dos casos de adenocarcinoma Tipo I – Regressão de Cox (n=912)	105
Tabela 37: Análise da sobrevida livre de doença dos casos de adenocarcinoma Tipo II – Regressão de Cox (n=108)	106
Tabela 38: Análise da sobrevida global da população geral – Regressão de Cox (n=1.038).....	107
Tabela 39: Análise da sobrevida global dos casos de adenocarcinoma Tipo I – Regressão de Cox (n=912)	108
Tabela 40: Análise da sobrevida global dos casos de adenocarcinoma Tipo II – Regressão de Cox (n=108)	109
Tabela 41: Casos de adenocarcinoma Tipo I, nos Ec I, II e III, com extração de RNA total para a análise de microarranjo (n=21).....	110
Tabela 42: : Genes selecionados pela análise de microarranjo, mais expressos nos casos de recidiva do Ec I em comparação com os casos que não apresentaram recidiva no mesmo estágio.....	115
Tabela 43: Expressão detectada por imuno-histoquímica de ER, PR e GREB1, conforme classificação por área de marcação nuclear, de 107 casos de adenocarcinoma Tipo I no Ec I.....	125
Tabela 44: Expressão detectada por imuno-histoquímica de ER, PR e GREB1, conforme classificação por área de marcação nuclear, nos casos com recidiva (n=35) e sem recidiva (n=72), de adenocarcinoma Tipo I no Ec I.....	126
Tabela 45: Expressão detectada por imuno-histoquímica de PR e ER, conforme classificação por área e intensidade de marcação, dos casos com recidiva (n=35) e sem recidiva (n=72), de adenocarcinoma Tipo I no Ec I	130

Tabela 46: Expressão de ER detectada por imuno-histoquímica, de casos positivos (n=93 – 86,9%) e negativos (n=14 – 13,1%), conforme as características clínicas de adenocarcinoma Tipo I no Ec I.....	131
Tabela 47: Expressão de ER detectada por imuno-histoquímica, de casos positivos (n=93 – 86,9%) e negativos (n=14 – 13,1%), conforme as características anátomo-patológicas de adenocarcinoma Tipo I no Ec I.....	132
Tabela 48: Expressão de PR detectada por imuno-histoquímica, de casos positivos (n=85 – 79,4%) e negativos (n=22 – 20,6%), conforme as características clínicas de adenocarcinoma Tipo I no Ec I.....	133
Tabela 49: Expressão de PR detectada por imuno-histoquímica, de casos positivos (n=85 – 79,4%) e negativos (n=22 – 20,6%), conforme as características anátomo-patológicas de adenocarcinoma Tipo I no Ec I.....	134
Tabela 50: Expressão de GREB1 detectada por imuno-histoquímica, de casos positivos (n=54 – 49,1%) e negativos (n=53 - 48,2%), conforme as características clínicas de adenocarcinoma Tipo I no Ec I.....	135
Tabela 51: Expressão de GREB1 detectada por imuno-histoquímica, de casos positivos (n=54 – 49,1%) e negativos (n=53 - 48,2%), conforme as características anátomo-patológicas de adenocarcinoma Tipo I no Ec I.....	136
Tabela 52: Chance de Recidiva conforme a Expressão de PR, ER e GREB1 detectada por imuno-histoquímica, casos com recidiva (n=35) e sem recidiva (n=72), de adenocarcinoma Tipo I no Ec I.....	137

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1: Características clínico-patológicas dos adenocarcinomas de endométrio Tipos I e II*	18
Quadro 2: Estadiamento do câncer de endométrio segundo critérios da FIGO, 2009	21
Quadro 3: Alterações genéticas e moleculares nos adenocarcinomas Tipos I e II ...	27
Quadro 4: Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores (<i>primers</i>) utilizados na PCRq e tamanho do produto amplificado	52

LISTA DE ABREVIATURAS

ACO - Anticoncepcional oral

ACS - *American Cancer Society*

cDNA – DNA complementar

CUF - Curetagem uterina fracionada

DAB - Diaminobenzidina

DIPAT – Divisão de Patologia do Instituto Nacional de Câncer

DNA - Ácido desoxi-ribonucleico

EDTA - ácido etileno-diamino-tetra-acético

EGF - *Epidermal Growth Factor*

ER – Receptor de estrogênio

ESR1 – Gene que regula o receptor de estrogênio

EUA - Estados Unidos da América

FGF - *Fibroblast Growth Factor*

FIGO – Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia

GDE – genes diferencialmente expressos

GREB1 - *Growth Regulation by Estrogen in Breast Cancer 1*

GOG - *Gynecologic Oncology Group*

HAS - Hipertensão arterial sistêmica

HC II – Hospital de Câncer II

HNPCC - *Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer* (Câncer Colorretal Hereditário sem Polipose)

IARC - *International Agency for Research on Cancer* (Agência Internacional para Pesquisa em Câncer)

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IC- Intervalo de confiança

IGF-1 - *Insulin-like Growth Factor 1*

IH – Imuno-histoquímica

INCA – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva

IMC - Índice de massa corporal

MS – Ministério da Saúde

MSI - Instabilidade de microssatélites (“*microsatellite instability*”)

NCI - *National Cancer Institute*

OMS - Organização Mundial da Saúde

pb - Pares de bases

PCRq - Reação em Cadeia de Polimerase (“*Polymerase Chain Reaction*”) quantitativa (ou PCR em tempo real)

PR – Receptor de progesterona

PGR – Gene regulador do receptor de progesterona

PS - *Performance Status*

RNA - Ácido ribonucleico

RNAm – RNA mensageiro

rpm - Rotações por minuto

SG – Sobrevida global

SLD – Sobrevida livre de doença

SOP - Síndrome dos Ovários Policísticos

ssDNA – *single-stranded DNA* ou DNA de fita simples

SUS – Sistema Único de Saúde

TBS (tampão) – *Tris-Buffered Saline*

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TGF α - *Transforming Growth Factor alpha*

Tris-EDTA - Ácido etileno-diamino-tetra-acético

TRH - Terapia de reposição hormonal

UICC – União Internacional contra o Câncer

USA – *United States of America*

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia

O câncer de endométrio é responsável por mais de 90% dos casos de câncer de corpo de útero (KOSARY, 2007). É considerado a quinta neoplasia maligna mais incidente entre mulheres no mundo, com uma estimativa de 319.605 novos casos e 76.155 óbitos para o ano de 2012, segundo dados da *International Agency for Research on Cancer* (IARC). A maior ocorrência é observada nos países desenvolvidos, mas a incidência vem aumentando também em alguns países em desenvolvimento (figura 1). Aproximadamente 60% dos casos ocorrem em países desenvolvidos, sendo a maior incidência registrada nos Estados Unidos da América (EUA) e Canadá (SEER, 2013).

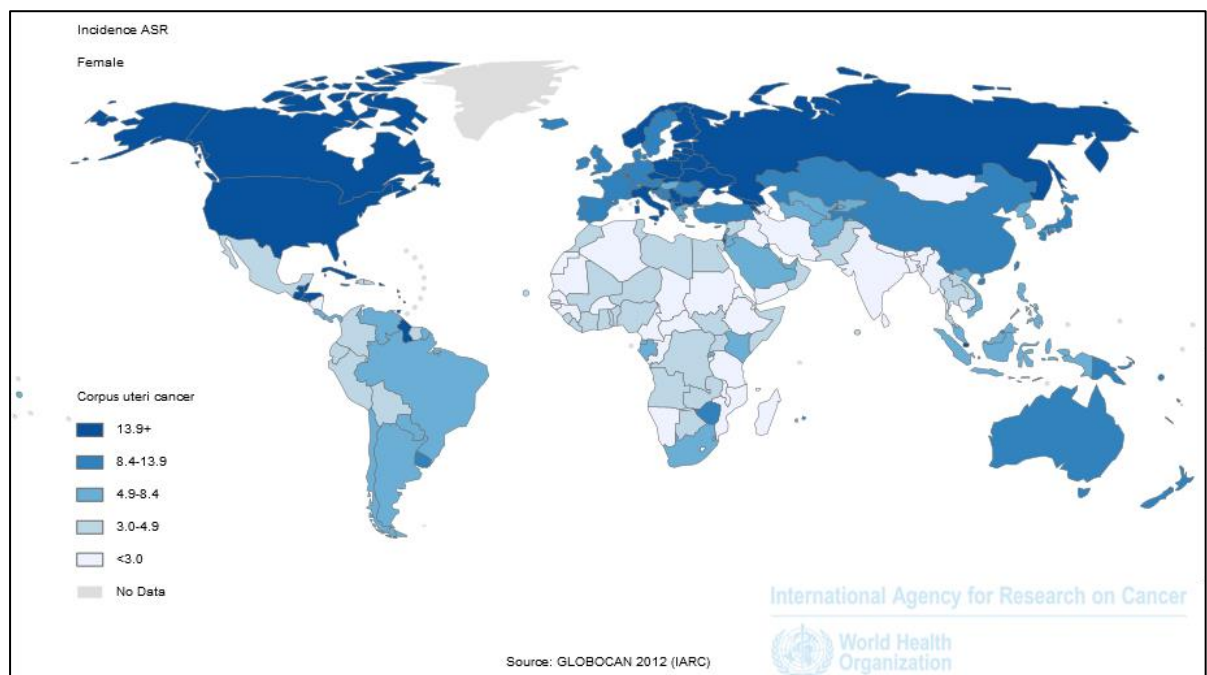


Figura 1: Estimativa da incidência mundial de câncer de corpo de útero ajustada por idade por 100.000 mulheres (GLOBOCAN, 2012. IARC)

O câncer de endométrio é a neoplasia maligna ginecológica mais comum nos EUA, com uma incidência estimada de 24,3/100.000 para o ano de 2010 (SEER, 2013). Esta neoplasia é considerada o quarto tumor mais frequente e a oitava causa de morte entre mulheres naquele país, onde elas têm um risco de 2,69% de desenvolverem a doença ao longo da vida. De acordo com a *American Cancer Society* (ACS), foram estimados 47.130 novos casos e 8.010 óbitos decorrentes da doença para o ano de 2012 (6% de todos os tipos de câncer no sexo feminino). Sua incidência aumentou em 13% de 1987 a 2012, porém a taxa de mortalidade diminuiu em 250% no mesmo período (ACS, 2012). A incidência desta neoplasia nos EUA é maior na raça branca quando comparada às mulheres da raça negra, às hispânicas ou asiáticas, porém a mortalidade é maior nas negras do que nas brancas (7,4/100.000 e 4,0/100.000, respectivamente). A idade média de diagnóstico é de 61 anos e a ocorrência da doença é maior entre 55 e 74 anos (55,2% dos casos) (SEER – NCI, 2010). A sobrevida na doença localizada (ou precoce), na localmente avançada e na metastática é de 96%, 66% e 24%, respectivamente (JEMAL *et al.*, 2009).

Segundo dados epidemiológicos da IARC, a taxa de mortalidade se mantém elevada em grande parte dos países desenvolvidos, mas este aumento também é observado em alguns países em desenvolvimento (IARC, 2012) (figura 2), o que pode estar relacionado à maior frequência de tumores em estádios mais avançados e ao tipo histológico de alto risco (GREER *et al.*, 2009).

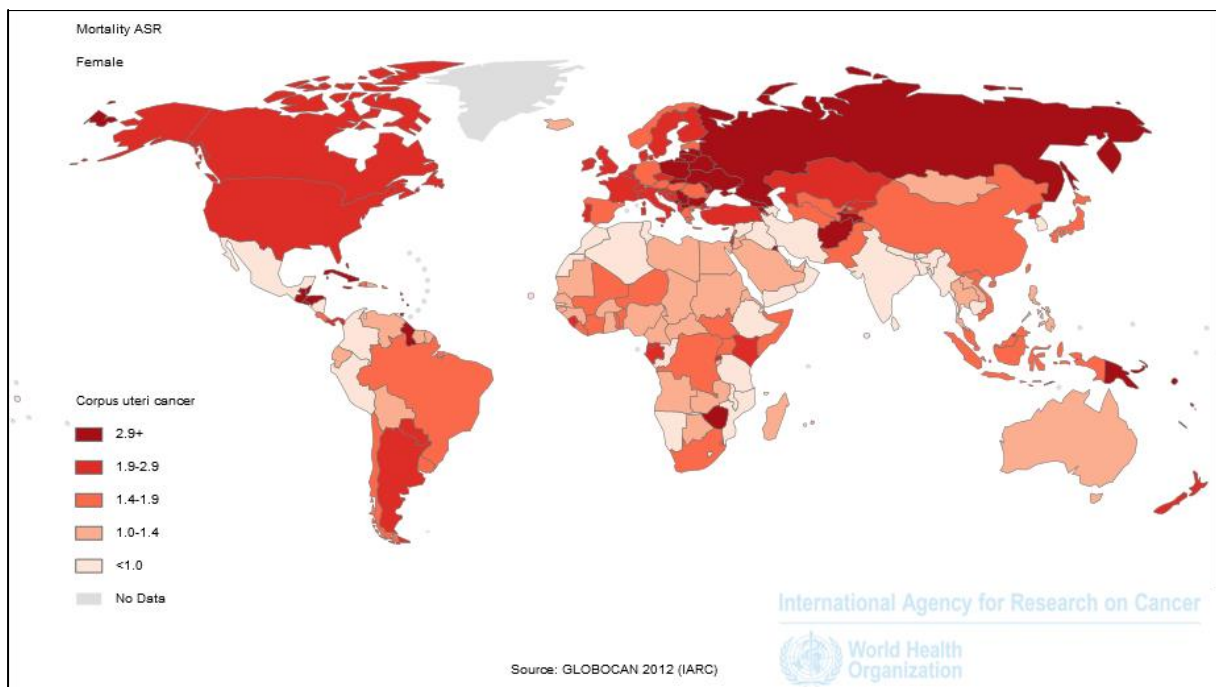


Figura 2: Estimativa da mortalidade mundial por câncer de corpo de útero ajustada por idade por 100.000 mulheres (GLOBOCAN, 2012. IARC)

Até há pouco tempo não eram conhecidos os números precisos de câncer de corpo de útero no Brasil, porém já vinha sendo observado um aumento progressivo da sua frequência devido aos fatores de risco relacionados à doença se encontrarem cada vez mais presentes na nossa população (obesidade, longevidade, menor número de filhos, estrogênio terapia na peri e pós-menopausa, entre outros). Esta mudança fica evidente com a publicação das duas últimas edições da “Estimativa de Câncer no Brasil” pelo Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Para seleção dos sítios primários de câncer a serem estudados, foram seguidos critérios como a magnitude da mortalidade ou da incidência dos mesmos no país. Pela primeira vez, foi descrita a incidência de câncer de corpo de útero no Brasil na “Estimativa 2012” (INCA, MS, 2012).

Para o ano de 2012, haviam sido estimados 260.640 novos casos de câncer em mulheres no Brasil, com previsão de 4.520 novos casos de câncer de corpo de útero e risco estimado de ocorrência de 4 casos a cada 100.000 mulheres, sendo o oitavo tumor maligno mais comum entre mulheres. Os estados com maior incidência esperada foram: São Paulo (1.410 casos), Rio de Janeiro (630), Rio Grande do Sul (360), Minas Gerais (310) e Paraná (300). No Rio de Janeiro, mais da metade dos casos era esperada na capital (380).

Já para o ano de 2014, são estimados 274.230 novos casos de câncer em mulheres no Brasil, sendo previstos 5.900 novos casos de câncer de corpo de útero com risco estimado de ocorrência de 5,79 casos a cada 100.000 mulheres (INCA, MS, 2014). Segundo a nova estimativa, o câncer de corpo de útero passou a ser o sétimo tumor maligno mais comum entre as mulheres brasileiras. Os estados com maior incidência esperada são: São Paulo (1.900 casos), Rio de Janeiro (880), Minas Gerais (420), Rio Grande do Sul (410), Paraná (330) e Pernambuco (290). No Rio de Janeiro, são estimados 390 casos na capital (figura 3).

Ainda segundo a Estimativa 2012, o câncer de corpo de útero, excluindo os tumores de pele “não melanoma”, era o nono mais incidente nas regiões Centro-Oeste (CO) e Nordeste (NE) - 4/100.000 e 3/100.000, respectivamente; o décimo mais incidente nas regiões Sudeste (SE) e Sul (6/100.000 e 5/100.000, respectivamente), e décimo primeiro na região Norte (NO) - 2/100.000 (INCA, MS, 2012). Já para 2014, é previsto que o câncer de corpo de útero, excluindo os tumores de pele “não melanoma”, será o oitavo mais incidente no NE (4/100.000); o sétimo no CO e sexto no SE (5,22/100.000 e 7,58/100.000, respectivamente); o nono nas regiões NO e Sul (2,16/100.000 e 6,30/100.000, respectivamente). Estes dados demonstram que o aumento da incidência desta neoplasia foi observado, sem exceção, em todas as regiões do país quando investigadas separadamente.

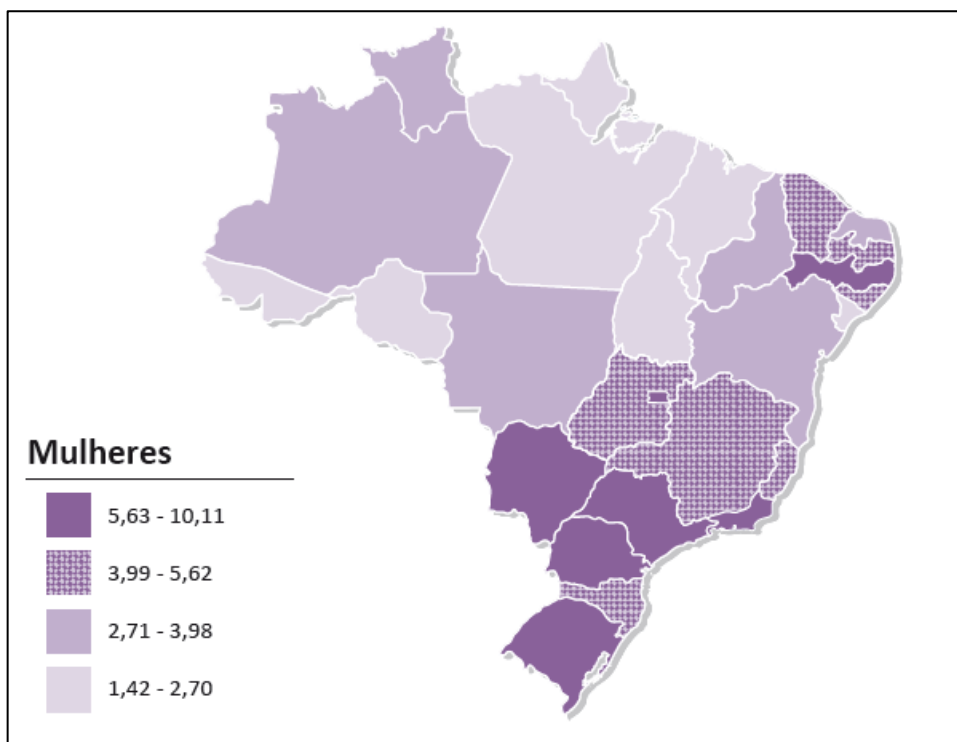


Figura 3: Representação espacial das taxas brutas de incidência de câncer de corpo de útero por 100 mil mulheres, estimadas para 2014, segundo as Unidades da Federação (Estimativa 2014, INCA/MS)

1.2 Fatores de Risco

1.2.1 Exposição Contínua e/ou Prolongada ao Estrogênio

O estrogênio é um hormônio esteróide derivado dos precursores androgênicos androstenediona e testosterona através da aromatização. Em ordem decrescente de potência, os estrógenos são: 17 beta-estradiol (E2), estrona (E1) e estriol (E3). O estradiol é primariamente produzido nos ovários e é a forma predominante encontrada em mulheres em idade reprodutiva e na pré-menopausa. A estrona é a forma predominante de estrogênio circulante na menopausa e deriva tanto do estradiol, através de uma reação reversível, como da conversão periférica de androstenediona secretada pelo córtex da adrenal. O estriol é o metabólito de ambos estradiol e estrona, não sendo secretado pelos ovários. Os estrógenos exercem ação numa série de sistemas, órgãos e tecidos onde promovem respostas fisiológicas, como no fígado, nos ossos, pele, trato gastrointestinal, mama, útero, sistema vascular e encéfalo (GRUBER *et al.*, 2002).

O estrogênio é também reconhecido por desempenhar papel importante no desenvolvimento e progressão do câncer de endométrio. Há algumas décadas já foi demonstrado que, por meio do estímulo contínuo e/ou excessivo deste hormônio sem a contraposição da progesterona, eleva-se o risco de desenvolvimento de hiperplasia e câncer, uma vez que o estrogênio leva à proliferação celular e induz a diferenciação (GREER *et al.*, 2009; JEMAL *et al.*, 2009; .

Diversas situações podem levar as mulheres a uma ação contínua do estrogênio, como:

Estrogênio exógeno: estrogênioterapia na per e pós-menopausa é indicada para redução dos sintomas da menopausa e para manutenção da densidade óssea, porém o tratamento com estrogênio como monoterapia aumenta o risco de desenvolvimento de hiperplasia endometrial e câncer de endométrio. A hiperplasia endometrial pode ser diagnosticada após um ano em 20 a 50% das mulheres que se submeteram a estrogênioterapia sem associação de progesterona (JEMAL *et al.*, 2009). Vários estudos têm demonstrado um aumento na incidência de câncer de endométrio em mulheres que se submeteram a estrogênioterapia, com risco relativo que pode variar de 3,1 a 15 (GREER *et al.*, 2009; INCA, MS, 2010), sendo este

relacionado à dose e ao tempo de duração do tratamento. Se for assumido que o risco absoluto de câncer de endométrio em mulheres na pós-menopausa é de 1 em 1.000, o risco absoluto em mulheres que se submetem à estrogênio-terapia aumenta aproximadamente para 1 em 100 (IBGE, 2010). A administração concomitante de progesterona pode reduzir o risco de desenvolvimento de hiperplasia e câncer de endométrio de forma significativa (AMANT *et al.*, 2005).

Estrogênio endógeno: muitos estudos já demonstraram que o risco maior de mulheres desenvolverem câncer de endométrio na pós-menopausa está associado a níveis elevados de estrogênio e androgênios circulantes que resultam da conversão endógena excessiva de hormônios precursores da adrenal em estrona e estradiol pelas células adiposas (CALLE *et al.*, 2004; LINDEMANN *et al.*, 2008; FADER *et al.*, 2009).

Anovulação crônica: na ausência de função ovariana normal, muitas mulheres com anovulação crônica têm níveis séricos de estrogênio normais devido à conversão periférica de androgênios, porém os ciclos anovulatórios impedem a secreção de progesterona: exemplo clássico é o que ocorre na Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP), presente em cerca de 5-10% das mulheres em idade reprodutiva. Por serem expostas a estímulo estrogênico contínuo do endométrio, estas mulheres têm um risco três vezes maior de desenvolver hiperplasia e câncer de endométrio (HAOULA *et al.*, 2012). A maioria dos casos desta neoplasia em pacientes jovens ocorre naquelas com diagnóstico desta síndrome (HAOULA *et al.*, 2012). Mulheres com SOP que desenvolvem câncer de endométrio apresentam aumento da expressão dos receptores do hormônio luteinizante (LH) e da gonadotrofina coriônica (HCG), sugerindo que o aumento da secreção de LH possa estar envolvido no desenvolvimento do câncer (HARDIMAN *et al.*, 2003). Outra importante observação é que pacientes portadoras de SOP são frequentemente obesas e apresentam resistência à insulina, associada ao aumento de *Insulin-like Growth Factor 1* (IGF-1), condições também relacionadas a um risco maior para a doença (GADDUCCI *et al.*, 2005).

Menarca precoce e menopausa tardia: ambas resultam num estímulo estrogênico prolongado e num maior número de anos de fertilidade, com maior probabilidade de ciclos anovulatórios. Por esta razão, são considerados fatores de risco por alguns autores. Entretanto, a menopausa tardia ainda não é um consenso (BRINTON *et al.*, 1992; McPHERSON *et al.*, 1996).

Tumores secretores de estrogênio: alguns tumores de ovário produzem estrogênio e podem levar ao desenvolvimento de câncer de endométrio. Os tumores de células da granulosa (tumores estromais do cordão sexual) são os que apresentam associação mais provável à doença. A hiperplasia endometrial pode estar presente em 25 a 50% dos casos (SCHUMER *et al.*, 2003) e, quando presente, o câncer de endométrio é bem diferenciado e diagnosticado em estádios iniciais na maior parte dos casos.

Uso de Tamoxifen: é um esteróide sintético que age como modulador seletivo do receptor de estrogênio, o que lhe proporciona tanto uma atividade agonista como antagonista, na dependência do órgão alvo e dos níveis séricos do estrogênio (MOURITS *et al.*, 2001) . No tecido mamário inibe o estímulo estrogênico e, por isto, é indicado como terapia adjuvante em mulheres com câncer de mama precoce, como tratamento para a doença recidivada e para redução da incidência de câncer de mama em mulheres com alto risco. Já no endométrio, o uso da droga estimula a proliferação e, conseqüentemente, aumenta o risco de desenvolvimento de patologias benignas (hiperplasia e pólipos) e de neoplasia maligna (COHEN, 2004; PÉREZ-MEDINA *et al.*, 2011). Neste caso, o desenvolvimento do câncer de endométrio está relacionado à dose e à duração do tratamento (MOURITS *et al.*, 2001; IGNATOV *et al.*, 2010).

1.2.2 Obesidade

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), sobrepeso e obesidade são considerados fatores de risco para o desenvolvimento de várias doenças crônicas, incluindo o câncer. Outrora considerados um problema particular de países desenvolvidos, observa-se agora um aumento dramático da sua prevalência também nos países de baixa e média rendas, sobretudo nas áreas urbanas. Em publicação do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), foi comparada a evolução nutricional da população brasileira em diversas faixas etárias e em quatro diferentes períodos (o último de 2008 a 2009), de acordo com o índice de massa corporal (IMC). Considerando indivíduos com sobrepeso os que têm o $IMC \geq 25$ e $< 30 \text{ kg/m}^2$, e com obesidade aqueles com o $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$, observou-se aumento progressivo na prevalência de ambos desde o primeiro estudo realizado no período de 1974 a 1975, em todas as faixas etárias e em ambos os sexos. A última prevalência de

sobrepeso aferida no período de 2008 a 2009 já atinge aproximadamente metade da nossa população: 50,1% para o sexo masculino e 48% para o feminino. A prevalência de obesidade foi de 12,4% e 16,9%, respectivamente. O estudo concluiu que houve aumento de sobrepeso e obesidade em todas as faixas etárias, classes de renda e regiões, tanto nas áreas urbanas como nas rurais (IBGE, 2010).

Há vários anos os estudos vêm demonstrando que a incidência de câncer de endométrio é maior em mulheres obesas. Esta neoplasia foi a primeira a associar a obesidade como fator de risco. Uma metanálise publicada em 2008, envolvendo 19 trabalhos prospectivos com a inclusão de mais de três milhões de mulheres, demonstrou que cada acréscimo de 5kg/m^2 no IMC leva a um aumento de 1,59 no risco de desenvolver câncer de endométrio (RENEHAN *et al.*, 2008). O IMC elevado também pode estar associado ao desenvolvimento da doença em mulheres com menos de 45 anos: obesas na pré-menopausa, especialmente aquelas com diagnóstico da Síndrome de Ovário Policístico (PELLEGRIN *et al.*, 2005).

As obesas têm altos níveis de estrogênio endógeno devido à conversão de androstenediona para estrona e à aromatização de andrógenos para estradiol que ocorrem no tecido adiposo periférico. Alteração da concentração de IGF-1 e suas proteínas ligantes, e da resistência à insulina (frequentemente presentes em obesas), também podem contribuir para um maior risco de câncer de endométrio (AMANT *et al.*, 2005). Contudo, ao contrário de outras doenças, o risco não está relacionado à distribuição do tecido adiposo (LINDEMANN *et al.*, 2008). Estima-se um risco de três a dez vezes maior de pacientes obesas desenvolverem câncer de endométrio ao longo da vida.

Não são conhecidas as causas, mas o IMC elevado também está associado a um risco maior de óbito pela doença. O risco relativo de óbito por câncer de endométrio para pacientes obesas com IMC entre 30 e 34 kg/m^2 é de 2,53 (CALLE *et al.*, 2004), e com IMC $> 40\text{ kg/m}^2$ é de 6,25 quando comparado a pacientes com IMC normal (FADER *et al.*, 2009). Paradoxalmente, nas mulheres com IMC acima de 40 kg/m^2 , quando comparadas àquelas com menos de 30 kg/m^2 , observa-se maior frequência da doença em estágio inicial (77% versus 61%) e grau de diferenciação histológico menor (44% versus 24%). Também é mais frequente nas obesas o tipo histológico menos agressivo (87% versus 75%) (EVERETT *et al.*, 2003).

1.2.3 Diabetes, Hipertensão Arterial Sistêmica e Cardiopatia

Mulheres com diabetes mellitus e hipertensão arterial sistêmica (HAS) têm maior risco de desenvolver câncer de endométrio. Estes fatores podem estar ligados à obesidade primária, mas há evidências de que estas comorbidades também podem se comportar de forma independente (SHOFF *et al.*, 1998; LUCENTEFORTE *et al.*, 2007), sendo que o risco para desenvolver a doença é maior no diabetes tipo 2 do que no tipo 1 (ZENDEHDEL *et al.*, 2003). Uma dieta rica em carboidratos e associada à hiperinsulinemia, resistência à insulina e elevados níveis de IGF-1 podem exercer papel importante na proliferação do endométrio e consequente desenvolvimento de câncer (FRIBERG *et al.*, 2007; MULHOLLAND *et al.*, 2008; OSÓRIO-COSTA *et al.*, 2009). Também é relatado um aumento dos níveis séricos e no tecido endometrial de outros fatores de crescimento, como *Fibroblast Growth Factor* (FGF), *Epidermal Growth Factor* (EGF) e *Transforming Growth Factor alpha* (TGF α), em pacientes com diabetes e HAS (como nas obesas), o que pode estar relacionado ao desenvolvimento de tumores no endométrio (NAPPI *et al.*, 2009). Além de aumentar o risco de câncer de endométrio, obesidade também aumenta o risco de desenvolvimento de cardiopatias (como a doença coronariana, por exemplo) (KULIE *et al.*, 2011). As doenças cardiovasculares afetam as mulheres com mais frequência e estão associadas a uma maior morbidade em comparação aos homens (WEISS, 2009). Ainda é controverso se esta comorbidade pode ser considerada fator de risco independente para a doença.

Em 2010 foram apresentados os resultados de um estudo sobre a associação de instabilidade de microssatélites no adenocarcinoma de endométrio e o prognóstico em pacientes tratadas no Instituto Nacional de Câncer (INCA). Além das análises moleculares, também foram avaliados os dados clínico-patológicos de 317 pacientes portadoras de adenocarcinoma de endométrio esporádico, tratadas no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2004. Observou-se que aproximadamente 25% das pacientes eram diabéticas e quase 70% eram hipertensas, sendo que mais de 77% tinham sobrepeso ou algum grau de obesidade (CHAVES CBP, 2010).

1.2.4 Idade

O câncer de endométrio ocorre com mais frequência nas mulheres pós-menopausa, com idade média de 61 anos ao diagnóstico (*SEER – NCI, 2010*). Até 25% dos casos são diagnosticados em mulheres na pré-menopausa, sendo que 5 a 10% deles abaixo de 40 anos (*GALLUP et al., 1984*). A probabilidade de uma mulher desenvolver a doença entre o nascimento e a idade de 39 anos é de 0,05% (*AZIM et al. 2007*).

Algumas séries observaram características comuns entre mulheres jovens com câncer de endométrio: obesidade, nuliparidade, hipertensão e diabetes. Neste grupo, são mais frequentes os tumores do tipo histológico endometriode e bem diferenciados (*SOLIMAN et al., 2005; LACHANCE et al., 2006*), e estas pacientes tendem a apresentar um prognóstico melhor do que aquelas com idade mais avançada. As mulheres com tumores de endométrio com idade superior a 63 anos têm a sobrevida global reduzida e maior risco de recidiva após tratamento radioterápico adjuvante (quando indicado), independente de outros fatores prognósticos. O mau prognóstico em pacientes idosas tem sido relacionado a uma maior incidência de tumores mal diferenciados ou subtipos histológicos desfavoráveis. O valor prognóstico da idade ainda é controverso (*UHARCEK et al., 2008*).

1.2.5 Nuliparidade

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que o risco de câncer de endométrio é inversamente proporcional à paridade. A nuliparidade, por si só, não parece aumentar o risco da doença, porém a sua associação pode estar ligada à alta frequência de ciclos anovulatórios em mulheres inférteis. Estima-se que o risco de nulíparas desenvolverem a doença é duas vezes maior (*LOCHEN et al., 1997; PARAZZINI et al., 1998*). Quando a nuliparidade está associada a fatores como obesidade e menopausa tardia, as mulheres acima de 52 anos possuem um risco até cinco vezes maior de desenvolver a doença. Alguns autores sugerem que a sobrevida da doença após cinco anos é menor nas nulíparas que trataram câncer de endométrio do que nas múltiparas, porém esta afirmação ainda é controversa (*UHARCEK et al., 2008*).

1.2.6 Câncer de Mama

História pregressa de câncer de mama constitui um fator de risco para o desenvolvimento de câncer de endométrio, em parte porque ambas neoplasias dividem alguns fatores de risco comuns, como nuliparidade e obesidade. Já foi observado um aumento na frequência de casos de adenocarcinoma de endométrio do tipo histológico seroso papilífero em mulheres que já trataram câncer de mama, em comparação àquelas sem história prévia da doença (HORNREICH *et al.*, 1999; GEHRIG *et al.*, 2004).

Ainda não está claro se a presença de mutação do gene *BRCA1*, envolvida na carcinogênese do câncer de mama hereditário, exerce algum papel no desenvolvimento de câncer de endométrio. Algumas séries retrospectivas não mostraram risco elevado (LEVINE *et al.* 2001), porém outros estudos prospectivos demonstraram um risco elevado significativo em mulheres que possuem a mutação de *BRCA 1* e *BRCA 2* e que estão em uso de tamoxifen (BEINER *et al.*, 2007).

1.2.7 Hiperplasia de Endométrio

Hiperplasia endometrial é caracterizada por uma proliferação anormal das glândulas e do estroma do endométrio, com predominância do componente glandular, que determina aumento do volume e dos diferentes graus de desarranjo arquitetural. Esta proliferação é promovida pela influência dos níveis elevados de estrogênio sem a contraposição da progesterona e pode preceder o câncer de endométrio (EPPLEIN *et al.*, 2008). A classificação atual de hiperplasia é baseada naquela descrita por Kurman *et al.* em 1985, sendo dividida em quatro categorias: simples ou complexa (conforme as características arquiteturais); com ou sem atipias (conforme as características citológicas) (KURMAN *et al.*, 1985).

O desenvolvimento de adenocarcinoma de endométrio a partir de uma hiperplasia simples e de uma hiperplasia complexa sem atipias ocorre em apenas 1% e 3% dos casos, respectivamente. No entanto, a partir de uma hiperplasia com atipias, a ocorrência da doença é maior: 8% das pacientes com hiperplasia simples com atipias e 29% com hiperplasia complexa com atipias poderão desenvolver câncer de endométrio (SKOV *et al.*, 1997; LEE *et al.*, 2011).

1.2.8 Fatores Hereditários

Doenças hereditárias também são consideradas importante fator de risco para o desenvolvimento de determinados tipos de câncer. Quando se trata de câncer de endométrio, a síndrome hereditária mais frequente relacionada à doença é a Síndrome de Lynch ou Câncer Colorretal Hereditário sem Polipose (HNPCC). Relatada pela primeira vez em 1913 por Wartin *et al.* e proposta como “síndrome de câncer familiar” por Lynch e Krush em 1971 (LYNCH *et al.*, 1971), é caracterizada por um grupo de doenças hereditárias com alto risco de câncer colorretal cuja transmissão se dá por herança autossômica dominante, sendo considerada a síndrome de câncer hereditário mais comum nos EUA e na Europa (RESNICK *et al.*, 2009). Em 1993 foi descrito que a doença é herdada através da alteração do grupo de genes de reparo do DNA. A perda de função destes genes (sobretudo de *MLH1*, *MSH2* e *MSH6*) leva à ocorrência de mutações germinativas no DNA, o que desencadeia o processo de carcinogênese da Síndrome de Lynch. Mulheres com HNPCC possuem um risco de 40 a 60% de desenvolverem câncer de endométrio, sendo ele a primeira manifestação da síndrome na maior parte dos casos e a neoplasia mais comum em mulheres com HNPCC (LU *et al.*, 2005). Muitas vezes a doença ocorre em mulheres mais jovens, com média de idade que varia entre 46 a 54 anos à ocasião do diagnóstico. Em revisão feita por Hampel *et al.*, a frequência de Síndrome de Lynch em pacientes com diagnóstico desta neoplasia é de 1,8 a 2,1% (HAMPEL *et al.*, 2006).

Outra síndrome de herança autossômica dominante que pode levar ao desenvolvimento de câncer de endométrio, apesar de menos frequente, é a Síndrome de Cowden. Os portadores desta síndrome apresentam um risco elevado para desenvolvimento de lesões benignas em vários sistemas, mas também para neoplasias malignas. Ela acomete mais mulheres que homens, sendo o câncer de mama o mais frequente (pode ocorrer em até 50% das mulheres com a síndrome). Em seguida, é descrita também a ocorrência de câncer da tireóide (o segundo mais frequente), de endométrio, de rim e colorretal (ENG, 2000). É causada pela presença de mutações deletérias de *PTEN*, sobretudo nos éxons 5, 7 e 8. Estas mutações no gene levam à formação de uma proteína truncada que resulta na redução ou perda da sua função, com conseqüente aumento da proliferação e evasão da apoptose, e desenvolvimento de câncer (ENG, 1998).

1.2.9 Fatores Protetores

Contraceptivos hormonais: uma revisão sistemática de 19 estudos observacionais demonstrou que o uso de anticoncepcionais orais combinados (que associam estrogênio e progesterona) reduz o risco de desenvolvimento de câncer de endométrio em 50% e que o efeito protetor perdurou por 10 a 20 anos após a suspensão da medicação. Tal efeito se deve provavelmente à progesterona que inibe a proliferação endometrial (MUECK *et al.*, 2010).

Atividade física: uma metanálise de nove estudos prospectivos mostrou uma redução significativa na frequência de câncer de endométrio em mulheres que praticam atividade física em comparação às sedentárias. Fatores como redução da obesidade, mudanças favoráveis na função imunológica, alteração nos níveis de hormônios endógenos e dos fatores de crescimento, são mecanismos biológicos que poderiam explicar os efeitos positivos da atividade física na redução do risco da doença (MOORE *et al.*, 2010).

1.3 Aspectos Clínicos e Diagnóstico

1.3.1 Rastreamento

A recomendação para rastreamento populacional ou *screening* para câncer de endométrio em mulheres assintomáticas ainda não está bem estabelecida, uma vez que na grande maioria dos casos a doença apresenta sintomatologia precoce, o que leva ao diagnóstico e tratamento ainda nos estádios iniciais, com consequente prognóstico favorável.

Alguns autores acreditam que a realização do rastreamento para câncer de endométrio ou de seus precursores está justificado em certos grupos considerados de alto risco: mulheres em uso de reposição hormonal exógena com estrogênio sem a associação de progesterona; mulheres que pertencem a famílias com Síndrome de Lynch (HNPCC); e mulheres na pré-menopausa que apresentem ciclos anovulatórios, como na síndrome de ovários policísticos (HACKER *et al.*, 2010). Entretanto, a *American Cancer Society* (ACS) não recomenda o *screening* para câncer de endométrio nestes grupos de alto risco, mas apenas para as mulheres de

famílias com HNPCC, uma vez que apresentam risco de 30 a 60% de desenvolver a doença ao longo da vida (WATSON e LYNCH, 2001). Os métodos mais comumente utilizados são a ultrassonografia transvaginal e a vídeo-histeroscopia ambulatorial com biópsia de endométrio (LÉCURU *et al.*, 2007). Ainda assim, a eficácia do rastreamento nestes casos permanece incerta.

1.3.2 Manifestações Clínicas

O sintoma mais comum do câncer de endométrio é o sangramento vaginal anormal, que ocorre em cerca de 90% dos casos. Em até 10% dos casos o sintoma mais precoce pode ser a leucorréia (ACOG, 2005). Mulheres na pós-menopausa que não usam terapia de reposição hormonal e apresentam sangramento, ainda que de pequena monta, devem ser submetidas à investigação para afastar a possibilidade de câncer de endométrio: em 5 a 20% delas a doença poderá ser diagnosticada e a probabilidade de desenvolvê-la aumenta conforme o número de anos após a menopausa. Mulheres na pré ou peri-menopausa que apresentem algum tipo de sangramento uterino anormal também devem ser investigadas, sobretudo aquelas que possuem outros fatores de risco associados, como história prévia ou familiar de outros tipos de câncer (endométrio, ovário, mama, colorretal), obesidade, uso prolongado de tamoxifen, estrogênio terapia.

A citologia cervical (ou colpocitologia) não é considerada um teste sensível para a doença, pois a presença de células endometriais no “*brushing*” do canal cervical pode ou não denotar um processo patológico (DASH e DOUD, 2001). No entanto, a investigação diagnóstica deve prosseguir sempre que forem detectadas células endometriais na colpocitologia oncótica (CCO) de mulheres na pós-menopausa. Um estudo retrospectivo mostrou uma associação entre a presença de células endometriais encontradas na CCO de mulheres pós-menopausa e a maior frequência de hiperplasia ou câncer de endométrio: tanto hiperplasia como câncer foram diagnosticados em apenas 13,5% das pacientes quando a CCO apresentou células endometriais normais, ao passo que sua frequência foi de 23% quando havia células com atipias e de 77% quando havia células suspeitas (YANCEY *et al.*, 1990).

1.3.3 Métodos para Diagnóstico

Na vigência de sangramento atípico, uma ultrassonografia transvaginal deve ser realizada para identificar possível espessamento do endométrio. Quando a espessura é de 4 a 5 mm em mulheres pós-menopausa, o risco de doença endometrial é pequeno. O risco aumenta à medida em que a mensuração do eco endometrial pela ultrassonografia também se eleva: pode ser observada uma frequência maior do câncer quando a espessura do endométrio nestas mulheres se aproxima de 20 mm (KARLSSON *et al.*,1995). Esta avaliação é menos útil em pacientes pré-menopausa por apresentarem espessamento endometrial fisiológico que varia conforme a fase do ciclo menstrual.

O diagnóstico final da doença é histopatológico. Para tal, deve se obter amostra de tecido tumoral do endométrio por curetagem uterina fracionada (CUF) ou por vídeo-histeroscopia com biópsia do endométrio sob visão direta (exame que permite avaliar as características morfológicas e extensão da lesão na cavidade uterina). É importante lembrar que estas amostras, quando positivas para neoplasia, muitas vezes podem apresentar um grau de diferenciação histológica subestimado: em até 30% dos casos o grau definido no produto da histerectomia (quando da avaliação do tumor em toda a sua extensão no interior do útero) é maior que aquele encontrado nas amostras obtidas por biópsia (FRUMOVITZ *et al.*, 2004).

Uma vez feito o diagnóstico de câncer de endométrio, a paciente deve ser submetida a exames de imagem para estadiamento, como ultrassonografia ou tomografia computadorizada de abdome e pelve (úteis para determinar a extensão de possível doença à distância), ressonância nuclear magnética de pelve (para avaliar invasão miometrial e de paramétrios), e tomografia com emissão de pósitrons (PET) para detectar lesões extra-uterinas (HACKER *et al.*, 2010). Outros exames de rotina completam a lista de preparo pré-operatório para que seja submetida ao tratamento cirúrgico.

Deve-se dispensar especial atenção à presença de eventuais comorbidades (como hipertensão arterial e diabetes), comuns em pacientes portadoras da doença. O controle adequado destas comorbidades no pré-operatório é fundamental para redução dos riscos inerentes ao procedimento cirúrgico.

1.4 Patologia do Câncer de Endométrio

1.4.1 Tipos de Adenocarcinoma

O adenocarcinoma de endométrio é o tipo histológico mais comum, com uma frequência que varia de 80 a 90%. A classificação desta neoplasia em dois tipos histológicos (Tipo I e Tipo II) foi proposta pela primeira vez por Bokhman em 1983 e constitui até hoje um dos fatores mais comumente utilizados para determinação do risco de recorrência (BOKHMAN, 1983).

O adenocarcinoma Tipo I ou endometrióide é o mais frequente (cerca de 80% dos casos) e está associado a um bom prognóstico, a estádios mais precoces da doença ao diagnóstico e a um baixo grau de diferenciação (bem ou moderadamente diferenciado). É o tipo de câncer de endométrio estrógeno-dependente (KELSEY, 1982; THOMA, 1984).

Os adenocarcinomas Tipo II ou não-endometrióides constituem o grupo menos frequente (de 15 a 20% dos casos) e estão associados a um pior prognóstico, a estádios mais avançados da doença ao diagnóstico e ao alto grau de diferenciação histológica (pouco diferenciados). O mais comum deles é o adenocarcinoma seroso papilífero (atualmente chamado de seroso), cujo diagnóstico é feito em aproximadamente 10% das pacientes com adenocarcinoma de endométrio. É seguido pelo adenocarcinoma de células claras (2 a 4% dos casos) (BOKHMAN, 1983). Há ainda outras variações mais raras: adenocarcinoma mucinoso (0,6 a 5%) e carcinoma de células escamosas (0,1 a 0,5%).

Os tumores Tipo I estão relacionados à ação do estrogênio. Geralmente se desenvolvem em mulheres na peri-menopausa e coexistem ou são precedidos por hiperplasia complexa com atipias. Frequentemente cursam com menor taxa de recidiva, caracterizando um melhor prognóstico. Os tumores Tipo II não estão relacionados ao estímulo de estrogênio, surgem ocasionalmente em pólipos endometriais e de lesões pré-malignas que se desenvolvem em um endométrio atrófico. Ocorrem em maior frequência em mulheres mais idosas e geralmente cursam com um prognóstico mais reservado, com maior chance de recorrência (ENGELSEN *et al.*, 2009; MENDIVIL *et al.*, 2009) (quadro 1).

Quadro 1: Características clínico-patológicas dos adenocarcinomas de endométrio Tipos I e II*

Adenocarcinoma Tipo I (80%)	Adenocarcinoma Tipo II (20%)
Endometrióide	Seroso e de células claras
Estrogênio dependente	Não depende de estrogênio
Estádios precoces	Estádios avançados
Baixo grau de diferenciação (G1 e G2)	Alto grau de diferenciação (G3)
Pré e peri-menopausa	Pós-menopausa
Hiperplasia complexa com atipias	Endométrio atrófico
Bom prognóstico	Mau prognóstico

*Adaptado de Mendivil *et al.*, 2009

1.4.2 Graus de Diferenciação Histológica

O adenocarcinoma de endométrio Tipo I pode ser classificado em três diferentes graus de diferenciação: bem, moderadamente ou pouco diferenciado (G1, G2 e G3, respectivamente). Os adenocarcinomas Tipo II são considerados tumores mal diferenciados (G3) em 100% dos casos.

O grau de diferenciação utilizado na avaliação do adenocarcinoma endometrióide de endométrio é baseado na classificação da FIGO e determinado de acordo com a porcentagem de crescimento epitelial sólido presente nos tumores: o tumor é considerado G1 quando apresenta 5% ou menos de padrão de crescimento sólido; G2 quando o padrão de crescimento sólido ocupa de 6 a 50% do tumor; e G3 quando padrão de crescimento sólido ocupa mais de 50% do tumor (KONG *et al.*, 2010).

O grau de diferenciação histológica há muito tem sido considerado um dos indicadores mais sensíveis associados à disseminação da doença. Tanto o *Gynecologic Oncology Group* (GOG) como outros grupos de estudo já demonstraram que, quanto menos diferenciado é o tumor, maior a chance de invasão miometrial e, conseqüentemente, maior a frequência de comprometimento de linfonodos pélvicos e para-aórticos (há uma importante associação entre grau de diferenciação e invasão miometrial). Aproximadamente 50% das lesões G3

apresentam invasão de metade ou mais do miométrio, 30% apresentam metástases para linfonodos pélvicos e 20% para linfonodos para-aórticos (WHARTON *et al.*, 1986; CREASMAN *et al.*, 1987). A sobrevida estimada para os tumores G1 é de 93%, para os tumores G2 é de 85% e para os tumores G3 é de 69% (ZAINO *et al.*, 2009).

1.4.3 Invasão Miometrial

A profundidade de invasão miometrial é definida como a proporção de miométrio infiltrado por tumor, sendo o sistema mais comumente utilizado para sua determinação aquele estabelecido pelos critérios de estadiamento pela FIGO, que divide os tumores em duas categorias: com invasão de menos 50% do miométrio (chamada superficial); com invasão de 50% ou mais do miométrio (chamada profunda) (PECORELLI *et al.*, 2009).

A invasão miometrial é considerada um fator preditivo independente para o prognóstico do câncer de endométrio. A invasão profunda é um dos fatores mais importantes associados à maior probabilidade de disseminação extra-uterina, falha no tratamento e conseqüente recidiva da doença, levando a uma taxa de sobrevida global menor do que aquela nos casos de invasão superficial (BORONOW *et al.*, 1984). Estudo do GOG observou recidiva menos frequente nos casos de ausência ou invasão apenas do terço interno do miométrio (1% e 7,7%, respectivamente), e recidiva mais frequente nos casos de invasão dos terços médio ou externo (14,5% e 15%, respectivamente) (MORROW *et al.*, 1991). Outro estudo do GOG mostrou que a taxa de sobrevida em cinco anos em mais de 400 mulheres submetidas a tratamento de adenocarcinoma endometriode nos estádios I e II diminuiu significativamente quando havia invasão profunda do miométrio: sobrevida de 94% quando não havia invasão de miométrio; 91%, 84% e 59% quando havia invasão de terços interno, médio e externo, respectivamente (ZAINO *et al.*, 1996).

Também já foi estabelecida uma associação importante entre grau de diferenciação histológico, invasão miometrial e disseminação linfonodal, com influência direta no prognóstico da doença. Pacientes com tumores que se estendem por metade ou mais do miométrio tendem a apresentar um prognóstico menos favorável do que aquelas com invasão superficial, uma vez que a frequência de metástases linfonodais é maior no primeiro grupo. Em publicação do GOG de 1987,

Creasman *et al.* avaliaram 621 pacientes com adenocarcinoma Tipo I: quando os tumores G1 eram localizados no terço interno do miométrio, a frequência de linfonodos pélvicos positivos foi menor que 3%, ao passo que na lesões G3 que envolviam o terço externo, a frequência aumentou para 34%; a frequência de linfonodos para-aórticos comprometidos foi de 1% e 23%, respectivamente (CREASMAN *et al.*, 1987).

1.4.4 Padrões de Disseminação

O câncer de endométrio pode ser disseminado por quatro diferentes vias que podem ocorrer de forma isolada ou combinada: contígua (extensão direta a estruturas adjacentes), peritoneal (pela “contaminação” da cavidade abdominal com células neoplásicas, através das trompas de falópio), linfática e hematogênica.

A disseminação contígua é a mais comum e resulta na invasão do tumor para o miométrio e eventualmente para a serosa do útero. Colo uterino, trompas, vagina e paramétrios também podem ser infiltrados. Tumores que se localizam na porção superior do corpo do útero podem se disseminar para as trompas e a serosa com mais frequência; tumores que se desenvolvem no segmento inferior podem se estender para o colo precocemente. O mecanismo de disseminação para o colo ainda não está bem claro, porém algumas séries sugerem a ocorrência de padrões combinados: disseminação contígua pela superfície, invasão de planos profundos e disseminação linfática (BIGELOW *et al.*, 1983).

A presença de células malignas em lavado peritoneal (adotado até a penúltima edição de estadiamento pela Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia - FIGO) e de metástases intra-abdominais sugerem uma disseminação retrógrada de células esfoliativas do tumor para a cavidade abdominal através das trompas.

A disseminação linfática é responsável pelo comprometimento dos linfonodos pélvicos e para-aórticos. É raro o envolvimento de linfonodos para-aórticos na ausência de linfonodos pélvicos positivos. No entanto, é comum a presença de micrometástases para ambos grupos linfonodais, o que pode indicar que esta disseminação ocorre de forma simultânea em alguns casos. As metástases para vagina também parecem estar relacionadas com a disseminação linfovascular: geralmente ocorrem na ausência de comprometimento cervical, o que exclui a

disseminação contígua como provável mecanismo. A associação de tumores G3 (mal diferenciados) com a presença de invasão linfovascular pode ser importante fator determinante para recidiva vaginal (MARIANI *et al.*, 2005).

A disseminação hematogênica é a menos frequente. Quando ocorre, os sítios de metástases mais comuns são fígado, pulmão, encéfalo e ossos (HACKER *et al.*, 2010).

1.5 Estadiamento, Prognóstico e Tratamento

1.5.1 Estadiamento e Fatores Prognósticos Anátomo-Patológicos

O estadiamento final da doença é cirúrgico. Os critérios segundo a FIGO, reeditados pela última vez em 2009, determinam a indicação ou não de adjuvância e são importantes para avaliação do prognóstico (PECORELLI, 2009) (quadro 2).

Quadro 2: Estadiamento do câncer de endométrio segundo critérios da FIGO, 2009

ESTADIAMENTO – FIGO 2009	
I	Tumor confinado ao corpo uterino
IA	Tumor restrito ao endométrio ou com invasão menor que a ½ do miométrio
IB	Tumor com invasão igual ou maior que a ½ do miométrio
II	Tumor que invade o colo, mas não se estende além do útero
II	Tumor invade estroma cervical, mas sem extensão além do útero
III	Disseminação local e/ou regional
IIIA	Tumor que compromete a serosa e/ou anexos
IIIB	Comprometimento vaginal e/ou de paramétrios
IIIC1	Metástases para linfonodos pélvicos
IIIC2	Metástases para linfonodos para-aórticos
IV	Lesão à distância
IVA	Tumor que invade a mucosa vesical e/ou intestinal
IVB	Metástase à distância, incluindo metástases intra-abdominais e/ou linfonodos inguinais

Segundo o GOG, os fatores prognósticos são utilizados para categorizar as pacientes em diferentes grupos de risco para ocorrência de recidiva e orientar quanto à indicação de tratamento adjuvante. A associação do tipo histológico e estadiamento definidos após o tratamento cirúrgico estabelece quatro grupos distintos de pacientes portadoras de câncer de endométrio:

Baixo risco: tumores no estágio IA, G1 ou G2 (adaptado para FIGO 2009).

Risco intermediário: tumores nos estádios IA G3; IB ou II, de qualquer grau de diferenciação (adaptado para FIGO 2009).

Risco intermediário alto: baseado na idade e na presença de pelo menos um dos três fatores patológicos: invasão miometrial profunda; G2 ou G3; presença de invasão linfovascular.

Alto risco: tumores no estágio III ou diagnóstico de adenocarcinoma Tipo II.

Como já mencionado, fatores como tipo histológico, grau de diferenciação e invasão miometrial estão fortemente associados ao prognóstico do câncer de endométrio. Outras alterações anátomo-patológicas, relacionadas ou não ao estadiamento final pela FIGO, exercem uma influência direta na sobrevida livre de doença e na sobrevida global das pacientes portadoras de câncer de endométrio.

A presença de metástases linfonodais constitui um importante fator prognóstico e pode estar presente em até 10% dos casos em que a doença se encontra aparentemente confinada no corpo do útero (MAY *et al.*, 2007). Creasman *et al.* observaram uma sobrevida de 57% nos casos de estágio (Ec) IIIC, enquanto nas pacientes diagnosticadas nos Ec I e II (sem disseminação nodal) foi de 91% e 74%, respectivamente (CREASMAN *et al.*, 2006). A localização da doença nodal também influencia a sobrevida: numa série de 85 pacientes diagnosticadas no Ec III, Hoekstra *et al.* registraram sobrevida global em cinco anos de 61%. Nas pacientes que apresentaram disseminação nodal pélvica apenas, a sobrevida foi de 70%; daquelas com metástase para-aórtica, somente 49% se encontravam vivas após este período (HOEKSTRA *et al.*, 2008).

Invasão do espaço linfovascular é considerada outro fator independente para recorrência e óbito em todos os tipos histológicos. Vários autores descreveram uma diferença estatisticamente significativa na frequência de recidiva e óbito em pacientes diagnosticados no estágio I que apresentaram êmbolos neoplásicos em

comparação com os casos em que não havia êmbolos (COHN *et al.*, 2002; MARIANI *et al.*, 2005). A incidência de invasão linfovascular no Ec I do câncer de endométrio é de aproximadamente 15%, e aumenta conforme o padrão de invasão miometrial e a piora do grau de diferenciação histológica. Watari *et al.* também observaram que a invasão linfovascular e o número de linfonodos para-aórticos positivos foram fatores prognósticos independentes para pacientes com Ec IIIC (WATARI *et al.*, 2005). Estes autores encontraram diferença de sobrevida em cinco anos estatisticamente significativa entre pacientes com linfonodos retroperitoneais positivos com invasão linfovascular e sem invasão linfovascular (50,9% e 93,3%, respectivamente). Também foi significativa a diferença na sobrevida conforme o número de linfonodos para-aórticos positivos (1 *versus* 2 ou mais positivos).

O tamanho do tumor primário (> 2,0 cm), segundo alguns autores, também está relacionado a um maior risco de recidiva da doença, tanto em casos que foram diagnosticados em estádios precoces como naqueles em estádios mais avançados (MARIANI *et al.*, 2002; MARIANI *et al.*, 2003).

A presença de doença residual, seja microscópica (cirurgia R1), seja macroscópica (cirurgia R2), também determina uma sobrevida menor em comparação às pacientes que não apresentam doença residual ao término da cirurgia (Cirurgia R0). Randall *et al.* estudaram os efeitos de tratamento paliativo em pacientes nos estádios IIIC e IV, e concluíram que o Ec IV com disseminação peritoneal residual é um preditor independente de menor sobrevida global (RANDALL *et al.*, 2006).

O *status* dos receptores hormonais (de estrogênio e progesterona) também é considerado indicador independente de prognóstico. Vários autores sugerem que pacientes cujo tumor é positivo para um ou ambos receptores apresentam uma sobrevida maior do que aquelas com tumores receptores-negativos, mesmo quando se tratam de casos com linfonodos positivos (LIAO *et al.*, 1986; EHRLICH *et al.*, 1988).

Aproximadamente 75% dos casos são diagnosticados quando o tumor ainda está confinado ao corpo do útero. Embora muitas destas mulheres alcancem a cura com tratamento cirúrgico apenas, é observada a ocorrência de recidiva em pacientes que não apresentavam sinais de doença localmente avançada ou metastática na ocasião do tratamento primário, e que podem ou não evoluir com uma resposta

limitada ao tratamento desta recorrência. A frequência de recidiva pode variar de 6 a 32% na dependência de fatores anátomo-patológicos associados, como estadiamento final, grau de diferenciação e invasão miometrial. Em estudo realizado pelo GOG com pacientes nos Ec I e II, foi diagnosticada recidiva após dois anos de seguimento em 6% das pacientes do grupo de baixo risco e 12% nas de risco intermediário. Nas pacientes de alto risco a recidiva foi de 13% a 27% (com e sem adjuvância, respectivamente) (CREUTZBERG, 2004). Num estudo com 1.166 pacientes, Ortoft *et al.* observaram uma frequência de 6,3% de recidiva nos casos de baixo risco e 22% nos de intermediário (ORTOFT *et al.*, 2013). Scotti *et al.* fizeram uma análise retrospectiva de 883 pacientes que trataram câncer de endométrio nos Ec I e II e a frequência de recidiva foi de 10,6% (SCOTTI *et al.*, 2010). Apesar de um maior risco de recidiva estar associado aos casos considerados de alto risco, um estudo retrospectivo multi-institucional observou que a frequência de recorrência local (cúpula vaginal) foi maior no Ec IA que no IB (81% e 19%, respectivamente), bem como nos tumores de baixo grau (75% em G1 e G2; 25% nos tumores G3) (HUH *et al.*, 2007).

1.5.2 Tratamento

O principal tratamento do câncer de endométrio é cirúrgico. É descrita uma alta taxa de operabilidade para as pacientes (até próximo de 90%) (MARZIALE *et al.*, 1989), já que a maioria dos casos é diagnosticada nos estádios iniciais: 71% são do Ec I; 12,2% Ec II; 13,5% Ec III; 3,2% Ec IV (CREASMAN *et al.*, 2006).

Para que o estadiamento da FIGO seja preciso, a cirurgia completa para casos de adenocarcinoma do Tipo I se baseia, de modo geral, em histerectomia total com salpingo-ooforectomia bilateral, linfadenectomia pélvica bilateral e ressecção de amostras de linfonodos para-aórticos (HACKER e FRIEDLANDER, 2010). Após a retirada do útero, o mesmo é seccionado pelo médico patologista presente no centro cirúrgico para uma observação inicial das características *in loco* do tumor: avaliam-se as dimensões da lesão e a extensão da invasão miometrial. Entretanto, o estadiamento é estabelecido após o exame histopatológico final.

Para os casos de adenocarcinoma Tipo II (não endometrioides), deve se proceder também à omentectomia (ressecção do grande omento) e biópsias do peritônio parietal, visto que os tumores deste grupo tendem a apresentar uma

disseminação celômica, similar àquela apresentada pelos tumores malignos de ovário.

Muitas vezes não é possível realizar a cirurgia completa devido à dificuldade técnica imposta pela obesidade ou pelas comorbidades que elevam o risco de complicações no per-operatório e no pós-operatório imediato, sendo realizado o procedimento mais seguro para cada caso. Aquelas pacientes que se encontram no Ec I ou II, e que tiveram o tratamento cirúrgico contra indicado pelo risco cirúrgico elevado pelas comorbidades associadas, são submetidas a radioterapia e braquiterapia exclusivas (FISHMAN *et al.*, 1996). Uma segunda alternativa para estes casos seria a histerectomia vaginal, porém as limitações do método para a exploração da cavidade abdominal, realização de salpingo-ooforectomia bilateral e linfadenectomia o caracterizam como um tratamento cirúrgico incompleto (BLOSS *et al.*, 1991). As pacientes diagnosticadas no Ec III ou IV em igual situação serão submetidas a tratamento sistêmico (quimioterapia) na dependência de suas condições clínicas, porém neste caso o prognóstico é mais reservado.

Radioterapia e/ou quimioterapia adjuvantes poderão ser associadas conforme o tipo histológico, grau de diferenciação do tumor e os critérios de estadiamento pela FIGO, de acordo com o risco de recidiva que cada um destes fatores determina. Segundo o GOG, não é indicada adjuvância para as pacientes que pertencem ao grupo considerado de “baixo risco” de recidiva. Radioterapia externa adjuvante é indicada naquelas consideradas de “risco intermediário” ou de risco “intermediário-alto” (KEYS *et al.*, 2004; JOHNSON *et al.*, 2007). Habitualmente a braquiterapia vaginal é associada à radioterapia externa no intuito de reduzir o risco de recidiva na cúpula vaginal.

O tratamento adjuvante com quimioterapia está indicado em pacientes com Ec III, sobretudo quando há linfonodos positivos (IIIC 1 ou 2), ou as diagnosticadas de adenocarcinoma Tipo II (“alto risco” para recidiva) (HACKER *et al.*, 2010). As drogas mais utilizadas são os compostos de platina e taxanos.

As recidivas podem ser tratadas com cirurgia, radioterapia e quimioterapia, de forma isolada ou combinada, de acordo com o sítio onde a mesma se manifestou. A pesquisa de receptores hormonais também pode auxiliar no tratamento paliativo destas pacientes: os casos de recidiva de tumores com receptores de estrogênio e progesterona positivos podem ser submetidos a tratamento paliativo com

hormonioterapia à base de acetato de megestrol (derivado progestágeno) associado ou não a Tamoxifen (MARKMAN, 2005; SINGH *et al.*, 2007).

1.6 Alterações Moleculares

1.6.1 Alterações Moleculares e Associação com Tipos Histológicos

A identificação e compreensão da biologia molecular e genética do câncer de endométrio são fundamentais para melhor entendimento da evolução da doença e para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

Várias alterações moleculares estão envolvidas na carcinogênese endometrial. Quando a histologia e o grau de diferenciação são considerados, torna-se evidente que algumas destas alterações moleculares são características dos subgrupos definidos de adenocarcinoma de endométrio. Algumas delas, como instabilidade de microssatélites (MSI) e mutações em *PTEN*, *K-RAS*, *PIK3CA* e *β-catenina*, já foram descritas como frequentes nos tumores Tipo I e definem a progressão de endométrio normal para hiperplasia, neoplasia intra-epitelial e lesão invasiva. Já os tumores Tipo II se desenvolvem a partir de um endométrio atrófico e podem apresentar alterações em *TP53* e *Her-2/neu*, perda de heterozigosidade em vários cromossomos, entre outras (LLOBET *et al.*, 2009). A frequência percentual destas alterações está resumida no quadro 3.

Quadro 3: Alterações genéticas e moleculares nos adenocarcinomas Tipos I e II

Alteração Genética	Tumores Tipo I (%)	Tumores Tipo II (%)
Inativação de <i>PTEN</i>	50-80	10
Mutação de <i>K-RAS</i>	15-30	0-5
MSI	20-40	0-5
Mutação de <i>β-Catenina</i>	20-40	0-3
Mutação de <i>TP53</i>	10-20	80-90
↑ <i>Her-2/neu</i>	10-30	40-80
Inativação de <i>p16</i>	10	40
Inativação de <i>E-caderina</i>	10-20	60-90

Adaptado de Bansal *et al.*, 2009; e Llobet *et al.*, 2009

Alterações Moleculares no adenocarcinoma endometriode ou Tipo I:

A alteração genética mais frequente ocorre no gene ***PTEN***. Alterações neste gene que codifica uma proteína com função tirosino-quinase (*phosphatase and tensin homolog* - *PTEN*) e que se comporta como supressor de tumor, podem ser encontradas em até 83% dos tumores Tipo I e em 55% das lesões pré-malignas (MUTTER *et al.*, 2000). Sua inativação é causada por mutações que levam à perda de expressão e, em menor frequência, à perda de heterozigosidade (na maior parte dos casos as mutações do tipo *missense*, deleções e inserções em *PTEN* levam à formação de uma proteína truncada). Alguns autores sugerem que a presença de mutação neste gene pode ser um importante indicador independente de prognóstico da doença (MINAGUCHI *et al.*, 2001). ***PIK3CA*** codifica uma subunidade catalítica de PI3K e, assim, mutações neste gene contribuem para alteração na via PI3K/AKT. Foram inicialmente descritas por Oda *et al.* com uma frequência de 36% nos casos de tumores Tipo I e coexistem frequentemente com mutações em *PTEN* (ODA *et al.*, 2005).

A instabilidade de microssatélites (**MSI**) foi descrita pela primeira vez na Síndrome de Lynch (ou câncer colorretal hereditário sem polipose – HNPCC). É caracterizada por uma mudança nestas pequenas sequências repetitivas do genoma (por deleção ou inserção de pares bases) decorrente de uma deficiência no sistema de reparo do DNA do tipo *mismatch* (MMR), seja de origem genética ou epigenética, afetando as proteínas envolvidas nesta atividade: MLH1, MSH2, MSH6, e PMS2. MSI pode estar presente em até 75% dos casos de câncer de endométrio

relacionados à Síndrome de Lynch (PLACK *et al.*, 2002). No câncer de endométrio esporádico, a MSI é causada por inativação epigenética do gene de reparo *hMLH1* através da hipermetilação do seu promotor e a sua frequência varia de 20 a 32%, podendo chegar a 45% em algumas séries (ESTELLER *et al.*, 1998; MURESU *et al.*, 2002; AN *et al.*, 2007). A relação entre presença de MSI e prognóstico no câncer de endométrio esporádico ainda é controversa: já foi relatada a associação a um bom prognóstico (MAXWELL *et al.* 2001), a mau prognóstico (AN *et al.*, 2007), ou mesmo não foi demonstrada qualquer associação (HAITHAM *et al.*, 2009). Num estudo de 2010 que avaliou pacientes tratadas no INCA, a presença de MSI foi considerada fator de bom prognóstico na regressão de Cox para sobrevida global (CHAVES, 2010). Por ser encontrada também em lesões pré-malignas, a MSI também é considerada um evento precoce na carcinogênese endometrial.

A via de sinalização RAS-RAF-MEK-ERK também exerce importante papel na tumorigênese desta doença. Mutações em **K-RAS** têm sido identificadas em 10 a 30% dos tumores deste grupo (LAX *et al.*, 2000) e muitos estudos já têm demonstrado uma alta frequência destas mutações associadas à presença de MSI.

β -catenina é um componente da unidade proteica E-caderina, essencial para a diferenciação celular e manutenção da arquitetura tecidual normal, com papel importante na transdução de sinais. Mutações em **β -catenina** (*CTNNB1*) causando um ganho de função podem ser encontradas em 25 a 38% dos tumores Tipo I e resultam numa estabilização da proteína que resiste à degradação, com conseqüente acúmulo no citoplasma e no núcleo (LAX *et al.*, 2000). Entretanto, a exata função desta proteína na carcinogênese endometrial ainda é desconhecida (DOLL *et al.*, 2008). Alterações em *PTEN*, MSI e mutações em *K-RAS* frequentemente coexistem entre si; ao contrário, mutações em **β -catenina** geralmente ocorrem de forma isolada (SAEGUSA *et al.*, 2001).

Alterações Moleculares nos adenocarcinomas não-endometrioides ou Tipo II:

A alteração genética mais comum ocorre no gene supressor de tumor **TP53**. Mutações neste gene estão presentes em aproximadamente 90% destes tumores, porém não é conhecido ainda o exato mecanismo que as causam. Nos adenocarcinomas Tipo I, estão presentes apenas em 10 a 20% dos casos e, na sua maioria, em tumores pouco diferenciados (grau 3) (LAX *et al.*, 2000). Mutações em *TP53* também estão presentes em até 80% dos carcinomas intra-epiteliais do

endométrio, considerados lesões precursoras dos tumores serosos. O gene supressor de tumor **CDKN2A** codifica a proteína p16 reguladora do ciclo celular e sua inativação pode ser encontrada em até 45% dos tumores serosos e em alguns casos de adenocarcinoma de células claras. O oncogene **Her2/neu** (*Human Epidermal growth factor Receptor – type 2*) codifica um receptor transmembrana tirosino-quinase envolvido na sinalização celular. A amplificação e a super-expressão deste gene já foram encontradas em 45% e 70% dos adenocarcinomas serosos, respectivamente. Ambas alterações levam a um crescimento celular sem controle, o que pode desencadear o desenvolvimento da doença (LAX *et al.*, 2000; LLOBET *et al.*, 2009). E-caderina é uma proteína transmembrana relacionada a adesão celular. Redução ou inibição da expressão de **E-caderina** estão presentes em 62% e 87% dos tumores serosos e de células claras, respectivamente. Tumores **E-caderina** negativos estão associados a um mau prognóstico (BANSAL *et al.*, 2009).

1.6.2 Outras Alterações Moleculares e Prognóstico

Ainda não estão claras as implicações clínicas de muitos destes marcadores. Contudo, outras alterações moleculares já têm sido descritas como importantes fatores prognósticos no câncer de endométrio.

Aneuploidia está presente em aproximadamente 25% dos tumores de endométrio e está relacionada a um aumento significativo do risco de recidiva precoce e óbito pela doença (SUSINI *et al.*, 2007). Para o GOG, o risco relativo de óbito relacionado à doença em pacientes com tumores com aneuploidia é estimado em 4,1 em comparação àquelas em que o tumor é diploide (ZAINO *et al.*, 1998).

A expressão das proteínas **ETV5 e RUNX1** (ambas fatores de transcrição) já foi associada à invasão miometrial, considerada importante fator determinante da invasão no câncer de endométrio e conseqüente risco de recidiva. Alguns autores sugerem que a expressão de ambas está relacionada às etapas iniciais de infiltração miometrial nos tumores tipo I (PLANAGUMÀ *et al.*, 2004 e 2005; MONGE *et al.*, 2007). Em estudo recente no INCA, foi demonstrado que a expressão gênica e proteica de ERM/ETV5 e a expressão proteica de RUNX1/AML1 são características comuns às etapas precoces de carcinogênese dos tumores Tipo I (SOUSA VPL *et al.*, 2014).

O conhecimento destas e de outras alterações moleculares, e da sua relação com as características clínico-patológicas e o prognóstico do câncer de endométrio, é fundamental para que sejam melhor identificados grupos de risco e sejam desenvolvidas novas estratégias terapêuticas. Existem várias técnicas experimentais que auxiliam na identificação e validação destas alterações nos diversos tipos de câncer, sendo uma delas a análise randômica por microarranjo de DNA. Esta análise foi descrita pela primeira vez nos anos 1990 como um método de investigação simultânea de milhares de genes, com o propósito inicial de comparar duas classes biológicas e identificar a expressão diferencial de genes com potencial relevância biológica entre elas, como aqueles associados à progressão tumoral (DeRISI *et al.*, 1996). Com isto, a técnica passou a ser empregada também para identificação de biomarcadores associados a várias doenças (incluindo o câncer), para classificação dos diversos tipos de tumores e para prever o prognóstico e a resposta ao tratamento (GOLUB *et al.*, 1999; VAN 'T VEER *et al.*, 2002).

Até o momento poucos estudos foram publicados com análise de microarranjo de DNA no câncer de endométrio, sendo a maioria direcionada apenas à definição do padrão de expressão nos diferentes subtipos histológicos (I e II) ou à caracterização do perfil de expressão dos tumores Tipo I, todos sugerindo que os perfis de expressão ora descritos pudessem identificar no futuro biomarcadores úteis para a evolução e tratamento da doença. O primeiro grupo a determinar o perfil de expressão gênica entre os subtipos de adenocarcinoma de endométrio foi **Risinger *et al.***, em 2003. Os autores compararam a expressão entre 19 casos de tumores Tipo I, 16 Tipo II e 7 amostras de endométrio normal. Foram encontrados 191 genes diferencialmente expressos (GDE), porém apenas 24 transcritos distinguiram os tumores Tipo I dos adenocarcinomas serosos (RISINGER *et al.*, 2003). **Cao *et al.*** também compararam a expressão entre amostras de tumores Tipo I (n=10) e tumores Tipo II (n=8), sendo identificados 315 genes que diferenciavam de forma estatisticamente significativa os dois subtipos, porém sem associação a qualquer outro fator relacionado a prognóstico (CAO *et al.*, 2004). **Maxwell *et al.*** incluíram amostras de carcinosarcoma de corpo de útero na análise de microarranjo, observando mais uma vez um perfil de expressão característico destes tumores em comparação aos tumores epiteliais de ambos subtipos (MAXWELL *et al.*, 2005). **Saghir *et al.*** analisaram amostras pareadas de tumor com endométrio normal adjacente de 30 casos de adenocarcinoma Tipo I e identificaram 621 GDE. Dentre os super-expressos foram identificados *ErbB3*, *ErbB4* e o fator 3 E74-like (ELF3);

dentre os pouco expressos foram *STAT5b*, fator de crescimento transformador A receptor III (*TGFA3*), caveolina 1(*CAV1*), e proteína quinase C alpha (*PKCA*). Os resultados foram validados por PCRq (SAGHIR *et al.*, 2010). **Alves *et al.*** analisaram 10 amostras pareadas de tumores Tipo I com endométrio normal adjacente utilizando uma plataforma de microarranjo com apenas 2.000 genes e identificaram, entre vários GDE, o oncogene *MAP3K8* como super-expresso nos tumores. A validação por PCR semi-quantitativa mostrou que este gene se encontrava super-expresso nos tumores em 30% dos amostras. Entretanto, não foi feita nenhuma associação com dados clínico-patológicos e de sobrevida, assim como nos outros trabalhos citados (ALVES *et al.*, 2006).

Alguns poucos estudos associaram o perfil de expressão gênica encontrado nos tumores de endométrio a fatores prognósticos. **Miyamoto *et al.*** analisaram 10 amostras pareadas de tumores Tipo I e identificaram 51 genes super-expressos e 23 sub-expressos no epitélio endometrial tumoral em comparação ao endométrio normal adjacente. *Lipocalina 2 (LCN2)* apresentou a maior magnitude de expressão do seu RNAm nos tumores e a análise da expressão proteica por imunohistoquímica mostrou aumento na expressão tanto na hiperplasia como na neoplasia. Neste estudo foi observada uma piora significativa na sobrevida cumulativa das pacientes que apresentaram a expressão proteica elevada de LCN2, associando-a a mau prognóstico. Entretanto, não foi realizada validação da expressão gênica em número maior de amostras (MIYAMOTO *et al.*, 2010). **Bidus *et al.*** publicaram em 2006 uma análise de microarranjo comparando os GDE entre as pacientes que tiveram metástase linfonodal e as que não apresentaram doença linfonodal. A análise supervisionada indicou que 450 genes foram diferencialmente expressos entre os dois grupos, e a diferença foi estatisticamente significativa. Dentre os genes super-expressos, foram identificados *CDC2* e *MAD2L1*, responsáveis por pontos de checagem do ciclo celular, e que já foram associados anteriormente à presença de metástase linfonodal em outros tipos de câncer (BIDUS *et al.*, 2006). O perfil de expressão gênica de 10 amostras de adenocarcinomas do Tipo I e 10 do Tipo II foi analisado por **Mhaweck-Fauceglia *et al.***, com o objetivo de identificar os GDE num grupo de “estádios precoces” e outro de “estádios avançados” da doença em ambos subtipos histológicos. Os autores também fizeram uma análise paralela entre os GDE de cada grupo e os casos de bom e de mau prognóstico. Contudo, não foram mencionados os critérios que determinaram o prognóstico de cada caso para a separação dos grupos, e nem foram feitas análises

de cada subtipo histológico e seus respectivos estádios em separado (MHAWECH-FAUCEGLIA *et al.*, 2010). Mannelqvist *et al.* realizaram análise de microarranjo avaliando o perfil de expressão conforme o *status* de invasão vascular em 57 amostras de adenocarcinoma de endométrio primário (35 sem invasão vascular, 22 com invasão). Quando os GDE que caracterizaram invasão vascular (7 super-expressos e 11 sub-expressos) foram associados à sobrevida, só foi observada associação significativa na análise univariada. Na análise multivariada, a assinatura de invasão vascular não alcançou importância prognóstica independente (MANNELQVIST *et al.*, 2011).

Embora todos os estudos acima citados tenham contribuído de alguma forma no avanço do conhecimento do comportamento molecular do câncer de endométrio, não foi encontrado qualquer trabalho que tenha identificado um perfil de expressão que pudesse caracterizar biomarcadores associados à recidiva da doença.

2. JUSTIFICATIVA DO PROJETO E OBJETIVOS

Como já mencionado, o câncer de endométrio é a neoplasia maligna ginecológica mais comum em países desenvolvidos como EUA e Canadá. Contudo, vem sendo observado um aumento progressivo na sua incidência em países de baixa e média rendas, incluindo o Brasil. Este aumento está relacionado à exposição aos fatores de risco para o desenvolvimento da doença, cada vez mais presentes na nossa população.

A maior parte dos casos de câncer de endométrio, sobretudo os de adenocarcinoma Tipo I, é diagnosticada nos estádios iniciais e evolui com prognóstico favorável. Para estimar o prognóstico de cada caso são considerados fatores como o tipo histológico, o grau de diferenciação tumoral e o estadiamento final segundo os critérios da FIGO. Ainda assim, a resposta ao tratamento pode ser bastante variável entre as mulheres com iguais características clínicas e histológicas, o que demonstra a limitação destes critérios na determinação do prognóstico. A resposta, tanto ao tratamento cirúrgico quanto ao sistêmico, pode estar relacionada a perfis moleculares individuais de cada tumor (BANSAL *et al.*, 2009).

Apesar da frequência de determinadas alterações moleculares no câncer de endométrio já estarem bem estabelecidas, ainda não foi conclusiva a sua associação ao risco de progressão e recidiva da doença. Assinaturas genéticas podem gerar marcadores moleculares de risco que, uma vez incorporados ao sistema de estadiamento do câncer de endométrio, complementariam o papel da histologia e da extensão da doença nas decisões terapêuticas (NCI PROGRESS REVIEW, 2001). A possibilidade de predição da progressão tumoral e da recidiva poderá individualizar o tratamento e, conseqüentemente, proporcionar melhor desfecho da doença nas pacientes. Assim, o presente projeto visou os seguintes objetivos:

Objetivo Principal

Identificar e analisar alterações moleculares envolvidas na recidiva do câncer de endométrio do Tipo I (endometrióide), e associá-las à análise de dados clínico-patológicos e de sobrevida.

Objetivos Específicos

Descrever as características clínico-patológicas das pacientes matriculadas e tratadas no INCA com o diagnóstico de “adenocarcinoma de endométrio”, no período de 2000 a 2011.

Analisar sobrevida livre de doença e sobrevida global das pacientes matriculadas e tratadas no INCA com o diagnóstico de “adenocarcinoma de endométrio”, no período de 2000 a 2011.

Identificar, através de análise randômica por microarranjo, as possíveis alterações na expressão gênica em tumores de pacientes com adenocarcinoma endometrióide de endométrio no estadiamento I, que apresentaram recidiva da doença quando comparados àqueles que não apresentaram recidiva.

Validar os genes selecionados na análise de microarranjo em tumores diagnosticados no estágio I que apresentaram recidiva e em tumores sem recidiva, através de PCR em tempo real e de imuno-histoquímica, associando as alterações de expressão com dados clínico-patológicos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Seleção de Pacientes para o Estudo

Com base nas informações disponíveis no Registro Hospitalar de Câncer do Hospital de Câncer II (RHC-HCII), através do sistema *absolut* do INCA, foram selecionadas as pacientes com diagnóstico de “adenocarcinoma de endométrio”, matriculadas na Seção de Ginecologia Oncológica, no período de 01 de janeiro de 2000 a 31 de dezembro de 2011.

Foram incluídas todas as pacientes submetidas a tratamento cirúrgico como primeira opção terapêutica, que tiveram o diagnóstico de “adenocarcinoma de endométrio” confirmado por exame histopatológico da peça cirúrgica. Os dados clínico-patológicos foram obtidos com a identificação de todos os prontuários dos referidos casos.

Não foram incluídas as pacientes: que não foram submetidas a tratamento cirúrgico; aquelas cujo tratamento inicial não foi cirúrgico; as que realizaram a primeira cirurgia fora do INCA. Também foram excluídos os casos em que o laudo histopatológico foi diferente de “adenocarcinoma” segundo a revisão das lâminas no INCA; aqueles cujo sítio primário da doença não pode ser determinado ou o sítio primário da doença não era endométrio.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do INCA (CEP), sob o número 091/10 (anexo 1). O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi aplicado e assinado por todas as pacientes vivas cujo contato foi possível. Em nenhum caso a sua assinatura foi negada, totalizando um número de 362 assinaturas. Conforme previsto no projeto e avalizado pelo CEP, os casos de óbitos tiveram a dispensa de assinatura do termo, bem como aquelas pacientes em que não foi possível o contato após três tentativas em datas diferentes (considerados casos de “perda de seguimento”).

3.2 Coleta de Dados

Os dados clínicos foram coletados em prontuário, por meio de instrumento desenvolvido especificamente para esta pesquisa (anexo 2). A escolha das variáveis clínicas de estudo se baseou nos seguintes critérios:

- Variáveis previamente descritas como fatores de risco para o desenvolvimento da doença: idade; comorbidades associadas (HAS, diabetes, cardiopatia); IMC; idade da menarca e da menopausa; se a doença se desenvolveu na pré-menopausa ou não; nuliparidade e número de gestações quando não nuligesta; uso de anticoncepcional oral (ACO) e de terapia de reposição hormonal (TRH) na peri e/ou pós-menopausa; uso prévio de tamoxifen; *status* dos receptores hormonais.
- Variáveis clínicas e patológicas previamente descritas como fatores prognósticos: PS; estadiamento final segundo critérios da FIGO; invasão miometrial; subtipo histológico; grau de diferenciação histológica; presença ou não de êmbolos neoplásicos; tamanho do tumor; *status* da cirurgia (se permaneceu doença residual ou não após a mesma).
- Outras variáveis possivelmente associadas à sobrevida: intervalo entre o início dos sintomas e o diagnóstico; intervalo entre o diagnóstico e o tratamento; cirurgia incompleta ou não; ocorrência e local da recidiva; ocorrência de óbito (por câncer de endométrio ou por outra causa).

3.3 População de Estudo

O número de pacientes elegíveis em cada etapa da pesquisa está indicado na figura 4. Seguindo todos os critérios de inclusão, foram selecionadas 1.132 pacientes com diagnóstico de “adenocarcinoma de endométrio”. Para estes casos foi realizada análise descritiva para a população ao diagnóstico de câncer de endométrio e por dois períodos de matrícula (entre 2000 e 2005; entre 2006 e 2011).

Para avaliação descritiva por subtipos histológicos de adenocarcinoma de endométrio (Tipo I e Tipo II) foram excluídos os casos de adenocarcinoma diferentes do Tipo I (endometriode) e do Tipo II (seroso e de células claras), sendo contabilizados ao final 991 casos do Tipo I e 122 do Tipo II, com um total de 1.113 pacientes.

Para a análise de sobrevida global (SG) e sobrevida livre de doença (SLD), foram excluídos 94 casos por terem apresentado outro tumor primário prévio ao diagnóstico de câncer de endométrio (designados como casos de “câncer prévio”) e/ou apresentado um segundo tumor primário (sincrônico ou metacrônico) após o diagnóstico de câncer de endométrio, uma vez que tais tumores poderiam interferir na evolução e, conseqüentemente, na sobrevida destas pacientes. Neste contexto, as curvas de sobrevida foram calculadas em 1.038 casos de pacientes portadoras de “adenocarcinoma de endométrio”. Para as análises das curvas de SG e SLD dos Tipos I e II em separado, ainda foram excluídos 18 casos com diagnóstico de adenocarcinoma sem caracterização do subtipo. Portanto, para esta análise foram incluídos 912 casos do Tipo I e 108 casos do Tipo II.

As análises moleculares foram realizadas com casos de adenocarcinoma Tipo I por se tratar do subtipo histológico mais frequente. A primeira metodologia aplicada foi a análise randômica por microarranjo, sendo inicialmente selecionados 21 tumores de diferentes pacientes diagnosticadas nos estádios (Ec) I, II e III, todas submetidas a “cirurgia completa”. Durante o período de estudo, 11 delas apresentaram recidiva, sendo 5 diagnosticadas no Ec I.

Num primeiro momento, as análises moleculares prosseguiram com os dez casos de tumores diagnosticados no Ec I para identificação das possíveis alterações presentes na recidiva (n=5) em comparação com tumores não recidivados (n=5). Uma vez selecionados os genes diferencialmente expressos entre os dois grupos, procedeu-se à sua validação através da análise da expressão proteica por imunohistoquímica e da expressão gênica por PCR quantitativa (PCRq) em tumores armazenados em blocos de parafina, em um maior número de casos com recidiva e sem recidiva, todos diagnosticados no Ec I e submetidos a “cirurgia completa”. Das 36 pacientes que apresentaram recidiva, os blocos disponíveis de uma delas não mais apresentavam tecido tumoral, perfazendo 35 casos neste grupo. Para comparação com tumores sem recidiva, foi incluído o dobro do número de casos (n=72) no mesmo período (de 2000 a 2011), respeitando um mínimo de 24 meses de seguimento após o tratamento cirúrgico. Portanto, para as duas metodologias de validação (imunohistoquímica e PCRq) foram analisados 107 casos de Ec I, incluindo os dez submetidos à análise por microarranjo.

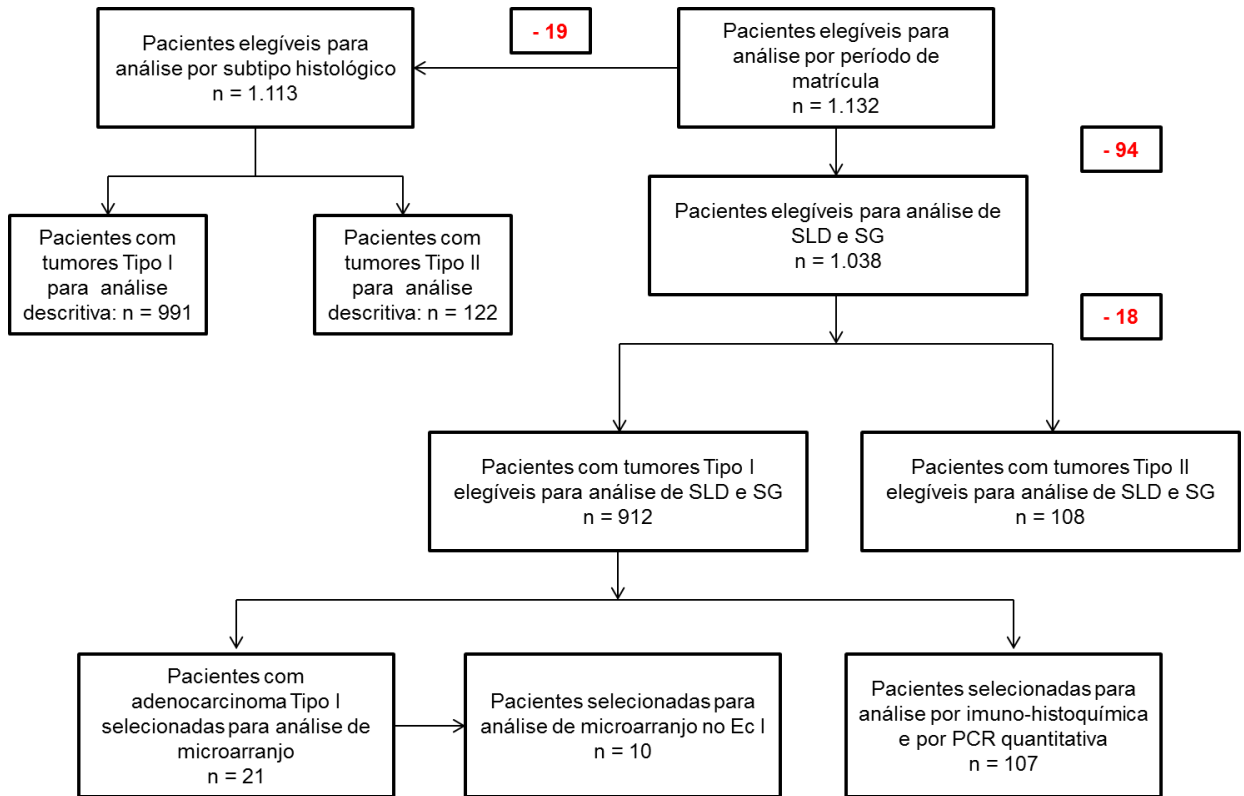


Figura 4: Fluxograma das pacientes elegíveis para o estudo

3.4 Definição das Variáveis de Estudo

3.4.1 Desfechos

- Recidiva: recidiva loco-regional foi considerada por nova manifestação do câncer no local de origem ou região anatômica onde se localizava o útero (recidiva local ou loco-regional), confirmada por exames citológicos e/ou histopatológicos, de imagem, ou exame físico. Recidiva à distância foi considerada pela ocorrência de câncer à distância, confirmada por exames de imagem, citológicos e/ou histopatológicos, ou exame físico.
- Óbito: foi considerado o óbito relacionado ou não à evolução do câncer, com a data firmada no atestado de óbito.
- Sobrevida livre de doença: no caso de ausência de recidiva, os casos foram censurados ao final do seguimento. Na ocorrência de doença, foi considerado como censura o tempo (em meses) entre a data do tratamento cirúrgico da doença e a data da realização do exame de confirmação diagnóstica de recidiva. Para as perdas de seguimento, foi censurada a data da última consulta registrada em prontuário hospitalar.
- Sobrevida global: os casos foram censurados ao final do seguimento, no caso de ausência de óbito. Quando estes ocorrerem, foi considerado censura o tempo (em meses) entre a data do tratamento cirúrgico do câncer e a data do óbito. Para as perdas de seguimento, foi censurada a data da última consulta registrada em prontuário hospitalar.

3.4.2 Variáveis independentes e descritivas

Para avaliar os fatores associados aos desfechos e descrever as características da população, foram coletadas as seguintes variáveis:

- Idade ao diagnóstico: o cálculo da idade foi feito a partir do intervalo entre a data de nascimento e a de matrícula de cada paciente. A determinação da faixa etária em dois grupos se baseou na sugestão da Organização Mundial da Saúde (OMS): na maior parte dos países desenvolvidos é considerada idosa uma pessoa a partir de 65 anos (WHO, 2014).

- História de câncer prévio: através do relato da ocorrência de qualquer tipo de neoplasia maligna, com intervalo maior de seis meses para a data do diagnóstico de câncer de endométrio, registrado na anamnese.
- Segundo tumor primário: ocorrência de uma segunda neoplasia maligna na mesma ocasião ou em até seis meses do diagnóstico de câncer de endométrio (tumor sincrônico) ou acima de seis meses (tumor metacrônico).
- Diabetes, Cardiopatia e hipertensão arterial sistêmica (HAS): através do relato da anamnese registrada na data da matrícula.
- Uso de tamoxifen: através do relato registrado no prontuário ao longo do período de estudo, seja por câncer de mama prévio, seja por segundo tumor primário de mama após o tratamento de câncer de endométrio.
- Índice de massa corporal (IMC): obtido em kg/m^2 , aferido pelo Serviço de Nutrição, no dia da primeira internação para o tratamento cirúrgico, e registrado no prontuário hospitalar. O IMC foi dividido em três categorias, conforme critérios da OMS: adequado (ou normal), com $\text{IMC} < 25 \text{ kg/m}^2$; sobrepeso, com $\text{IMC} \geq 25 \text{ kg/m}^2$ até $29,9 \text{ Kg/m}^2$; obesidade, com $\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$. Para SLD e SG nos casos de tumores Tipo II, o IMC foi calculado separadamente (nas três categorias) e também agrupando-se o sobrepeso e a obesidade numa mesma categoria, com a finalidade de estabelecer um melhor modelo.
- Método para diagnóstico: exames utilizados para obtenção de amostra da lesão tumoral na cavidade uterina, para o diagnóstico histopatológico da doença (curetagem uterina fracionada e vídeo-histeroscopia). Em alguns casos, a ultrassonografia pélvica com imagem sugestiva de lesão tumoral na cavidade uterina foi considerada o primeiro exame a indicar a investigação.
- *Performance status* (PS): A determinação do PS das pacientes na ocasião da matrícula tem por finalidade avaliar se as mesmas detêm condições clínicas que permitam a realização do tratamento adequado, bem como acompanhar a resposta e evolução de cada caso, obedecendo os critérios publicados por OKEN *et al.*, em 1982 (anexo 3). O PS foi estabelecido durante a anamnese e o exame físico na data da matrícula. A frequência de casos com PS 3 e 4 foi pequena. Por isto, a SLD e a SG para esta variável, na população geral e na de casos de tumores Tipo I, foram calculadas com três categorias: 0, 1 e ≥ 2 . Para a população de tumores Tipo II, não foram calculadas a SLD e a SG

para esta variável porque algumas categorias não apresentaram eventos (recidiva ou óbito, respectivamente).

- Primeiro sintoma do câncer: descrito pela paciente como aquele que a levou à investigação diagnóstica. Na análise de SLD e SG esta variável foi calculada com duas categorias: “sangramento” e “outros sintomas”, uma vez que a frequência de sintomas diferentes de “sangramento” foi pequena.
- Intervalo entre o primeiro sintoma e o diagnóstico de câncer: a mediana de tempo entre o início do primeiro sintoma de câncer e o diagnóstico foi de 178 dias (0 - 4.437). O ponto de corte foi de 180 dias.

Para as variáveis relacionadas à história ginecológica das pacientes, as informações foram obtidas através da anamnese registrada na data da matrícula:

- Idade da menarca: considerada a data relatada da primeira menstruação. Para as análises descritiva e de sobrevida, as pacientes foram separadas em dois grupos: ≤ 11 anos e > 11 anos. Ao longo do tempo, houve grande variação na média de idade da menarca, em diferentes lugares. Optou-se, então, pelo corte em 11 anos entre os dois grupos (PARENT *et al.*, 2003).
- Idade da menopausa: considerada a data relatada da última menstruação. Para as análises descritiva e de sobrevida, as pacientes foram separadas em dois grupos: ≤ 45 anos e > 45 anos, já que alguns autores consideram menopausa precoce quando esta ocorre antes dos 45 anos e outros consideram até os 45 anos (JACOBS *et al.* 1976; McKINLAY *et al.*, 1992).
- Pré-menopausa ao diagnóstico de câncer: foram classificadas de acordo com a informação da paciente de já se encontrar na menopausa ou se ainda apresentava ciclos menstruais regulares.
- Gestação: se a paciente era nuligesta ou não, e quantas gestações teve ao longo da vida. Os casos foram separados em três categorias: 0 (ou nenhuma gestação) 1 a 3 gestações e ≥ 4 .
- Uso de anticoncepcional oral (ACO): relato de utilização ou não, independente do tempo de duração.
- Uso de terapia de reposição hormonal (TRH): relato de utilização ou não, independente do tempo de duração.

Para as variáveis relacionadas ao tratamento e às características anátomo-patológicas foram coletados:

- Intervalo entre diagnóstico e início do tratamento oncológico: utilizado ponto de corte em 60 dias (≤ 60 e > 60), conforme preconizado pelo Ministério da Saúde (portaria nº 876, de 16/05/11; em vigência desde maio de 2013) (BRASIL, Ministério da Saúde, 2013).
- Cirurgia incompleta: classificados como “sim” aqueles casos com relato em prontuário de possíveis fatores determinantes: obesidade, que dificulta a técnica cirúrgica e aumenta o risco de intercorrências no per e pós-operatório; presença de comorbidades associadas que determinaram um risco cirúrgico elevado, havendo necessidade de se abreviar o procedimento cirúrgico; discordância entre o histopatológico e/ou grau de diferenciação final em relação àquele estabelecido na revisão de lâmina da biópsia de fora realizada no INCA; doença residual macroscópica (cirurgia R2); ocorrência de complicação no per-operatório, incorrendo na brevidade do procedimento; o câncer de endométrio ter sido um “achado pós-operatório” (pacientes operadas por outra patologia e cujo diagnóstico da doença endometrial foi feito apenas após a cirurgia, observada apenas no exame histopatológico da peça cirúrgica); dificuldade técnica pela presença de bridas (aderências) na cavidade abdominal por cirurgia prévia. Os demais casos foram classificados como “não”.
- Invasão miometrial: considerada invasão superficial quando se estendia por menos de 50% da espessura do miométrio, e invasão profunda quando por 50% ou mais.
- Êmbolos neoplásicos: presentes ou não, descritos na microscopia dos laudos histopatológicos, podendo ser linfáticos, vasculares ou neurais (presença de invasão linfovascular).
- Subtipo histológico: casos separados em Tipo I e Tipo II conforme classificação por Bokhman em 1983.
- Estadiamento (FIGO): estabelecido segundo os critérios revistos e publicados pela FIGO em 2009. Os casos matriculados e tratados antes desta revisão tiveram seu estadiamento atualizado conforme os novos critérios. Nas pacientes com tumores Tipo II, como se trata de uma população com número

reduzido em comparação ao das outras, a SLD e a SG foram calculadas com duas categorias (I e II, “estádios precoces”; III e IV, “estádios avançados”).

- Grau de diferenciação: os tumores Tipo I podem ter três diferentes graus de diferenciação: G1 (bem diferenciados), G2 (moderadamente diferenciados) e G3 (mal diferenciados). Para efeito de análise de sobrevida, os dois primeiros grupos podem ser considerados de baixo grau e os G3 de alto grau. Já os tumores do Tipo II são mal diferenciados na sua totalidade. Na regressão de Cox da SG da população geral e dos casos de tumor Tipo I, o grau foi agrupado em duas categorias (G1 e G2= baixo grau; G3= alto grau).
- Tamanho do tumor: segundo alguns autores e o GOG, os tumores até 2,0 cm tendem a apresentar um melhor prognóstico em comparação àqueles > 2,0 cm (MARIANI *et al.*, 2002; MARIANI *et al.*, 2003). Além disto, já vem sendo observada a ocorrência de um grande número de casos com tumores de grandes dimensões nas pacientes tratadas no INCA. Por isto, no presente estudo, esta variável foi analisada com o acréscimo de uma terceira categoria (> 5,0 cm) com o intuito de avaliar se houve impacto destas lesões na sobrevida. No Tipo II, para a SLD e a SG, esta variável foi também calculada com duas categorias (\leq 5,0 cm e > 5,0 cm).
- *Status* da cirurgia: estabelecido logo após o término da cirurgia, sendo considerada cirurgia R0 quando não restou qualquer sinal de doença residual macroscópica; R1 quando houve doença residual microscópica; R2 quando restou doença residual macroscópica.
- Pesquisa de receptores hormonais: realizada apenas nos casos de recidiva da doença em que se cogitou o uso de hormonioterapia paliativa. Foi feita a pesquisa para receptores de estrogênio e progesterona, tendo sido considerados positivos os casos em que era visualizada a marcação pelo anticorpo, independente da porcentagem de células marcadas.
- Período do diagnóstico: por se tratar de um estudo que abrangeu um longo intervalo de tempo e, por isto, terem ocorrido neste período algumas alterações em relação à frequência de algumas variáveis e às rotinas de tratamento, foi também realizada uma análise em dois períodos de estudo: casos matriculados de 2000 a 2005 (“primeiro período”) e os matriculados de 2006 a 2011 (“segundo período”).

3.4.3 Variáveis moleculares

Após análise por microarranjo, foram identificados genes diferencialmente expressos nos casos de recidiva comparados aos casos que não recidivaram. Entre estes genes foi selecionado o *PGR* por ter apresentado a maior expressão nos casos de recidiva. Em seguida, foram identificados outros genes também mais expressos na recidiva e que estivessem interligados a *PGR* numa mesma via, para a validação descrita anteriormente. Portanto, os genes selecionados para as análises moleculares foram:

- *PGR* (gene regulador do receptor de progesterona)
- *ESR1* (gene regulador do receptor de estrogênio)
- *GREB1* (*Growth Regulation by Estrogen in Breast Cancer 1*)

3.5 Expressão Gênica Global por Análise de Microarranjo

3.5.1 Extração de RNA de Tecido Tumoral Fresco Congelado

Uma vez selecionados os casos de adenocarcinoma de endométrio Tipo I para as análises por microarranjo, foi confeccionada “lâmina espelho” de cada uma das amostras frescas congeladas a -80°C no BNT para confirmação da presença de no mínimo 80% de células tumorais, imediatamente antes de serem processadas.

A extração de RNA total de cada amostra foi realizada no laboratório do BNT-INCA, como determina o regimento da instituição, sendo utilizado o *RNeasy Mini kit* - Qiagen[®], seguindo as orientações do fabricante:

Um fragmento da amostra de até 30 mg foi depositado em um microtubo de 1,5 ml que continha 200 μL do tampão RLT com beta-mercaptoetanol. Após macerar o tecido com auxílio de um pilão, foram adicionados 400 μL de tampão RLT para serem centrifugados em microcentrífuga por 3 minutos à velocidade de 12.000 x g com a finalidade de sedimentar o material não lisado. Em seguida o sobrenadante foi transferido para novo tubo e 1 volume de etanol 70% foi adicionado. Após homogeneização, foram transferidos 700 μL da solução para uma coluna de purificação alocada em um tubo coletor de 2 ml e centrifugados por 15 segundos a 8.000 x g. Ao término, o líquido do tubo coletor foi descartado e 700 μL do tampão RW1 foram adicionados à coluna de purificação, e centrifugados por 15 segundos a

8.000 x g. Em seguida, o líquido do tubo coletor foi descartado, foram adicionados 500 µL do tampão RPE à coluna de purificação e centrifugados por 2 minutos a 8.000 x g. Então, a coluna foi transferida para um novo tubo coletor de 2 ml imediatamente centrifugado por 1 minuto a 12.000 x g. A coluna foi novamente transferida para um microtubo de 1,5 ml. Por fim, foi feita a eluição final do RNA total com a adição de 30 µL de água no centro da membrana evitando o contato da ponteira na mesma. Após 1 minuto em temperatura ambiente, o tubo foi centrifugado por 1 minuto a 8.000 x g. A coluna foi descartada e os tubos contendo o RNA extraído foram armazenados a -80°C.

3.5.2 Quantificação e Análise da Integridade do RNA

A concentração de RNA nas amostras foi determinada a partir de 1,0 µL de RNA extraído de cada uma delas, utilizando o espectrofotômetro NanoDrop (Uniscience®) com absorvância determinada no comprimento de onda de 260 nm. O cálculo da concentração do RNA tomou por base a informação de que uma unidade de absorvância corresponde a uma concentração de 40 µg / ml de RNA.

Para determinação da integridade do RNA extraído, foi utilizado o equipamento *Bioanalyzer* (Agilent®), com o *chip* RNA 6000 Nano, seguindo o protocolo do fabricante.

Como resultado, o *Bioanalyzer* fornece o número de integridade do RNA (RIN) e amostras com RIN inferior a 8 foram descartadas.

3.5.3 Síntese de cDNA

Nesta etapa foi utilizado o RNA extraído das 21 amostras de tecido tumoral fresco congelado. A preparação para a análise de microarranjo foi feita com o *WT Expression Kit* (Ambion®), conforme recomendação da *Affymetrix*, fabricante dos *chips* para microarranjo utilizados neste estudo (*Gene Chip Expression Analysis Technical Manual - Affymetrix Inc®*, Santa Clara, CA, USA).

O RNA total de cada tumor foi convertido em cDNA dupla-fita utilizando o oligonucleotídeo iniciador (ou *primer*), T7-Oligo (dT) 24 de sequência 5' – GGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGGCGG- (dT) 24 – 3'. Para tal, 3,0 µL com 100 ng de RNA foram depositados em um microtubo que continha 2,0 µL do controle Poly-A e 5,0 µL do *mix* para síntese da primeira fita de cDNA. Os tubos com cada uma das reações foram incubados no termociclador Veriti (*Applied*

Biosystems[®]), com as seguintes condições: 1 hora a 25°C; 1 hora a 42°C; 2 minutos a 4°C.

Após este processo, os tubos foram inseridos no gelo para a imediata síntese da segunda fita de cDNA, formando um cDNA dupla-fita. Foram adicionados 50,0 µL do *Second-Strand Mix* em cada uma das reações, com nova incubação dos microtubos no termociclador Veriti (*Applied Biosystems*[®]), com as seguintes condições: 1 hora a 16°C; 10 minutos a 65°C; 2 minutos a 4°C.

3.5.4 Síntese e Purificação do cRNA

Para a síntese do cRNA biotilado, o volume total do cDNA sintetizado (60,0 µL) foi utilizado em uma reação de transcrição *in vitro* com 24,0 µL de tampão e 6,0 µL da enzima para a reação. Esta reação foi incubada por 16 horas a 40°C no termociclador Veriti (*Applied Biosystems*[®]) e o cRNA foi purificado utilizando *beads* magnéticas (*Nucleic Acid Binding Beads*, Ambion[®], Life Technologies[™], USA), com o seguinte protocolo:

Em cada tubo contendo cRNA foram adicionados 50,0 µL do tampão das *beads* magnéticas e 10,0 µL das *beads* magnéticas, sendo homogeneizados por pipetagem. As soluções foram transferidas para placa em U fornecida pelo *kit* e foram adicionados 60,0 µL de isopropanol (MERCK[®]) em cada tubo, sendo mais uma vez homogeneizado por pipetagem. Após agitação em placa por dois minutos à velocidade de 400 rpm, a mesma foi retirada e posicionada sobre placa magnética por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi retirado sem agitação das *beads* que estão ligadas ao cRNA. As *beads* foram lavadas por duas vezes com solução de lavagem de ácidos nucleicos fornecida pelo *kit*, utilizando o misturador de placas e a placa magnética como descrito anteriormente, e retirando o sobrenadante no final. O cRNA foi eluído com a adição de 40,0 µL da solução de eluição fornecida pelo *kit*, pré-aquecida por 10 minutos a 58°C. A placa foi então incubada por 2 minutos e, em seguida, submetida a rotação vigorosa no misturador de placas por 3 minutos. A placa em U foi posicionada sobre a placa magnética e o sobrenadante que contém o cRNA purificado transferido para tubos de 0,5 ml. A reação foi armazenada em gelo para a nova síntese de cDNA.

Antes de iniciar o processo da nova síntese de cDNA, foi verificada a eficiência da reação através da quantificação no espectrofotômetro NanoDrop (Uniscience[®]) com absorvância determinada no comprimento de onda de 260 nm. As reações

foram consideradas eficientes quando apresentaram concentração de cRNA igual ou maior que 455,0 ng/ μ L.

3.5.5 Segundo ciclo de síntese de cDNA

O segundo ciclo de síntese de cDNA foi realizado com 10,0 μ g de cRNA purificado e 2,0 μ L de *primers* randômicos com incubação de 5 minutos a 70°C, 5 minutos a 25°C e 2 minutos a 4°C. Um total de 16,0 μ L do produto da reação foi adicionado a 8,0 μ L de tampão e 8,0 μ L de enzima, ambos fornecidos pelo *kit*, e posteriormente incubados por 10 minutos a 25°C, 90 minutos a 42°C, 10 minutos a 72°C e 2 minutos a 4°C. Para hidrolização, foram adicionados 2,0 μ L de *RNaseH* à mistura submetida a nova incubação por 45 minutos a 37°C, 5 minutos a 95°C e 2 minutos a 4°C. O produto do segundo ciclo de cDNA foi então purificado com a utilização de *beads* magnéticas conforme descrito anteriormente, porém com a substituição de isopropanol por etanol (MERCK®). O cDNA de fita simples resultante da reação foi novamente quantificado para avaliação da eficiência da reação no espectrofotômetro NanoDrop (Uniscience®), com absorvância determinada no comprimento de onda de 260 nm. As reações foram consideradas eficientes quando apresentaram concentração de ssDNA igual ou maior que 185,0 ng/ μ L.

3.5.6 Fragmentação e Hibridação

Para hibridação foram fragmentados 5,5 μ g de cDNA (em um volume de 10 μ L de cada amostra) com 4,8 μ L de tampão de fragmentação 10X, 1,0 μ L da enzima *Uracil-DNA Glycosylase* (UDG), 1,0 μ L da enzima *Humanapurinic/aprimidinicendonuclease* (APE) e água ultrapura para completar um volume final de 48,0 μ L. A mistura foi incubada por 60 minutos a 37°C, 2 minutos a 95°C e 2 minutos a 4°C. O tamanho dos fragmentos foi mensurado por eletroforese em gel de agarose. Antes da fragmentação é necessário que as bandas sejam equivalentes a 0,5 kb; após a fragmentação, devem ser equivalentes a fragmentos de 35 a 200 bases. A primeira marcação foi realizada com 45,0 μ L do produto da fragmentação e 12,0 μ L de tampão concentrado (5x) da *Terminal Deoxynucleotidyl Transferase* (TdT), 2,0 μ L de TdT e 1,0 μ L de *DNA labelling reagent*, com incubação por 60 minutos a 37°C, 10 minutos a 70°C e 2 minutos a 4°C.

Para cada amostra de tecido tumoral foi utilizado um *chip* de microarranjo (ou “*microarray*”) *Human Exon 1.0 ST* (Affymetrix Inc[®], Santa Clara, CA, USA). As sondas dos *arrays* são produzidas através de tecnologias que combinam fotolitografia e química combinatória, sendo que até 1,3 milhão de diferentes sondas de oligonucleotídeos são sintetizadas em cada *array*. Cada um desses oligonucleotídeos está localizado em uma área específica do *array* chamada de *probecell* e cada uma delas pode conter de milhares a milhões de cópias de um determinado oligonucleotídeo. Os *arrays* foram previamente equilibrados à temperatura ambiente. Foi preparada uma mistura de reação para cada amostra, com o cuidado de se aquecer previamente a solução estoque de controles de hibridação eucarióticos 20X a 65°C por 5 minutos, para a completa ressuspensão do ssDNA .

A mistura de reação é composta por 27,0 µL da reação de ssDNA fragmentada, 1,7 µL de oligonucleotídeo B2 Controle (Affymetrix[®]), 5,0 µL de controles de hibridação eucarióticos 20X (bioB, bioC, bioD, cre) - Affymetrix[®], 50,0 µL de tampão de hibridação 2X, 7,0 µL de DMSO e 9,3 µL de água ultrapura, totalizando 100 µL. Esta mistura foi aquecida a 99°C por 5 minutos e logo em seguida resfriada a 45°C por 5 minutos. Os microtubos com as misturas de reação foram centrifugados por 5 minutos na velocidade de 12.000 x g para remoção de qualquer material insolúvel. A solução tampão foi removida dos cartuchos e substituída pela mistura de reação clarificada. Os *arrays* (ou *chips*) foram acondicionados em caixas do tipo *rotisserie* em forno de hibridação a 45°C por 17 horas, com rotação de 60 rpm. Todo o processo de lavagem e coloração foi feito na estação fluídica *GeneChip[®] Fluidics Station 450*, com a seguinte programação: 10 ciclos de 2 *mixes*/ciclo com tampão A a 30°C; 6 ciclos de 15 *mixes*/ciclo com tampão B a 50°C; tampão SAPE por 5 minutos a 35°C; 10 ciclos de 4 *mixes*/ciclo com tampão A a 30°C; solução de anticorpo por 5 minutos a 35°C; tampão SAPE por 5 minutos a 35°C; 15 ciclos de 4 *mixes*/ciclo com tampão A a 35°C.

3.5.7 Leitura dos *Chips* e Aquisição dos Valores de Expressão

Para a leitura óptica dos *chips Human Exon 1.0 ST*, os arranjos de sonda foram lidos no *GeneArray[®] Scanner 7G* (Affymetrix), equipado com laser de íon argônio, programado segundo as instruções do fabricante, atribuindo-se 3 µm para o valor de *pixel* e comprimento de onda de 570 nm. A captura das imagens e análise inicial das

hibridações foram feitas com o *software Affymetrix® Expression Console™* e os arquivos gerados salvos em formato *.cel.

Os arquivos CEL foram processados pelo algoritmo RMA (*Robust Microarray Analysis*).

A análise por microarranjo de DNA foi utilizada como um método de triagem para determinar e selecionar genes candidatos que possam caracterizar os tumores de pacientes que apresentaram recidiva, em comparação àqueles casos em que não houve recidiva no mesmo estágio. Os genes selecionados para validação foram aqueles que apresentaram aumento ou diminuição nos níveis de transcrição de pelo menos três vezes. Para esta seleção, além da diferença de expressão observada a partir dos dados de microarranjo, também foi considerada a relevância do gene dentro de diferentes vias de sinalização celular e o potencial uso como marcador prognóstico relacionado à recidiva do tumor.

3.6 Expressão Gênica por PCR em Tempo Real

3.6.1 Extração de RNA de Tecido Tumoral Armazenado em Blocos de Parafina

Uma vez selecionados os genes diferencialmente expressos após a análise por microarranjo, foi também realizada validação destes resultados pelo método de PCR em tempo real (ou PCR quantitativa – PCRq), nos mesmos casos analisados pelo microarranjo e em um número maior de amostras conforme descrito previamente em “seleção de pacientes”.

Após a marcação da área tumoral nas lâminas dos casos selecionados, os blocos correspondentes (os mesmos utilizados para a análise por IH) foram cortados em micrótomo Leica®, totalizando dez seções de 10 µm cada. As amostras foram desparafinizadas e a extração de RNA total foi feita utilizando-se o *kit RNEasy FFPE Kit* Qiagen®. Para desparafinização das amostras, foi utilizada a solução de desparafinização da Qiagen® seguindo as orientações do fabricante: as seções de tumor em parafina foram depositadas em microtubos de 2 ml e adicionados 320 µL da solução de desparafinização em cada um. Após agitação por 10 segundos, os tubos foram centrifugados brevemente para que o material se depositasse no fundo, incubados a 56°C por 3 minutos e resfriados à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 240 µL do tampão PKD e realizada agitação vigorosa.

Posteriormente, foram centrifugados por 1 minuto à velocidade de 11.000 x g. Por fim, foram adicionados 10 µL de proteinase K para homogeneização por pipetagem e os tubos foram incubados a 56°C por 15 minutos e, em seguida, a 80°C por 15 minutos. Após este período de aquecimento, o conteúdo da fase “clara” foi transferido para novo tubo de 2 ml, incubado em gelo por 3 minutos, centrifugado a 20.000 x g por 15 minutos e novamente transferido para um novo tubo. Posteriormente, foram adicionados 25 µL do tampão *DNase Booster* e 10 µL de solução *DNase I stock*. Após breve centrifugação, os tubos foram incubados em temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, foram adicionados 500 µL de tampão RBC e o lisado misturado. Adicionados 1.200 µL de etanol 100% e, imediatamente após homogeneização por pipetagem, todo o conteúdo da solução foi transferido para a coluna de purificação alocada em um tubo coletor de 2 ml e centrifugados por 15 segundos a 8.000 x g. Ao término, o líquido do tubo coletor foi descartado, 500 µL do tampão RPE foram adicionados à coluna de purificação e centrifugados por 15 segundos a 8.000 x g. Em seguida, o líquido do tubo coletor foi descartado, foram novamente adicionados 500 µL do tampão RPE à coluna de purificação e centrifugados por 2 minutos a 8.000 x g. Então, a coluna foi transferida para um novo tubo coletor de 2 ml imediatamente centrifugado por 5 minutos a 12.000 x g, com a tampa aberta. A coluna foi novamente transferida para um microtubo de 1,5 ml. Por fim, foi feita a eluição final do RNA total com a adição de 15 µL de água *RNase-free* no centro da membrana evitando o contato da ponteira com a mesma. Após 1 minuto em temperatura ambiente, o tubo foi centrifugado por 1 minuto a 12.000 x g. A coluna foi descartada e os tubos contendo o RNA extraído foram armazenados a -80°C. A concentração de RNA nas amostras foi determinada a partir de 2,0 µL de RNA extraído de cada uma delas, utilizando o espectrofotômetro Nanovue (GE Healthcare®), com absorvância determinada no comprimento de onda de 260 nm.

3.6.2 Síntese de cDNA - Reação da Transcriptase Reversa

O RNA total extraído dos tumores armazenados em bloco de parafina foi reversamente transcrito em cDNA para análises de PCR em tempo real utilizando a transcriptase reversa *SuperScript II* (Invitrogen®), conforme orientação do fabricante: em um microtubo foram adicionados 3 µL (300 ng) de *primer* randômico (Promega®), 3 µg de RNA alvo, 1 µL do *set* de dNTPs a 10mM e água *RNase Free* suficiente para

completar o volume final de 12 μL de reação; a mistura foi aquecida por 5 minutos a 65°C. Em seguida, foram adicionados 4 μL do tampão da enzima transcriptase reversa (5X) fornecido pelo fabricante (Invitrogen[®]), 2 μL de DTT 0,1M e 1 μL de água RNase Free, sendo incubados por 2 minutos a 25°C. Adicionado 1 μL de SuperScript II[®] contendo 200U, totalizando um volume final de 20 μL . As reações foram incubadas no termociclador por 50 minutos a 42°C e a enzima foi inativada a 70°C por 15 minutos. Após a síntese, o cDNA foi armazenado a -20°C.

3.6.3 PCR em Tempo Real

As reações de PCR em tempo real ou quantitativa (PCRq) foram realizadas na plataforma Rotor-Gene (Qiagen[®]) para análise da expressão gênica de *PGR*, *ESR1* e *GREB1*. A sequência dos *primers* utilizados está descrita no quadro 4. Para cada reação foram adicionados: 7,5 μL de tampão SYBR green FAST 2x (Qiagen[®]), 0,3 μL de cada um dos oligonucleotídeos específicos da reação a 10 μM , 1,0 μL de cDNA na diluição de 1:10 e 5,5 μL de água deionizada autoclavada. As reações ocorreram com a seguinte ciclagem: 1 X 95°C por 5 minutos; 40 X 95°C por 5 segundos; 60°C por 10 segundos com posterior captura de fluorescência. Todas as reações foram feitas adicionando a este programa a curva de dissociação (*melting curve*). Isto permitiu avaliar, quando fosse o caso, a formação de produtos inespecíficos e/ou contaminação. Após a reação, a quantificação relativa do RNAm de cada gene foi feita utilizando o *GAPDH* e *ACTB* como controles internos, seguindo o método de Δ^{Cq} . As curvas de dissociação dos três genes analisados mostraram que não havia presença de outras estruturas ou contaminação (figura 5).

Quadro 4: Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados na PCRq e tamanho do produto amplificado

Gene	Primers	Produto amplificado (pb)*
PGR	F: 5'- TGG TCC TTG GAG GTC GAA AA -3' R: 5'- CTG TGG GAG AGC AAC AGC AT -3'	79 pb
ESR1	F: 5'- GCT CCT TTC TCC TGC CCA TT -3' R: 5'- TCC TTC CTA GTT TTC TTC TTC TTG A -3'	86 pb
GREB1	F: 5'- TGG AGC CCT ATG GAA AGT TCT G -3' R: 5'- CTG CAG CTA CTC CAG TCA CC -3'	79 pb
GAPDH	F: 5'- CAA CAG CCT CAA GAT CAT CAG CAA -3' R: 5'- AGT GAT GGC ATG GAC TGT GGT CAT -3'	124 pb
ACTB	F: 5'- CGC CAA CAC AGT GCT GTC T -3' R: 5'- CAC GGA GTA CTT GCG CTC AG -3'	135 pb

*pb= pares de base

A quantificação relativa de cada gene foi possível pelo método de Δ^{Cq} . Um gráfico de amplificação, cujo eixo Y representa o sinal de fluorescência e o eixo X a temperatura em °C, foi desenhado. Observou-se discreta mudança no sinal de fluorescência no primeiro ciclo da reação de PCR, o que definiu a linha de base para o gráfico de amplificação. Um segundo nível de fluorescência, desta vez acima da linha de base, indicou o acúmulo de produto de PCR. Com isto, foi estabelecido um limiar de detecção de fluorescência fixo acima da linha de base durante a fase exponencial da PCR de 0,04.

O parâmetro Cq (limiar) foi definido como o número de ciclos no qual a fluorescência ultrapassou os limiares previamente fixados. A diferença entre as médias de três experimentos do gene de interesse e dos genes de referência (*GAPDH* e *ACTB*) foi calculada com auxílio do programa *Microsoft Excel* e o valor de quantificação relativa foi expresso como $2^{-\Delta Cq}$ (LIVAK E SCHIMITTGEN, 2001).

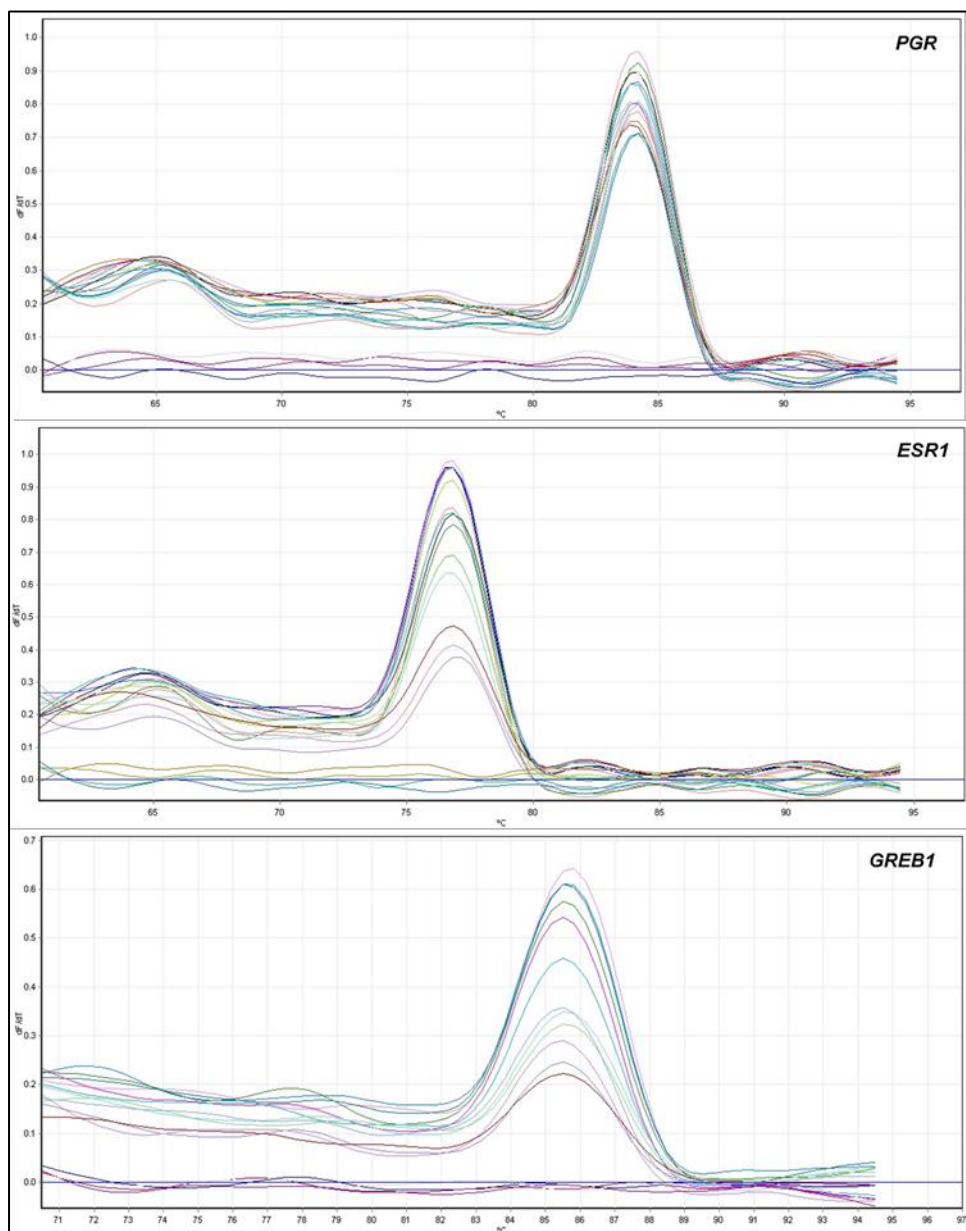


Figura 5: Curvas de Melting relativas a PGR, ESR1 e GREB1.

Não houve contaminação ou formação de estruturas secundárias. As abcissas (eixo x) representam a temperatura (°C) onde ocorreu o pico de fluorescência e as ordenadas (eixo y) representam o valor do sinal de fluorescência

3.7 Expressão Proteica por Imuno-Histoquímica

A expressão proteica dos genes selecionados conforme descrição prévia foi avaliada pela técnica de imuno-histoquímica (IH). As lâminas referentes a cada caso foram revistas pelo patologista associado ao projeto para identificação do bloco de parafina correspondente àquela que demonstrava a área mais representativa do tumor. Foram considerados ideais os cortes que apresentavam no mínimo 80% de células tumorais.

Para realização da IH, os blocos foram submetidos a cortes seriados de 3 µm de espessura por um micrótomo Leica® e as secções depositadas na superfície de lâminas previamente silanizadas segundo o protocolo descrito no anexo 4. Em seguida, estes cortes foram fixados em estufa a 60°C por um período mínimo de duas horas. Todo este procedimento foi realizado pelos técnicos da Divisão de Patologia do INCA (DIPAT) nas suas dependências.

Os anticorpos utilizados nesta etapa do estudo foram:

- Anti-estrogênio (ER), *rabbit monoclonal clone SP1, SPRING Bioscience®* - M3014.
- Anti-progesterona (PR), *DAKO® monoclonal mouse clone PgR636*.
- Anti-GREB1 (N-13), *rabbit polyclonal Santa Cruz Biotechnology, Inc®*.

A padronização destes anticorpos foi feita com cortes de tumor de mama positivo tanto para estrogênio como para progesterona, fornecidos pela DIPAT. Foram feitas as seguintes diluições:

- Anti-ER em Tris-EDTA pH=9,0: 1: 500; 1: 750; 1: 900; 1: 1.200.
- Anti-PR em Citrato pH=6,0: 1: 2.000; 1: 2.500; 1: 2.700; 1: 3.000.
- Anti-GREB1: 1: 50; 1: 100; 1: 200; 1: 400; 1: 800; 1: 1600, 1: 2.000 (com cada um dos dois tampões acima descritos).

Após avaliação independente de dois patologistas, as diluições e respectivos tampões de recuperação antigênica que melhor demonstraram a expressão proteica nos tumores foram:

- Anti-ER = 1: 900 em Tris-EDTA pH=9,0.
- Anti-PR = 1: 2.700 em Citrato pH=6,0.

- Anti-GREB1= 1: 200 Tris-EDTA pH=9,0.

Para a execução da metodologia da IH com cada um dos três anticorpos, os cortes foram desparafinizados em seis banhos de xilol, desidratados em seis banhos de álcool etílico absoluto e hidratados em água corrente por dois minutos.

Para a análise da expressão proteica, os cortes foram submetidos à recuperação antigênica em banho-maria a 98°C, por 30 minutos. Para prosseguir todo o restante da metodologia, foi utilizado o *kit* de IH *Novolink*[®]: após a recuperação antigênica, as lâminas arrefeceram por dez minutos e o tecido foi circundado com caneta hidrofóbica (DAKO[®]) a 4°C. Após a ciclagem dos tecidos, foi utilizado o tampão de lavagem TBS 10x para evitar seu ressecamento. Em seguida, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ 3% diluída em água destilada (incluso no *kit*) por dez minutos, retirado o excesso e feita lavagem com água destilada. Para finalização desta etapa, foi colocado TBS por mais três etapas de cinco minutos cada. O bloqueio das ligações inespecíficas foi realizado com o reagente *Protein Block* do *kit NovoLinkTM Max Polymer Detection System* por cinco minutos e, ao final, feita lavagem novamente com água destilada.

A marcação das proteínas com cada anticorpo foi feita com as respectivas diluições já mencionadas, durante período mínimo de 12 horas (“*overnight*”), a 4°C. Como controles positivo e negativo das reações para os três anticorpos, foram utilizados cortes do mesmo tumor de mama positivo para ER e PR que determinou a padronização. Após este período de incubação, o excesso do anticorpo foi retirado com água destilada e, mais uma vez, foi colocado TBS em três etapas de cinco minutos cada. A utilização do anticorpo secundário foi feita com o reagente *Post Primary* do *kit NovoLinkTM Max Polymer Detection System*[®] com duração de trinta minutos. Em seguida, nova lavagem com água destilada e TBS em três etapas de cinco minutos cada. Após, foi utilizado o *Polymer Detector* com o reagente *Novolink Polymer* do mesmo *kit*, durante também trinta minutos. Finalmente mais uma lavagem com água destilada e TBS em duas etapas de cinco minutos cada.

Após retirada do excesso de TBS, a revelação foi feita com diaminobenzidina (DAB *substrate kit*, Leica[®]), na proporção de 1 ml de diluente para 50 µL do cromógeno, por cinco minutos. Em seguida, a reação foi interrompida por lavagem com água corrente por quatro minutos; as lâminas foram contra-coradas com hematoxilina por 45 segundos e novamente lavadas com água corrente por dois

minutos; desidratadas com quatro banhos de álcool etílico absoluto; clarificadas com quatro banhos de xilol e, por fim, montadas com bálsamo sob lamínula.

Todas as lâminas foram avaliadas por dois patologistas independentes e classificadas conforme o grau de intensidade da marcação (forte ou fraca) e a porcentagem de células com marcação nuclear.

A classificação por porcentagem de células marcadas para ER e PR foi estabelecida conforme rotina utilizada na DIPAT:

+: até 20%

++: > 20% até 50%

+++ : > 50%

Para ER e PR a marcação é predominantemente nuclear em todos os casos considerados positivos (THE HUMAN PROTEIN ATLAS). Na prática clínica, à semelhança da rotina de tratamento do câncer de mama, a presença de marcação nuclear nos tumores de endométrio determina o prognóstico e a indicação de hormonioterapia (MARKMAN, 2005; DECRUZE *et al.*, 2007). Paralelamente, foi feita análise da intensidade de marcação de ER e PR (fraca ou forte). Entretanto, por se tratar de uma classificação meramente ilustrativa, apenas o *score* de porcentagem de células com marcação nuclear é considerado relevante para o diagnóstico.

Em GREB1 a marcação é mais heterogênea e predominantemente citoplasmática e membranar (THE HUMAN PROTEIN ATLAS). Entretanto, para interpretação da expressão de GREB1, foi observada a porcentagem de marcação nuclear, sendo considerada expressão positiva quando da presença de mais de 10% de marcação nuclear, conforme descrito por Hnatyszyn *et al.* e Pellegrini *et al.* (HNATYSZYN *et al.*, 2010; PELLEGRINI *et al.*, 2012).

A sequência das análises moleculares realizadas acima descritas está resumida no fluxograma representado na figura 6.

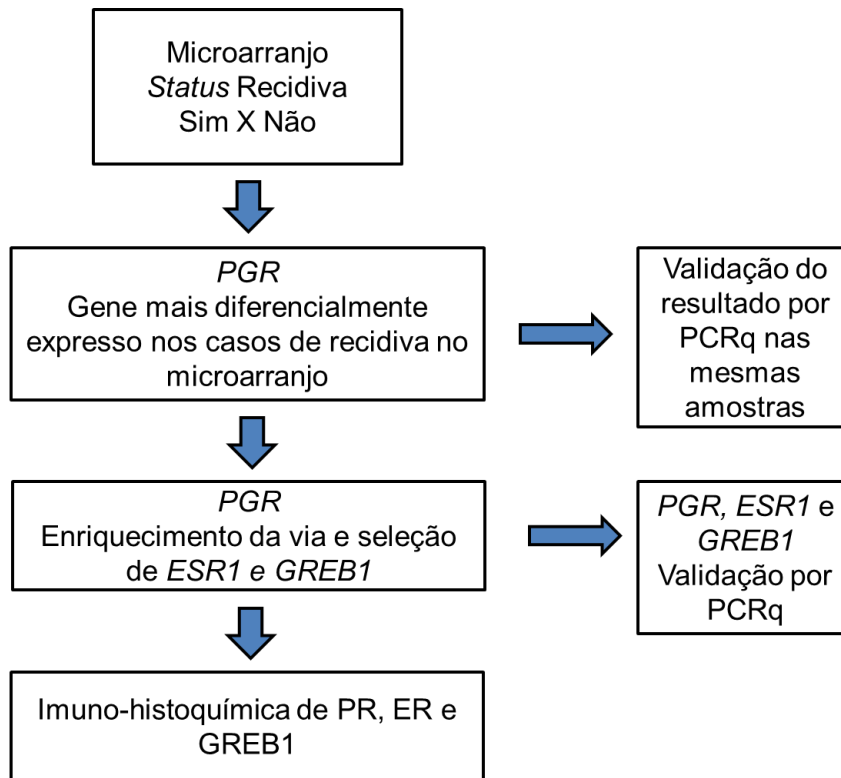


Figura 6: Fluxograma representativo da sequência das análises moleculares em amostras de adenocarcinoma Tipo I no Ec I (de *PGR*, *ESR1* e *GREB1*).

PGR= gene regulador do receptor de progesterona; *ESR1*= gene regulador do receptor de estrogênio; *GREB1*= *Growth Regulation by Estrogen in Breast Cancer 1 gene*. PR, ER e GREB1= proteínas codificadas por *PGR*, *ESR1* e *GREB1*, respectivamente.

3.8 Análises Estatísticas

Para a descrição dos dados clínico-patológicos foi realizada análise exploratória da distribuição das variáveis do estudo através da determinação de medidas de tendência central e de dispersão para as variáveis quantitativas, e de distribuições de frequência absoluta e relativa para as variáveis qualitativas. Para comparação das frequências entre os grupos estudados, foi aplicado teste de Qui-quadrado de Pearson, sendo considerados estatisticamente significantes os resultados com $p < 0,05$.

Para as estimativas de sobrevida univariada, foi utilizado o método de Kaplan-Meier e a significância estatística entre os grupos estudados foi calculada pelo teste de Log-Rank. Por fim, foi realizada a Regressão de Cox pelo método *stepwise forward*, com a introdução de cada variável no modelo em ordem crescente do p-

valor. Para a melhor abrangência possível de variáveis importantes, foram incluídas aquelas que mostraram $p < 0,20$ na análise univariada ou aquelas que são relacionadas a uma significância clínica que poderiam influenciar o desfecho. A magnitude de associação entre os dados clínico-patológicos foi determinada pelo *Hazard Ratio (HR)*. Foram mantidas no modelo final, aquelas variáveis que apresentaram o p -valor $< 0,05$. Todas as análises clínico-patológicas foram feitas por meio do pacote estatístico SPSS (*SPSS version, 20.0, Inc. – Chicago, IL-USA, 2004*).

Para a determinação dos genes diferencialmente expressos pelo microarranjo de DNA foi aplicado o método do LIMMA (*Linear Models for Microarray Data*) (WETTENHALL *et al.*, 2004). Os genes foram filtrados de acordo com *fold-change (FC)*: $FC > 3$ ou $FC < 0,33$. As análises foram feitas com o programa *R/Bioconductor*.

Para determinar se o percentual de expressão de cada anticorpo e a diferença de expressão entre casos de recidiva e casos que não apresentaram recidiva foram significativos, utilizou-se o teste de Qui-quadrado, com o *software GraphPad Prism 5.0*, sendo considerados estatisticamente significantes os resultados com $p < 0,05$.

Para as análises estatísticas dos resultados da PCR quantitativa foi utilizado o *software GraphPad Prism 5.0*. Para tal, foi realizado o teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar se os valores de expressão gênica das amostras eram paramétricos, isto é, se apresentaram uma distribuição normal. Como os valores não apresentaram distribuição normal, foi utilizado o teste de Mann-Whitney para cálculo da diferença de expressão e os resultados foram considerados significantes quando $p < 0,05$. Para avaliar se a expressão gênica dos genes analisados foi capaz de diferenciar pacientes que recidivaram daquelas que não recidivaram, foi construída uma curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) por meio da representação gráfica da sensibilidade (taxa de verdadeiro-positivo), contra 1- especificidade (taxa de falso-positivo).

Para estabelecer a associação dos dados moleculares foi utilizado o pacote estatístico SPSS (*SPSS version, 20.0, Inc. – Chicago, IL-USA, 2004*) com cálculo da regressão logística simples e múltipla. A associação entre as características moleculares e recidiva foi obtida pela *Odds Ratio (OR)* bruta e ajustada, considerando significativo o intervalo de confiança de 95%.

4. RESULTADOS ANÁLISES CLÍNICO-PATOLÓGICAS

4.1 Frequências da População Geral e por Período

De um total de 1.132 pacientes elegíveis para o estudo, a mediana de idade foi de 63,7 anos (19 a 99 anos). A análise descritiva das características clínicas da população ao diagnóstico de câncer de endométrio, por período de matrícula, encontra-se apresentada na tabela 1.

Quando comparadas por período de matrícula, observou-se uma diferença estatisticamente significativa em relação à faixa etária, onde ocorreu maior frequência de mulheres idosas diagnosticadas entre 2000 a 2005 ($p=0,027$). Foram registrados 14 casos em que ocorreu outro tipo de câncer antes do diagnóstico de câncer de endométrio, porém sem diferença entre os períodos. Já a ocorrência de um segundo tumor primário após o diagnóstico de câncer de endométrio foi maior no primeiro período ($p<0,001$) (tabela 1). Considerando o sítio do segundo tumor, a informação foi obtida em 60 casos (85,7%). Foram mais frequentes os tumores de: mama (28,0%), ovário (23,0%) e cólon (10,0%) (figura 7).

Das 1.132 pacientes, 284 (25,1%) eram diabéticas, 796 (70,3%) hipertensas, 106 (9,4%) apresentavam algum tipo de cardiopatia e 854 (75,5%) tinham sobrepeso ou algum grau de obesidade. Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os períodos.

A curetagem uterina fracionada (CUF) foi utilizada como o método para obtenção de amostra da lesão tumoral para confirmação do diagnóstico histopatológico em 345 (30,5%) pacientes, e a vídeo-histeroscopia em 730 (64,5%). Foi observada maior frequência da realização de vídeo-histeroscopia no segundo período de estudo ($p<0,001$) (tabela 1).

Tabela 1: Análise descritiva das características clínicas da população ao diagnóstico de câncer de endométrio, por período de matrícula (n=1.132)

Variável	Total (%) (n=1.132)	2000 a 2005 (%) (n=544)	2006 a 2011 (%) (n=588)	p valor *
Idade				
< 65	619 (54,7)	279 (51,3)	340 (57,8)	0,027
≥ 65	513 (45,3)	265 (48,7)	248 (42,2)	
Sem informação	0	0	0	
Câncer prévio				
Sim	14 (1,3)	9 (1,7)	5 (0,9)	0,204
Não	1.105 (97,6)	522 (96,0)	583 (99,1)	
Sem informação	13 (1,1)	13 (2,4)	0	
2º tumor primário				
Sim	70 (6,2)	48 (8,8)	22 (3,7)	<0,001
Não	1.062 (93,8)	496 (91,2)	566 (96,3)	
Sem informação	0	0	0	
Diabetes				
Sim	284 (25,1)	129 (23,7)	155 (26,4)	0,332
Não	839 (74,1)	409 (75,2)	430 (73,1)	
Sem informação	9 (0,8)	6 (1,1)	3 (0,5)	
Cardiopatía				
Sim	106 (9,4)	58 (10,7)	48 (8,2)	0,132
Não	1.014 (89,6)	477 (87,7)	537 (91,3)	
Sem informação	12 (1,0)	9 (1,6)	3 (0,5)	
Hipertensão				
Sim	796 (70,3)	368 (67,7)	428 (72,8)	0,065
Não	329 (29,1)	172 (31,6)	157 (26,7)	
Sem informação	7 (0,6)	4 (0,7)	3 (0,5)	
Uso de tamoxifen				
Sim	3 (0,3)	2 (0,4)	1 (0,2)	0,516
Não	1.121 (99,0)	537 (98,7)	584 (99,3)	
Sem informação	8 (0,7)	5 (0,9)	3 (0,5)	
IMC				
Adequado	191 (16,9)	91 (16,7)	100 (17,0)	0,091
Sobrepeso	337 (29,8)	160 (29,4)	177 (30,1)	
Obesidade	517 (45,7)	211 (38,8)	306 (52,0)	
Sem informação	87 (7,6)	82 (15,1)	5 (0,9)	
Método Diagnóstico				
CUF	345 (30,5)	237 (43,6)	108 (18,4)	<0,001**
Vídeo - Histeroscopia	730 (64,5)	273 (50,2)	457 (77,7)	
Ultrassonografia	4 (0,3)	4 (0,7)	0	
Sem informação	53 (4,7)	30 (5,5)	23 (3,9)	

*Calculado somente com os valores conhecidos; **Calculado sem os 4 casos de diagnóstico feito com ultrassonografia; IMC=Índice de Massa Corporal; CUF= curetagem uterina fracionada

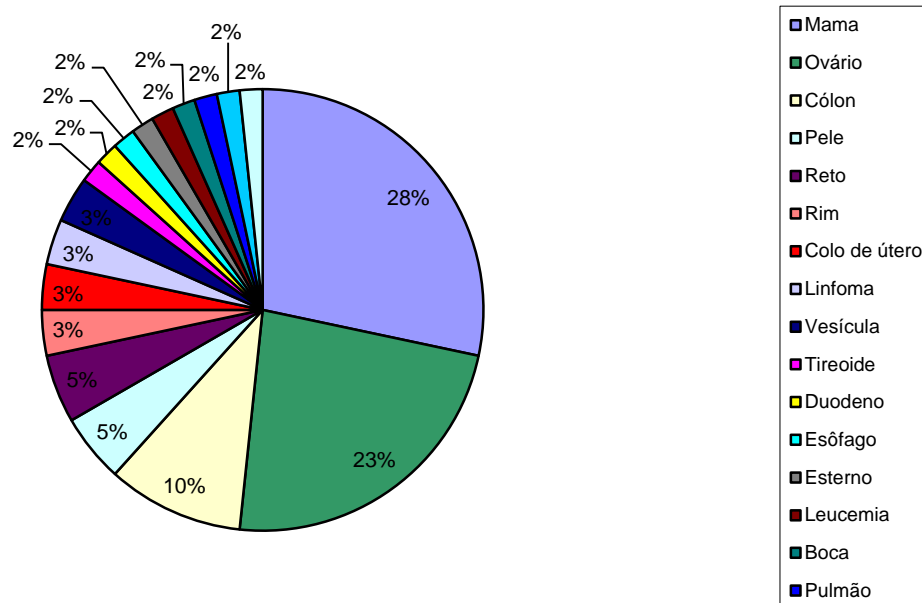


Figura 7: Gráfico representativo da frequência dos sítios de segundo tumor primário (n=60)

A análise descritiva das características relacionadas à história ginecológica da população, por período de matrícula, encontra-se apresentada na tabela 2.

Sangramento vaginal foi o primeiro sintoma apresentado pela grande maioria (89,7%), em ambos períodos analisados. O uso de terapia de reposição hormonal (TRH) foi pouco frequente (6,9%), sendo ainda menos utilizada no segundo período de estudo ($p < 0,001$). Mulheres com menarca até os 11 anos e menopausa após os 45 foram mais frequentes no grupo estudado, porém sem diferença entre os períodos. Em 94 mulheres (8,3%) a doença se manifestou na pré-menopausa com frequência menor no primeiro período de inclusão ($p = 0,006$). A maioria não era nulípara (85,2%) e tinha entre 1 e 3 gestações, sem diferença entre os períodos.

Tabela 2: Análise descritiva das características relacionadas à história ginecológica da população, por período de matrícula (n=1.132)

Variável	Total (%) (n=1.132)	2000 a 2005 (%) (n=544)	2006 a 2011 (%) (n=588)	p valor *
1º sintoma				
Assintomática	10 (0,9)	10 (1,8)	0	0,001
Achado radiol.	24 (2,1)	8 (1,5)	16 (2,7)	
Dor	26 (2,3)	16 (2,9)	10 (1,7)	
Sangramento	1.015 (89,7)	480 (88,2)	535 (91,0)	
Outros	44 (3,9)	27 (5,0)	17 (2,9)	
Sem informação	13 (1,1)	3 (0,6)	10 (1,7)	
Uso ACO				
Sim	299 (26,4)	89 (16,4)	210 (35,7)	0,097
Não	464 (41,0)	165 (30,3)	299 (50,9)	
Sem informação	369 (32,6)	290 (53,3)	79 (13,4)	
Uso TRH				
Sim	78 (6,9)	40 (7,4)	38 (6,5)	<0,001
Não	653 (57,7)	185 (34,0)	468 (79,6)	
Sem informação	401 (35,4)	319 (58,6)	82 (13,9)	
Idade menarca				
≤ 11 anos	233 (20,6)	117 (21,5)	116 (19,7)	0,240
> 11anos	662 (58,5)	362 (66,5)	300 (51,0)	
Sem informação	237 (20,9)	65 (12,0)	172 (29,3)	
Idade menopausa				
≤ 45 anos	150 (13,3)	84 (15,4)	66 (11,2)	0,991
> 45 anos	628 (55,5)	352 (64,7)	276 (46,9)	
Sem informação	354 (31,2)	108 (19,9)	246 (41,9)	
Pré-menopausa				
Sim	94 (8,3)	41 (7,6)	53 (9,0)	0,006
Não	842 (74,4)	492 (90,4)	350 (59,5)	
Sem informação	196 (17,3)	11 (2,0)	185 (31,5)	
Gestação				
Sim	964 (85,2)	468 (86,0)	496 (84,3)	0,153
Não	129 (11,4)	54 (10,0)	75 (12,8)	
Sem informação	39 (3,4)	22 (4,0)	17 (2,9)	
Nº gestações				
0	129 (11,4)	54 (9,9)	75 (12,8)	0,338
1 a 3	531 (46,9)	255 (46,9)	276 (46,9)	
≥ 4	433 (38,3)	213 (39,2)	220 (37,4)	
Sem informação	39 (3,4)	22 (4,0)	17 (2,9)	

*Calculado somente com os valores conhecidos; ACO=Anticoncepcional Oral; TRH= Terapia de Reposição Hormonal

A mediana de tempo entre o início do primeiro sintoma de câncer e o diagnóstico foi de 178 dias (0 - 4.437). Na tabela 3 estão descritas as características relacionadas ao tratamento da população, por período de matrícula.

Na maior parte da população (83,6%) o intervalo de tempo entre diagnóstico e o início do tratamento foi maior que 60 dias, com média de 109 dias (DP 73,28). Essa frequência foi ainda maior no segundo período de estudo ($p < 0,001$). A maioria das pacientes apresentava PS 0 (8,5%) e PS 1 (86,0%) na ocasião da matrícula, e houve diferença significativa entre os dois períodos ($p = 0,002$). Em 34,6% dos casos a cirurgia foi incompleta, sem diferença dessa frequência entre os períodos.

Tabela 3: Análise descritiva das características relacionadas ao tratamento da população, por período de matrícula (n=1.132)

Variável	n* (%)	2000 a 2005	2006 a 2011	p valor *
Intervalo entre sintoma e diagnóstico				
≥ 180 dias	454 (40,1)	201 (36,9)	253 (43,0)	0,310
< 180 dias	462 (40,8)	220 (40,4)	242 (41,2)	
Sem informação	216 (19,1)	123 (22,7)	93 (15,8)	
Intervalo entre diagnóstico e cirurgia				
≤ 60 dias	157 (13,9)	111 (20,4)	46 (7,8)	<0,001
> 60 dias	946 (83,6)	410 (75,4)	536 (91,2)	
Sem informação	29 (2,5)	23 (4,2)	6 (1,0)	
PS				
0	96 (8,5)	29 (5,3)	67 (11,4)	0,002**
1	973 (86,0)	488 (89,7)	485 (82,5)	
2	34 (3,0)	14 (2,6)	20 (3,4)	
3	9 (0,8)	4 (0,7)	5 (0,9)	
4	1 (0,1)	1 (0,2)	0	
Sem informação	19 (1,7)	8 (1,5)	11 (1,9)	
Cirurgia incompleta				
Sim	392 (34,6)	193 (35,5)	199 (33,8)	0,576
Não	737 (65,1)	350 (64,3)	387 (65,8)	
Sem informação	3 (0,3)	1 (0,2)	2 (0,4)	

*Calculado somente com os valores conhecidos; **Calculado sem o caso de PS 4;

PS=Performance Status

Na tabela 4 estão descritas as características anátomo-patológicas da população, por período de matrícula.

Foi constatada maior frequência de invasão miometrial superficial (< 50%) e de peças cirúrgicas sem êmbolos neoplásicos nos dois períodos, sem diferença estatisticamente significativa entre eles. Os casos de adenocarcinoma endometriode foram mais frequentes e com maior ocorrência no segundo período de estudo ($p < 0,001$). O diagnóstico de câncer de endométrio foi feito em estadiamentos mais precoces (I e II), com baixo grau de diferenciação e sem doença residual macroscópica (R0), não havendo diferença entre os períodos.

A análise descritiva dos fatores prognósticos, segundo o período de estudo, encontra-se descrita na tabela 5.

A maior parte da população não realizou pesquisa dos receptores hormonais no tumor da peça cirúrgica (93,7%). Foram registrados 190 casos de recidiva (16,8%) com ocorrência maior no primeiro período ($p < 0,001$). As recidivas foram mais frequentes em sítios à distância em ambos períodos. Entretanto, a recidiva loco-regional foi mais frequente no segundo em comparação ao primeiro (32,1% e 2,7%, respectivamente) ($p < 0,001$). Foram registrados 264 óbitos (23,3%), sendo 162 por câncer de endométrio e 102 por outras causas. A ocorrência foi maior no primeiro período ($p < 0,001$).

Tabela 4: Análise descritiva das características anátomo-patológicas da população, por período de matrícula (n=1.132)

Variável	n* (%)	2000 a 2005	2006 a 2011	p valor *
Invasão miometrial				
< 50%	592 (52,3)	261 (48,0)	331 (56,3)	0,124
≥ 50%	303 (26,8)	150 (27,6)	153 (26,0)	
Sem informação	237 (20,9)	133 (24,4)	104 (17,7)	
Êmbolos neoplásicos				
Sim	214 (18,9)	117 (21,5)	97 (16,5)	0,123
Não	867 (76,6)	423 (77,8)	444 (75,5)	
Sem informação	51 (4,5)	4 (0,7)	47 (8,0)	
Subtipo histológico				
Endometrióide	991 (87,5)	445 (81,8)	546 (92,9)	<0,001**
Seroso	81 (7,2)	54 (9,9)	27 (4,6)	
Células Claras	41 (3,6)	30 (5,5)	11 (1,9)	
Adenoescamoso	4 (0,4)	3 (0,6)	1 (0,1)	
Sem informação	15 (1,3)	12 (2,2)	3 (0,5)	
FIGO				
I	769 (67,9)	378 (69,5)	391 (66,5)	0,062
II	154 (13,6)	59 (10,8)	95 (16,1)	
III	157 (13,9)	82 (15,1)	75 (12,8)	
IV	49 (4,3)	23 (4,2)	26 (4,4)	
Sem informação	3 (0,3)	2 (0,4)	1 (0,2)	
Grau diferenciação				
1	353 (31,2)	161 (29,6)	192 (32,7)	0,566
2	436 (38,5)	213 (39,2)	223 (37,9)	
3	329 (29,1)	162 (29,8)	167 (28,4)	
Sem informação	14 (1,2)	8 (1,4)	6 (1,0)	
Tamanho tumor (cm)				
≤ 2,0	95 (8,4)	49 (9,0)	46 (7,8)	0,150
> 2,0 e ≤ 5,0	534 (47,2)	248 (45,6)	286 (48,6)	
> 5,0	386 (34,1)	161 (29,6)	225 (38,3)	
Sem informação	117 (10,3)	86 (15,8)	31 (5,3)	
Status Cirurgia				
R0	1.027 (90,7)	464 (85,3)	563 (95,7)	0,061
R1 + R2	57 (5,0)	33 (6,1)	24 (4,1)	
Sem informação	48 (4,3)	47 (8,6)	1 (0,2)	

*Calculado somente com os valores conhecidos; **Calculado sem os casos de adenoescamoso

Tabela 5: Análise descritiva dos fatores prognósticos da população, por período de matrícula (n=1.132)

Variável	n* (%)	2000 a 2005	2006 a 2011	p valor *
Receptores hormonais				
Sim	71 (6,3)	36 (6,6)	35 (6,0)	0,645
Não	1.061 (93,7)	508 (93,4)	553 (94,0)	
Sem informação	0	0	0	
Recidiva				
Sim	190 (16,8)	112 (20,6)	78 (13,3)	<0,001
Não	942 (83,2)	432 (79,4)	510 (86,7)	
Sem informação	0	0	0	
Local recidiva **				
Loco-regional	28 (14,7)	3 (2,7)	25 (32,1)	<0,001
À distância	118 (62,1)	70 (62,5)	48 (61,5)	
Ambos	9 (4,7)	4 (3,6)	5 (6,4)	
Sem informação	35 (18,4)	35 (31,3)	0	
Óbito				
Por câncer de endométrio	162 (14,3)	105 (19,3)	57 (9,7)	<0,001
Por outras causas	102 (9,0)	59 (10,8)	43 (7,3)	
Não	868 (76,7)	380 (69,9)	488 (83,0)	
Sem informação	0	0	0	

*Calculado somente com os valores conhecidos; **Frequências relativas aos casos em que ocorreu recidiva (n=190).

4.2 Frequências da População por Subtipo Histológico

A análise descritiva das características clínicas da população ao diagnóstico de câncer de endométrio, por subtipo histológico, encontra-se apresentada na tabela 6.

Novamente observou-se uma diferença estatisticamente significativa em relação à faixa etária, onde ocorreu maior frequência de tumores do Tipo I em mulheres mais jovens e do Tipo II em mulheres idosas ($p=0,011$). A ocorrência de um segundo tumor primário após o diagnóstico de câncer de endométrio foi baixa em ambos grupos e não houve diferença entre eles. Da mesma forma não houve diferença na frequência de diabetes, cardiopatia e hipertensão. Entretanto, entre as 1.113 pacientes analisadas, apenas 16,1% daquelas diagnosticadas como adenocarcinoma Tipo I apresentavam IMC adequado, ao passo que 21,3% das portadoras do Tipo II não tinham sobrepeso ou algum grau de obesidade ($p=0,010$).

Para ambos subtipos a vídeo-histeroscopia foi o método mais frequente para obtenção de amostra da lesão tumoral para confirmação do diagnóstico histopatológico em comparação à CUF ($p=0,034$).

A análise descritiva das características relacionadas à história ginecológica da população, por subtipo histológico, encontra-se apresentada na tabela 7.

Sangramento vaginal foi o primeiro sintoma apresentado pela grande maioria em ambos subtipos: por 893 (90,1%) pacientes no Tipo I e 107 (87,7%) no Tipo II . O uso de anticoncepcional oral (ACO) foi maior nas mulheres que desenvolveram adenocarcinoma endometriode, porém a diferença não foi significativa entre os grupos. O uso de TRH foi pouco frequente e também não houve diferença. Tumores do Tipo I foram mais frequentes em mulheres que tiveram a menarca ≤ 11 anos e os do Tipo II em mulheres que tiveram a menarca acima de 11 anos ($p=0,047$). Não houve diferença significativa da idade da menopausa, do *status* gestacional e tão pouco do número de gestações; porém, em 89 mulheres (9,0%) o tumor do Tipo I se manifestou na pré-menopausa em comparação aos 4 (3,3%) casos do Tipo II ($p=0,010$).

Tabela 6: Análise descritiva das características clínicas da população ao diagnóstico de câncer de endométrio, por subtipo histológico (n=1.113)

Variável	Tipo I (n/ %) (n=991)	Tipo II (n/ %) (n=122)	p valor * (I / II)
Idade			
< 65	559 (56,4)	54 (44,3)	0,011
≥ 65	432 (43,6)	68 (55,7)	
Sem informação	0	0	
Câncer prévio			
Sim	11 (1,1)	3 (2,5)	0,198
Não	970 (98,9)	116 (97,5)	
Sem informação	0	0	
2º tumor primário			
Sim	61 (6,2)	8 (6,6)	0,862
Não	930 (93,8)	114 (93,4)	
Sem informação	0	0	
Diabetes			
Sim	258 (26,0)	23 (18,9)	0,086
Não	726 (73,3)	98 (80,3)	
Sem informação	7 (0,7)	1 (0,8)	
Cardiopatia			
Sim	90 (9,1)	13 (10,7)	0,576
Não	891 (89,9)	108 (88,5)	
Sem informação	10 (1,0)	1 (0,8)	
Hipertensão			
Sim	694 (70,0)	91 (74,6)	0,270
Não	292 (29,5)	30 (24,6)	
Sem informação	5 (0,5)	1 (0,8)	
Uso de Tamoxifen			
Sim	3 (0,3)	0 (0)	0,543
Não	982 (99,1)	121 (99,2)	
Sem informação	6 (0,6)	1 (0,8)	
IMC			
Adequado	160 (16,1)	26 (21,3)	0,010
Sobrepeso	284 (28,7)	46 (37,7)	
Obesidade	471 (47,5)	41 (33,6)	
Sem informação	76 (7,7)	9 (7,4)	
Método Diagnóstico			
CUF	290 (29,3)	47 (38,5)	0,034
Vídeo-histeroscopia	657 (66,3)	65 (53,3)	
Ultrassonografia	3 (0,3)	1 (0,8)	
Sem informação	41 (4,1)	9 (7,4)	

* Calculado somente com os valores conhecidos; IMC=Índice de Massa Corporal; CUF= curetagem uterina fracionada

Tabela 7: Análise descritiva das características relacionadas à história ginecológica da população, por subtipo histológico (n=1.113)

Variável	Tipo I (n/ %) (n=991)	Tipo II (n/ %) (n=122)	p valor * (I / II)
1º sintoma			
Assintomática	10 (1,0)	0 (0,0)	
Achado radiol.	20 (2,0)	3 (2,5)	
Dor	20 (2,0)	5 (4,1)	0,474
Sangramento	893 (90,1)	107 (87,7)	
Outros	38 (3,8)	5 (4,1)	
Sem informação	10 (1,1)	2 (1,6)	
Uso ACO			
Sim	275 (27,7)	20 (16,4)	0,055
Não	407 (41,1)	50 (41,0)	
Sem informação	309 (31,2)	52 (42,6)	
Uso TRH			
Sim	71 (7,2)	6 (4,9)	0,859
Não	590 (59,5)	54 (44,3)	
Sem informação	330 (33,3)	62 (50,8)	
Idade menarca			
≤ 11 anos	210 (21,2)	21 (17,2)	0,047
> 11anos	557 (56,2)	92 (75,4)	
Sem informação	224 (22,6)	9 (7,4)	
Idade menopausa			
≤ 45 anos	127 (12,8)	23 (18,9)	0,498
> 45 anos	532 (53,7)	81 (66,4)	
Sem informação	332 (33,5)	18 (14,8)	
Pré-menopausa			
Sim	89 (9,0)	4 (3,3)	0,010
Não	713 (71,9)	113 (92,6)	
Sem informação	189 (19,1)	5 (4,1)	
Gestação			
Sim	842 (85,0)	107 (87,7)	0,362
Não	117 (11,8)	11 (9,0)	
Sem informação	32 (3,2)	4 (3,3)	
Nº gestações			
0	117 (11,8)	11 (9,0)	
1 a 3	472 (47,6)	52 (42,6)	0,221
≥ 4	370 (37,3)	55 (45,1)	
Sem informação	32 (3,3)	4 (3,3)	

* Calculado somente com os valores conhecidos; ACO= Anticoncepcional Oral; TRH= Terapia de Reposição Hormonal

A mediana de tempo entre o início do primeiro sintoma de câncer e o diagnóstico foi de 178 dias (0 - 4.437). Na tabela 8 estão descritas as características relacionadas ao tratamento da população, por subtipo histológico.

A maior parte das pacientes de ambos grupos apresentava PS 0 ou PS 1 na ocasião da matrícula e foi submetida ao tratamento após 60 dias do diagnóstico. A frequência de cirurgia incompleta foi maior naquelas com tumor Tipo II. Entretanto, não foi observada diferença significativa destas variáveis entre os dois subtipos.

Tabela 8: - Análise descritiva das características relacionadas ao tratamento da população, por subtipo histológico (n=1.113)

Variável	Tipo I (n/ %) (n=991)	Tipo II (n/ %) (n=122)	p valor * (I / II)
Intervalo entre sintoma e diagnóstico			
≥ 180 dias	404 (40,8)	42 (34,4)	0,160
< 180 dias	398 (40,2)	56 (45,9)	
Sem informação	189 (19,0)	24 (19,7)	
Intervalo entre diagnóstico e cirurgia			
≤ 60 dias	137 (13,8)	15 (12,3)	0,670
> 60 dias	831 (83,9)	103 (84,4)	
Sem informação	23 (2,3)	4 (3,3)	
PS**			
0	91 (9,2)	4 (3,3)	0,053
1	849 (85,7)	107 (87,7)	
2	30 (3,0)	4 (3,3)	
3	6 (0,6)	3 (2,4)	
4	1 (0,1)	0 (0)	
Sem informação	14 (1,4)	4 (3,3)	
Cir. incompleta			
Sim	336 (33,9)	50 (41,0)	0,109
Não	653 (65,9)	71 (58,2)	
Sem informação	2 (0,2)	1 (0,8)	

*Calculado somente com os valores conhecidos; **Calculado sem o caso de PS 4; PS=*Performance Status*

Na tabela 9, estão descritas as características anátomo-patológicas da população, por subtipo histológico.

Foi constatada maior frequência de invasão miometrial superficial (< 50%) e menor presença de êmbolos neoplásicos nas pacientes submetidas ao tratamento de adenocarcinoma endometriode, com diferença estatisticamente significativa entre os dois subtipos ($p=0,003$ e $p<0,001$, respectivamente). O diagnóstico de câncer de endométrio foi feito em estadiamentos mais precoces (I e II) e sem doença residual macroscópica (R0) nos tumores Tipo I; nos tumores Tipo II houve mais casos diagnosticados em estádios avançados (III e IV) e com doença residual na cirurgia ($p<0,001$ em ambas variáveis).

A análise descritiva dos fatores prognósticos, segundo o subtipo histológico, encontra-se descrita na tabela 10.

A maior parte da população, independente do subtipo histológico, não realizou pesquisa dos receptores hormonais no tumor da peça cirúrgica. As recidivas foram mais frequentes nos casos do Tipo II (42,6%) em comparação aos do Tipo I (13,6%) ($p<0,001$). A recorrência foi mais frequente em sítios à distância em ambos subtipos. Entretanto, a recidiva loco-regional foi mais frequente nas pacientes com tumores Tipo I, sem diferença significativa. A ocorrência de óbitos foi menor nos casos do adenocarcinoma Tipo I. Foram registrados 190 óbitos (19,2%) no Tipo I, sendo 104 por câncer de endométrio e 86 por outras causas. No Tipo II, houve 68 óbitos (65,8%), sendo 55 por câncer de endométrio e 13 por outras causas ($p<0,001$).

Tabela 9: Análise descritiva das características anátomo-patológicas da população, por subtipo histológico (n=1.113)

Variável	Tipo I (n/ %) (n=991)	Tipo II (n/ %) (n=122)	p valor * (I / II)
Invasão miometrial			
< 50%	541 (54,6)	44 (36,1)	0,003
≥ 50%	258 (26,0)	41 (33,6)	
Sem informação	192 (19,4)	37 (30,3)	
Êmbolos neoplásicos			
Sim	170 (17,2)	40 (32,8)	<0,001
Não	773 (78,0)	80 (65,6)	
Sem informação	48 (4,8)	2 (1,6)	
FIGO			
I	708 (71,5)	50 (40,9)	<0,001
II	133 (13,4)	18 (14,8)	
III	117 (11,8)	36 (29,5)	
IV	31 (3,1)	18 (14,8)	
Sem informação	2 (0,2)	0 (0)	
Tamanho tumor (cm)			
≤ 2,0	87 (8,8)	6 (4,9)	0,147
> 2,0 e ≤ 5,0	469 (47,3)	58 (47,5)	
> 5,0	329 (33,2)	51 (41,8)	
Sem informação	106 (10,7)	7 (5,7)	
Status Cirurgia			
R0	913 (92,2)	96 (78,7)	<0,001
R1 + R2	37 (3,7)	19 (15,6)	
Sem informação	41 (4,1)	7 (5,7)	

*Calculado somente com os valores conhecidos

Tabela 10: Análise descritiva dos fatores prognósticos da população, por subtipo histológico (n=1.113)

Variável	Tipo I (n/ %) (n=991)	Tipo II (n/ %) (n=122)	p valor * (I / II)
Receptores hormonais			
Sim	58 (5,9)	12 (9,8)	0,087
Não	933 (94,1)	110 (90,2)	
Sem informação	0 (0)	0 (0)	
Recidiva			
Sim	135 (13,6)	52 (42,6)	<0,001
Não	856 (86,4)	70 (57,4)	
Sem informação	0 (0)	0 (0)	
Local recidiva			
Loco-regional	23 (17,0)	5 (9,6)	0,363
À distância	81 (60,0)	36 (69,2)	
Ambos	7 (5,2)	2 (3,9)	
Sem informação	24 (17,8)	9 (17,3)	
Óbito			
Por câncer de endométrio	104 (10,5)	55 (45,1)	<0,001
Por outras causas	86 (8,7)	13 (10,7)	
Não	801 (80,8)	54 (44,2)	
Sem informação	0 (0)	0 (0)	

*Calculado somente com os valores conhecidos; **Frequências relativas aos casos em que ocorreu recidiva (n=190)

4.3 Sobrevida Livre de Doença – Análise Univariada da População Geral

Para análise de sobrevida livre de doença (SLD), o tempo médio de seguimento das 1.038 pacientes submetidas ao tratamento de “adenocarcinoma de endométrio” foi de 86,7 meses (IC 95% 83,70 - 89,71) (Figura 8).

A análise de SLD univariada das características clínicas da população encontra-se na tabela 11. Apenas o *status* nutricional foi estatisticamente associado a sobrevida livre de doença (p=0,029).

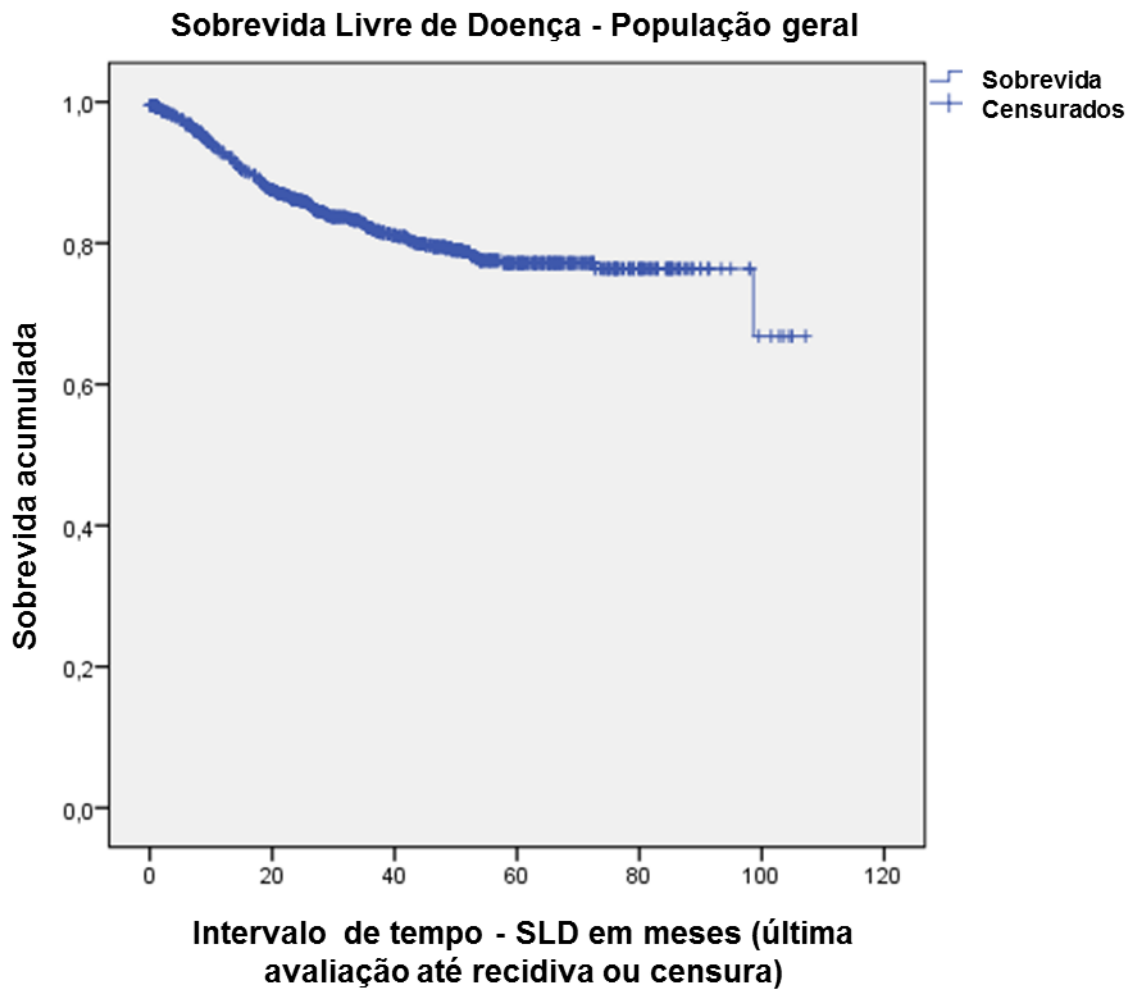


Figura 8: Curva de sobrevida livre de doença da população geral (n=1.038)

Tabela 11: Análise de Kaplan Meier da sobrevida livre de doença conforme as características clínicas da população geral (n=1.038)

Variável	Nº Eventos	Média	Tempo de sobrevida			Log Rank*
			DP	IC 95%	(Mín/máx)	
Idade						
< 65	89	89,224	1,737	85,818	92,629	0,057
≥ 65	85	80,664	2,250	76,255	85,073	
Total	174	86,706	1,534	83,700	89,713	
Diabetes						
Sim	36	86,659	2,480	81,798	91,519	0,187
Não	136	86,424	1,601	83,286	89,561	
Total	172	86,827	1,535	83,819	89,835	
Cardiopatia						
Sim	13	76,370	3,734	69,051	83,690	0,783
Não	158	86,797	1,588	83,685	89,908	
Total	171	86,873	1,536	83,862	89,883	
Hipertensão						
Sim	127	84,403	1,718	81,036	87,770	0,241
Não	46	89,106	2,480	84,246	93,967	
Total	173	86,741	1,535	83,732	89,751	
IMC						
Adequado	34	81,912	3,271	75,500	88,324	0,029
Sobrepeso	60	83,700	2,746	78,317	89,082	
Obesidade	62	85,089	1,708	81,740	88,437	
Total	156	87,083	1,626	83,896	90,270	

*Calculado somente com os valores conhecidos; IMC=Índice de Massa Corporal

A análise de SLD univariada conforme as características relacionadas à história ginecológica da população é apresentada na tabela 12. O primeiro sintoma da doença, o uso de ACO e TRH, a idade da menopausa, história de gestação e o número de gestações não foram estaticamente significantes. A idade da menarca ($p=0,025$) e o diagnóstico da doença na pré-menopausa ($p=0,004$) apresentaram associação com o tempo de sobrevida livre de doença.

Tabela 12: Análise de Kaplan Meier da sobrevida livre de doença conforme as características relacionadas à história ginecológica da população geral (n=1.038)

Variável	Nº Eventos	Média	Tempo de sobrevida			Log Rank*
			DP	IC 95% (mín/máx)		
1º sintoma						
Outros	10	73,858	3,408	67,179	80,537	0,441
Sangramento	163	86,232	1,594	83,107	89,357	
Total	173	86,615	1,541	83,595	89,634	
Uso ACO						
Sim	37	77,597	2,108	73,466	81,729	0,188
Não	73	85,462	2,059	81,425	89,498	
Total	110	86,436	1,634	83,234	89,638	
Uso TRH						
Sim	10	77,195	3,671	70,000	84,390	0,784
Não	88	87,491	1,756	84,050	90,933	
Total	98	87,686	1,639	84,474	90,898	
Idade menarca						
≤ 11 anos	22	92,940	2,405	88,226	97,655	0,025
> 11anos	105	86,741	1,789	83,235	90,246	
Total	127	88,749	1,486	85,837	91,661	
Idade menopausa						
≤ 45 anos	28	79,508	4,124	71,425	87,592	0,153
> 45 anos	95	88,176	1,752	84,741	91,610	
Total	123	86,785	1,647	83,558	90,013	
Pré-menopausa						
Sim	5	86,121	2,299	81,615	90,626	0,004
Não	135	85,669	1,747	82,245	89,093	
Total	140	87,174	1,639	83,962	90,387	
Gestação						
Sim	150	86,773	1,619	83,600	89,947	0,370
Não	21	71,336	3,394	64,684	77,989	
Total	171	86,481	1,555	83,434	89,529	
Nº gestações						
0	21	71,336	3,394	64,684	77,989	0,087
1 a 3	73	89,845	1,871	86,177	93,512	
≥ 4	77	82,112	2,343	77,519	86,705	
Total	171	86,481	1,555	83,434	89,529	

*Calculado somente com os valores conhecidos; ACO= Anticoncepcional Oral; TRH= Terapia de Reposição Hormonal

A análise de SLD univariada conforme as características relacionadas ao tratamento da população e as características anátomo-patológicas é apresentada na tabelas 13 e 14, respectivamente.

A única variável do tratamento associada à SLD foi a realização de "cirurgia incompleta" ($p=0,016$). Todos os critérios histopatológicos prognósticos (invasão miometrial, presença de êmbolos neoplásicos, subtipo histológico, grau de diferenciação e tamanho do tumor), estadiamento pela FIGO e *status* da cirurgia foram estatisticamente significantes ($p<0,001$).

Tabela 13: Análise de Kaplan Meier da sobrevida livre de doença conforme características relacionadas ao tratamento da população geral (n=1.038)

Variável	Nº Eventos	Tempo de sobrevida				Log Rank*
		Média	DP	IC 95% (mín/máx)		
Intervalo entre sintoma e diagnóstico						
≥ 180 dias	65	85,712	2,187	81,424	89,999	0,142
< 180 dias	84	82,846	2,699	77,556	88,136	
Total	149	85,150	1,888	81,451	88,850	
Intervalo entre diagnóstico e cirurgia						
≤ 60 dias	27	84,283	3,446	77,528	91,037	0,606
> 60 dias	145	86,219	1,772	82,745	89,692	
Total	172	86,340	1,602	83,199	89,480	
PS						
0	13	73,168	3,118	67,056	79,279	0,170
1	150	87,019	1,609	83,866	90,172	
≥2	7	50,682	6,584	37,777	63,587	
Total	170	86,824	1,542	83,801	89,846	
Cirurgia incompleta						
Sim	70	82,092	2,357	77,473	86,712	0,016
Não	103	88,164	1,963	84,317	92,012	
Total	173	86,762	1,535	83,753	89,770	
Período de tratamento						
2000 a 2005	99	85,606	1,979	81,728	89,484	0,315
2006 a 2011	75	67,461	1,480	64,561	70,361	
Total	174	86,706	1,534	83,700	89,713	

*Calculado somente com os valores conhecidos; PS=*Performance Status*

Tabela 14: Análise de Kaplan Meier da sobrevida livre de doença conforme características anátomo-patológicas da população geral (n=1.038)

Variável	Nº Eventos	Média	Tempo de sobrevida			Log Rank*
			DP	IC 95%	(mín/máx)	
Invasão miometrial						
< 50%	40	90,970	1,271	88,479	93,460	<0,001
≥ 50%	57	83,578	2,737	78,213	88,942	
Total	97	91,935	1,627	88,747	95,124	
Êmbolos neoplásicos						
Sim	71	63,109	3,649	55,958	70,261	<0,001
Não	94	92,040	1,628	88,848	95,231	
Total	165	86,823	1,559	83,768	89,878	
Subtipo						
Endometriode	126	88,075	1,482	85,170	90,980	<0,001
Seroso+céls. Claras	45	62,745	4,881	53,179	72,311	
Total	171	86,626	1,549	83,591	89,662	
FIGO						
I	60	96,027	1,583	92,924	99,131	<0,001
II	28	69,812	3,311	63,323	76,301	
III	55	61,607	4,188	53,399	69,814	
IV	30	23,342	3,792	15,909	30,774	
Total	173	86,759	1,535	83,750	89,769	
Grau diferenciação						
1	21	97,017	1,668	93,747	100,287	<0,001
2	56	87,831	2,111	83,694	91,968	
3	94	71,892	2,944	66,121	77,663	
Total	171	86,802	1,539	83,785	89,819	
Tamanho tumor (cm)						
≤ 2,0	4	95,170	2,261	90,739	99,602	<0,001
> 2,0 e ≤ 5,0	62	90,254	1,760	86,806	93,703	
> 5,0	88	76,644	2,733	71,289	82,000	
Total	154	86,662	1,653	83,423	89,902	
Status cirurgia						
R0	137	89,164	1,550	86,127	92,201	<0,001
R1+R2	29	30,888	4,854	21,373	40,402	
Total	166	86,665	1,566	83,596	89,734	

*Calculado somente com os valores conhecidos

4.4 Sobrevida Livre de Doença – Análise Univariada dos Tumores Tipo I

O tempo médio de seguimento das 912 pacientes submetidas ao tratamento de adenocarcinoma Tipo I foi de 88,1 meses (IC 95% 85,17 - 90,98) (figura 9).

A análise de SLD univariada das características clínicas destas pacientes encontra-se na tabela 15. Nenhuma das variáveis se mostrou estatisticamente significativa.

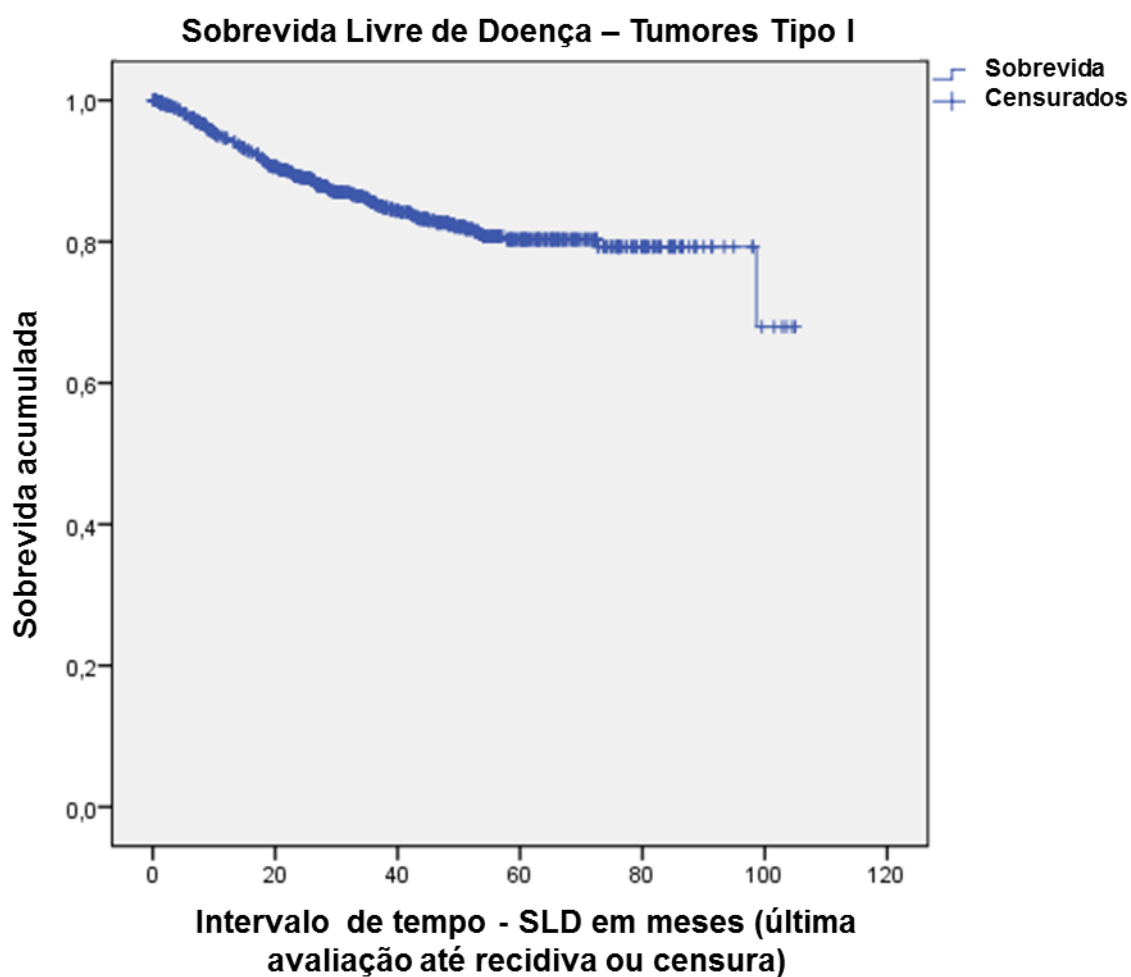


Figura 9: Curva de sobrevida livre de doença nos tumores Tipo I (n=912)

Tabela 15: Análise de Kaplan Meier da sobrevida livre de doença conforme as características clínicas dos casos de adenocarcinoma Tipo I (n=912)

Variável	Nº Eventos	Média	Tempo de sobrevida			Log Rank*
			DP	IC 95%	(mín/máx)	
Idade						
< 65	69	89,577	1,730	86,187	92,967	0,269
≥ 65	57	84,485	2,310	79,957	89,013	
Total	126	88,075	1,482	85,170	90,980	
Diabetes						
Sim	25	90,064	2,403	85,354	94,774	0,143
Não	99	87,596	1,608	84,445	90,747	
Total	124	88,264	1,480	85,364	91,164	
Cardiopatia						
Sim	9	79,082	3,771	71,691	86,473	0,807
Não	114	88,244	1,533	85,238	91,249	
Total	123	88,326	1,480	85,424	91,228	
Hipertensão						
Sim	91	87,637	1,745	84,218	91,056	0,378
Não	34	88,473	2,493	83,586	93,359	
Total	125	88,164	1,481	85,261	91,067	
IMC						
Adequado	22	87,110	3,203	80,832	93,388	0,433
Sobrepeso	39	85,683	2,760	80,273	91,093	
Obesidade	52	86,083	1,756	82,640	89,525	
Total	113	88,004	1,542	84,982	91,026	

*Calculado somente com os valores conhecidos; IMC=Índice de Massa Corporal

A análise de SLD univariada conforme as características relacionadas à história ginecológica desta população é apresentada na tabela 16. O diagnóstico da doença na pré-menopausa ($p=0,022$) e o número de gestações ($p=0,014$) apresentaram associação com o tempo de sobrevida livre de doença.

Tabela 16: Análise de Kaplan Meier da sobrevida livre de doença conforme as características relacionadas à história ginecológica dos casos de adenocarcinoma Tipo I (n=912)

Variável	Nº Eventos	Tempo de sobrevida			Log Rank*	
		Média	DP	IC 95% (mín/máx)		
1º sintoma						
Outros	6	76,699	3,282	70,267	83,131	0,365
Sangramento	119	87,653	1,543	84,629	90,677	
Total	125	88,062	1,487	85,148	90,976	
Uso ACO						
Sim	30	78,713	2,173	74,453	82,972	0,371
Não	53	88,332	2,097	84,223	92,441	
Total	83	88,624	1,696	85,301	91,948	
Uso TRH						
Sim	9	75,885	3,800	68,436	83,334	0,747
Não	65	90,044	1,804	86,507	93,580	
Total	74	89,914	1,697	86,587	93,240	
Idade menarca						
≤ 11 anos	15	95,797	2,253	91,382	100,213	0,078
> 11anos	68	88,754	1,766	85,293	92,216	
Total	83	90,815	1,455	87,964	93,667	
Idade menopausa						
≤ 45 anos	19	83,522	4,357	74,982	92,063	0,192
> 45 anos	61	90,252	1,687	86,945	93,559	
Total	80	89,252	1,626	86,064	92,440	
Pré-menopausa						
Sim	88	86,849	2,229	82,480	91,218	0,022
Não	4	88,348	1,693	85,029	91,667	
Total	92	89,571	1,568	86,497	92,645	
Gestação						
Sim	105	88,671	1,555	85,623	91,719	0,060
Não	19	71,306	3,576	64,298	78,315	
Total	124	87,973	1,497	85,039	90,908	
Nº gestações						
0	105	71,306	3,576	64,298	78,315	0,014
1 a 3	441	90,566	1,768	87,100	94,031	
≥ 4	341	85,210	2,415	80,478	89,943	
Total	887	87,973	1,497	85,039	90,908	

*Calculado somente com os valores conhecidos; ACO= Anticoncepcional Oral; TRH= Terapia de Reposição Hormonal

A análise de SLD univariada conforme as características relacionadas ao tratamento das pacientes com tumores Tipo I é descrita na tabela 17. A única variável estatisticamente significativa foi o PS, onde aquelas com pior PS apresentaram menor sobrevida livre de doença (p=0,028).

Tabela 17: Análise de Kaplan Meier da sobrevida livre de doença conforme características relacionadas ao tratamento dos casos de adenocarcinoma Tipo I (n=912)

Variável	Nº Eventos	Tempo de sobrevida				Log Rank*
		Média	DP	IC 95% (mín/máx)		
Intervalo entre sintoma e diagnóstico						
≥ 180 dias	48	88,333	2,265	83,894	92,772	0,224
< 180 dias	59	84,392	2,704	79,091	89,693	
Total	107	86,691	1,843	83,078	90,303	
Intervalo entre diagnóstico e cirurgia						
≤ 60 dias	21	86,491	3,520	79,592	93,391	0,442
> 60 dias	104	87,747	1,718	84,381	91,113	
Total	125	87,723	1,548	84,689	90,756	
PS						
0	13	71,495	3,271	65,084	77,906	0,028
1	104	88,899	1,546	85,869	91,930	
≥2	7	49,957	6,712	36,802	63,111	
Total	124	88,110	1,490	85,190	91,030	
Cirurgia incompleta						
Sim	49	86,151	2,367	81,511	90,791	0,073
Não	76	88,933	1,908	85,194	92,673	
Total	125	88,174	1,481	85,272	91,076	
Período de tratamento						
2000 a 2005	64	88,576	1,902	84,848	92,304	0,724
2006 a 2011	62	68,131	1,607	64,980	71,281	
Total	126	88,075	1,482	85,170	90,980	

*Calculado somente com os valores conhecidos; PS= *Performance Status*

A análise de SLD univariada conforme as características anátomo-patológicas destas pacientes está descrita na tabela 18. Nesta população, todos os critérios histopatológicos de prognóstico (invasão miometrial, presença de êmbolos neoplásicos, subtipo histológico, grau de diferenciação e tamanho do tumor), o estadiamento pela FIGO e o *status* da cirurgia foram estatisticamente significantes ($p < 0,001$).

Tabela 18: Análise de Kaplan Meier da sobrevida livre de doença conforme características anátomo-patológicas dos casos de adenocarcinoma Tipo I (n=912)

Variável	Nº Eventos	Média	Tempo de sobrevida			Log Rank*
			DP	IC 95%	(mín/máx)	
Invasão miometrial						
< 50%	27	92,962	1,197	90,616	95,307	<0,001
≥ 50%	40	85,396	2,784	79,939	90,852	
Total	67	92,973	1,531	89,972	95,973	
Êmbolos neoplásicos						
Sim	50	67,177	4,025	59,287	75,066	<0,001
Não	67	92,829	1,528	89,833	95,825	
Total	117	88,401	1,504	85,452	91,350	
FIGO						
I	46	95,620	1,483	92,713	98,528	<0,001
II	23	67,475	3,474	60,666	74,283	
III	37	66,012	4,736	56,729	75,296	
IV	19	25,034	4,735	15,752	34,315	
Total	125	88,141	1,483	85,234	91,049	
Grau diferenciação						
1	21	96,989	1,674	93,708	100,269	<0,001
2	55	87,893	2,126	83,726	92,060	
3	49	63,259	3,040	57,301	69,218	
Total	125	88,051	1,488	85,134	90,968	
Tamanho tumor (cm)						
≤ 2,0	4	94,834	2,473	89,988	99,681	<0,001
> 2,0 e ≤ 5,0	38	94,030	1,737	90,626	97,435	
> 5,0	69	73,117	2,701	67,824	78,410	
Total	111	87,887	1,612	84,728	91,046	
Status cirurgia						
R0	105	89,466	1,503	86,520	92,412	<0,001
R1+ R2	16	35,816	5,873	24,305	47,328	
Total	121	87,896	1,521	84,915	90,878	

*Calculado somente com os valores conhecidos

4.5 Sobrevida Livre de Doença – Análise Univariada dos Tumores Tipo II

O tempo médio de seguimento das 108 pacientes submetidas ao tratamento de adenocarcinoma Tipo II (tumores não endometrioides) foi de 62,7 meses (IC 95% 53,18-72,31) (figura 10).

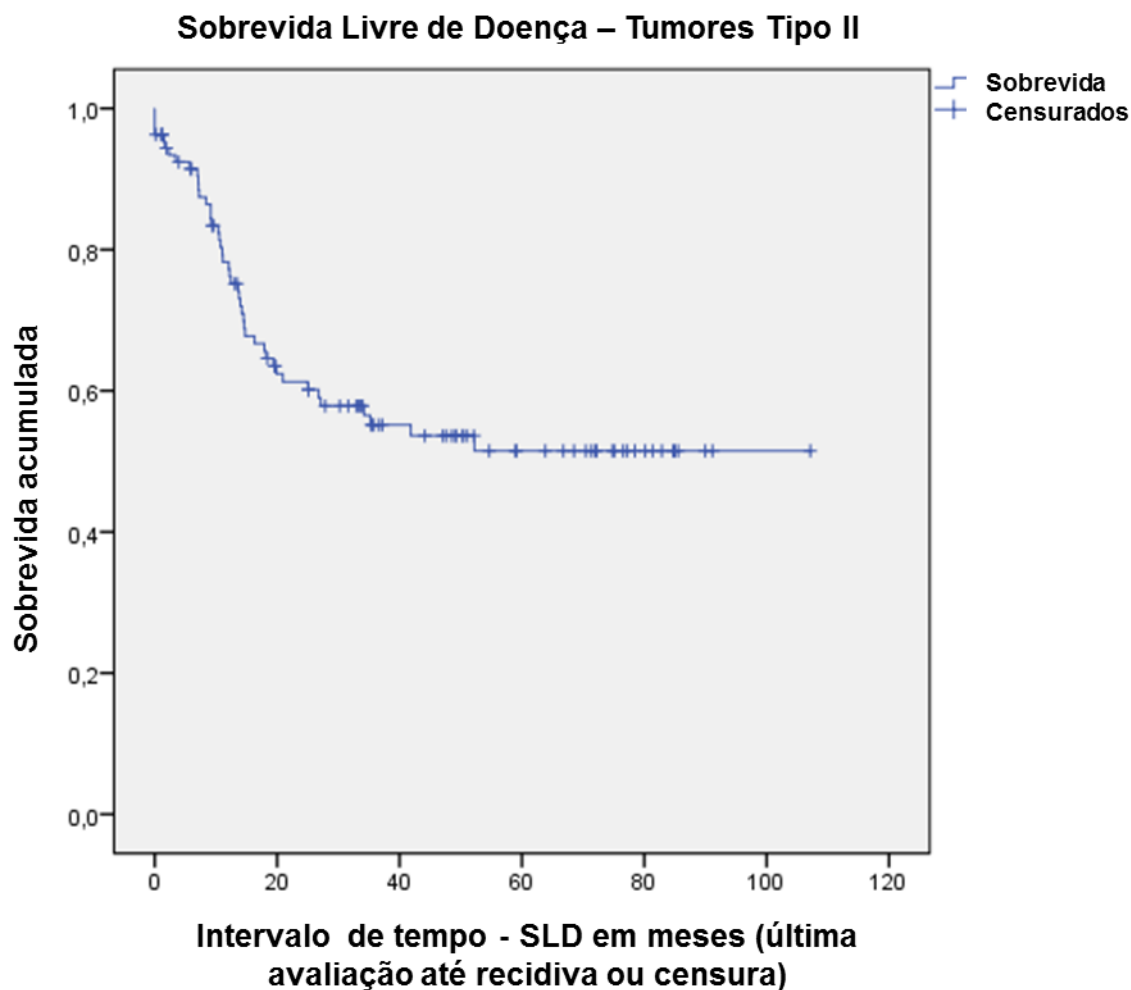


Figura 10: Curva de sobrevida livre de doença nos tumores Tipo II (n=108)

A análise de SLD univariada das características clínicas destas pacientes encontra-se na tabela 19. A única variável que se mostrou estatisticamente significativa foi o IMC quando agrupado em duas categorias ($p=0,037$).

Tabela 19: Análise de Kaplan Meier da sobrevida livre de doença conforme as características clínicas dos casos de adenocarcinoma Tipo II (n=108)

Variável	Nº Eventos	Tempo de sobrevida				Log Rank*
		Média	DP	IC 95%	(mín/máx)	
Idade						
< 65	20	65,928	6,918	52,369	79,488	0,485
≥ 65	25	52,315	5,655	41,231	63,398	
Total	45	62,745	4,881	53,179	72,311	
Diabetes						
Sim	11	49,223	8,128	33,293	65,153	0,627
Não	34	64,347	5,560	53,450	75,244	
Total	45	62,281	4,909	52,660	71,903	
Cardiopatia						
Sim	4	55,842	12,593	31,160	80,524	0,795
Não	41	62,188	5,159	52,075	72,300	
Total	45	62,281	4,909	52,660	71,903	
Hipertensão						
Sim	34	53,055	4,637	43,966	62,144	0,793
Não	11	64,495	9,566	45,745	83,244	
Total	45	62,281	4,909	52,660	71,903	
IMC						
Adequado	11	35,136	7,852	19,747	50,525	0,056
Sobrepeso	19	63,400	7,394	48,908	77,892	
Obesidade	10	62,905	5,999	51,146	74,664	
Total	40	64,664	5,031	54,803	74,525	
IMC (2 categorias)						
Adequado	11	35,136	7,852	19,747	50,525	0,037
Sobrepeso e obesidade	29	69,518	5,472	58,792	80,244	
Total	40	64,664	5,031	54,803	74,525	

*Calculado somente com os valores conhecidos; IMC=Índice de Massa Corporal

A análise de SLD univariada conforme as características relacionadas à história ginecológica e ao tratamento desta população encontram-se nas tabelas 20 e 21, respectivamente. Nenhuma das variáveis foi estatisticamente significativa. A SLD não foi calculada para o PS porque todas as mulheres que apresentaram recidiva tinham exclusivamente PS 1 na ocasião da matrícula.

Tabela 20: Análise de Kaplan Meier da sobrevida livre de doença conforme as características relacionadas à história ginecológica dos casos de adenocarcinoma Tipo II (n=108)

Variável	Nº Eventos	Média	Tempo de sobrevida			Log Rank*
			DP	IC 95%	(mín/máx)	
1º sintoma						
Outros	4	53,233	12,210	29,302	77,164	0,844
Sangramento	41	61,492	5,191	51,318	71,665	
Total	45	61,915	4,928	52,255	71,574	
Uso ACO						
Sim	7	48,318	8,135	32,373	64,263	0,974
Não	19	55,345	5,978	43,628	67,062	
Total	26	55,809	5,071	45,870	65,748	
Uso TRH						
Sim	1	73,647	14,597	45,036	102,257	0,283
Não	22	52,784	5,912	41,197	64,371	
Total	23	55,188	5,571	44,269	66,108	
Idade menarca						
≤ 11 anos	7	59,861	7,747	44,676	75,045	0,374
> 11anos	35	61,810	5,583	50,867	72,752	
Total	42	63,828	4,969	54,088	73,567	
Idade menopausa						
≤ 45 anos	9	45,114	9,036	27,405	62,824	0,542
> 45 anos	31	62,935	5,857	51,456	74,414	
Total	40	61,652	5,221	51,419	71,885	
Pré-menopausa						
Sim	1	63,117	15,805	32,139	94,094	0,414
Não	44	59,795	5,106	49,787	69,803	
Total	45	60,848	4,989	51,070	70,626	
Gestação						
Sim	43	58,810	5,220	48,579	69,041	0,243
Não	2	52,879	9,581	34,101	71,658	
Total	45	60,756	5,003	50,950	70,563	
Nº gestações						
0	2	52,879	9,581	34,101	71,658	0,440
1 a 3	23	56,221	7,254	42,002	70,439	
≥ 4	20	53,201	6,214	41,022	65,381	
Total	45	60,756	5,003	50,950	70,563	

*Calculado somente com os valores conhecidos; ACO= Anticoncepcional Oral; TRH= Terapia de Reposição Hormonal

Tabela 21: Análise de Kaplan Meier da sobrevida livre de doença conforme características relacionadas ao tratamento dos casos de adenocarcinoma Tipo II (n=108)

Variável	Nº Eventos	Média	Tempo de sobrevida			Log Rank*
			DP	IC 95% (mín/máx)		
Intervalo entre sintoma e diagnóstico						
≥ 180 dias	16	44,208	5,601	33,230	55,187	0,901
< 180 dias	23	61,155	6,930	47,572	74,738	
Total	39	60,348	5,416	49,734	70,963	
Intervalo entre diagnóstico e cirurgia						
≤ 60 dias	5	56,579	11,978	33,104	80,055	0,922
> 60 dias	39	62,129	5,253	51,833	72,425	
Total	44	62,426	4,952	52,720	72,133	
Cirurgia incompleta						
Sim	20	44,523	6,248	32,278	56,768	0,142
Não	25	67,414	6,089	55,480	79,348	
Total	45	62,233	4,915	52,599	71,867	
Período de tratamento						
2000 a 2005	32	60,376	5,961	48,693	72,060	0,445
2006 a 2011	13	53,079	5,807	41,698	64,461	
Total	45	62,745	4,881	53,179	72,311	

*Calculado somente com os valores conhecidos

A análise de SLD univariada conforme as características anátomo-patológicas destas pacientes está descrita na tabela 22. Nesta população, houve associação com invasão miometrial ($p=0,037$), êmbolos neoplásicos ($p=0,002$), estadiamento pela FIGO ($p<0,001$) e *status* da cirurgia ($p<0,001$).

Tabela 22: Análise de Kaplan Meier da sobrevida livre de doença conforme características anátomo-patológicas dos casos de adenocarcinoma Tipo II (n=108)

Variável	Nº Eventos	Média	Tempo de sobrevida			Log Rank*
			DP	IC 95%	(mín/máx)	
Invasão miometrial						
< 50%	12	64,453	5,031	54,591	74,314	0,037
≥ 50%	17	59,312	8,169	43,300	75,324	
Total	29	69,282	5,428	58,644	79,921	
Êmbolos neoplásicos						
Sim	20	31,859	5,500	21,079	42,638	0,002
Não	25	31,859	5,500	21,079	42,638	
Total	45	62,690	4,883	53,119	72,261	
FIGO						
I	13	78,961	6,492	66,236	91,686	<0,001
II	4	68,107	9,369	49,743	86,471	
III	17	38,405	6,924	24,834	51,975	
IV	11	17,528	4,853	8,017	27,039	
Total	45	62,745	4,881	53,179	72,311	
FIGO (2 categorias)						
I e II	17	79,404	5,645	68,340	90,467	<0,001
III e IV	28	32,565	5,477	21,831	43,299	
Total	45	62,745	4,881	53,179	72,311	
Tamanho tumor (cm)						
≤ 5,0	23	56,342	5,444	45,671	67,013	0,960
> 5,0	18	65,568	7,405	51,053	80,082	
Total	41	64,993	4,947	55,298	74,689	
Status cirurgia						
R0	30	70,872	5,229	60,623	81,122	<0,001
R1+R2	12	19,302	6,093	7,361	31,244	
Total	42	63,741	4,979	53,982	73,501	

*Calculado somente com os valores conhecidos

4.6 Sobrevida Global – Análise Univariada da População Geral

O tempo médio da sobrevida global (SG) das 1.038 pacientes submetidas ao tratamento de “adenocarcinoma de endométrio” foi de 82,2 meses (IC 95% 79,28 - 85,05) (figura 11).

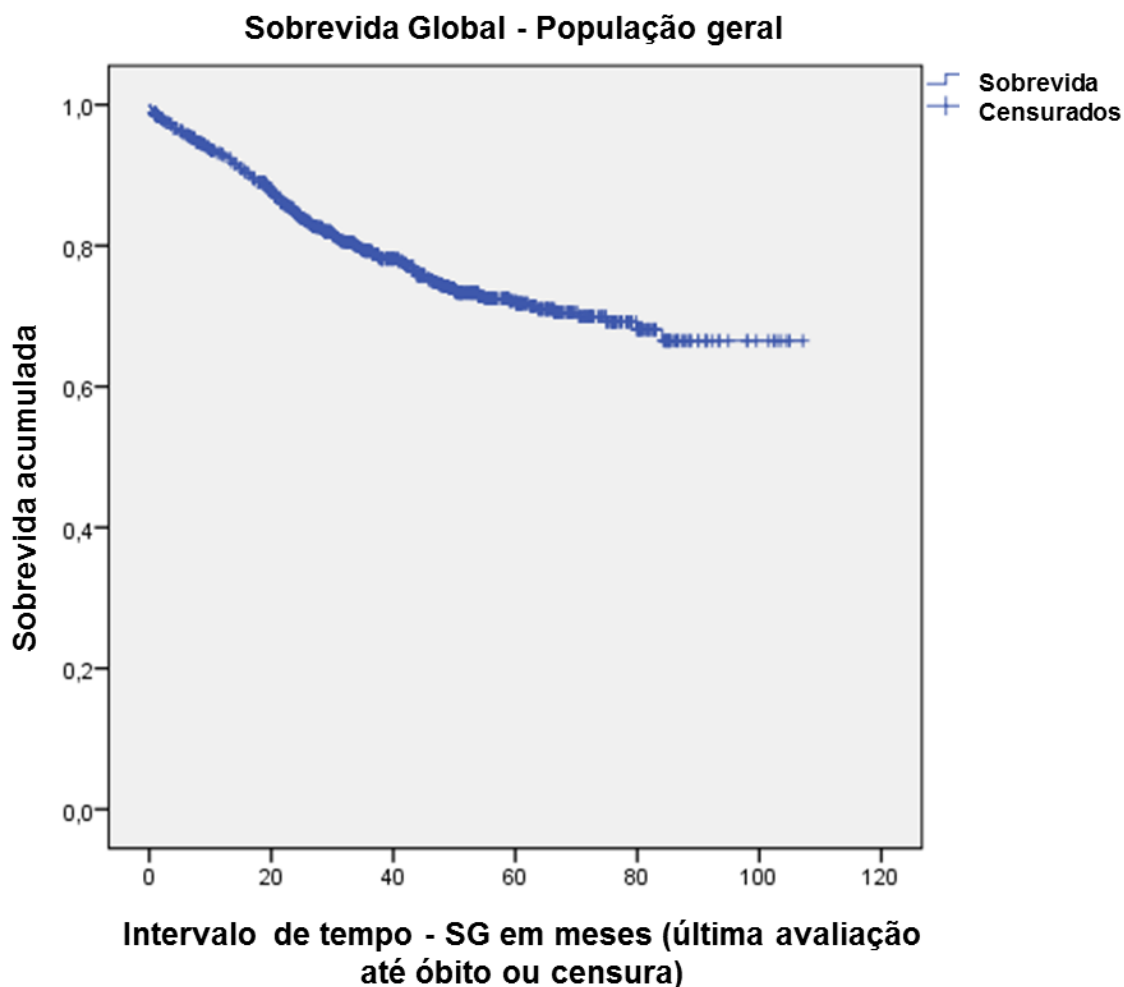


Figura 11: Curva de sobrevida global da população geral (n=1.038)

A análise de SG univariada das características clínicas destas pacientes é descrita na tabela 23. Idade ($p < 0,001$), cardiopatia ($p = 0,001$) e hipertensão ($p = 0,048$) foram estatisticamente significantes.

Tabela 23: Análise de Kaplan Meier da sobrevida global conforme as características clínicas da população geral (n=1.038)

Variável	Nº Eventos	Média	Tempo de sobrevida			Log Rank*
			DP	IC 95%	(mín/máx)	
Idade						
< 65	92	88,446	1,827	84,864	92,028	<0,001
≥ 65	136	71,905	2,195	67,603	76,207	
Total	228	82,167	1,472	79,282	85,051	
Diabetes						
Sim	52	81,351	2,700	76,058	86,644	0,500
Não	173	81,725	1,705	78,383	85,067	
Total	225	82,347	1,472	79,462	85,232	
Cardiopatia						
Sim	31	61,756	4,202	53,520	69,992	0,001
Não	192	83,525	1,538	80,510	86,540	
Total	223	82,459	1,473	79,572	85,347	
Hipertensão						
Sim	171	79,238	1,708	75,890	82,586	0,048
Não	56	86,032	2,596	80,944	91,119	
Total	227	82,190	1,473	79,303	85,078	
IMC						
Adequado	43	78,655	3,248	72,290	85,020	0,099
Sobrepeso	69	81,996	2,604	76,891	87,100	
Obesidade	85	79,973	2,003	76,046	83,899	
Total	197	83,521	1,534	80,515	86,527	

*Calculado somente com os valores conhecidos; IMC= Índice de Massa Corporal

A análise de SG univariada conforme as características relacionadas à história ginecológica e ao tratamento da população é descrita nas tabelas 24 e 25. O uso de ACO (p=0,002), o diagnóstico da doença na pré-menopausa (p<0,001), o número de gestações (p<0,001), o PS na ocasião da matrícula (p<0,001) e a cirurgia incompleta (p<0,001) foram estatisticamente significantes. A recidiva da doença também apresentou associação com uma menor sobrevida, independente do sítio (p<0,001).

Tabela 24: Análise de Kaplan Meier da sobrevida global conforme as características relacionadas à história ginecológica da população geral (n=1.038)

Variável	Nº Eventos	Média	Tempo de sobrevida			Log Rank*
			DP	IC 95%	(mín/máx)	
1º sintoma						
Outros	15	69,543	3,678	62,333	76,752	0,662
Sangramento	211	81,884	1,542	78,861	84,906	
Total	226	82,151	1,478	79,255	85,047	
Uso ACO						
Sim	35	80,735	1,996	76,823	84,647	0,002
Não	98	79,503	2,337	74,923	84,084	
Total	133	83,505	1,726	80,122	86,888	
Uso TRH						
Sim	9	77,251	3,769	69,864	84,639	0,177
Não	114	83,590	1,890	79,885	87,295	
Total	123	83,851	1,809	80,306	87,396	
Idade menarca						
≤ 11 anos	35	85,585	3,132	79,447	91,723	0,077
> 11anos	138	81,593	1,884	77,900	85,286	
Total	173	83,017	1,625	79,832	86,202	
Idade menopausa						
≤ 45 anos	39	73,840	4,042	65,917	81,763	0,070
> 45 anos	127	82,482	1,932	78,695	86,269	
Total	166	81,087	1,757	77,643	84,531	
Pré-menopausa						
Sim	4	89,037	2,137	84,848	93,225	<0,001
Não	185	79,983	1,727	76,599	83,367	
Total	189	82,186	1,594	79,062	85,310	
Gestação						
Sim	198	82,077	1,575	78,991	85,163	0,387
Não	27	70,844	3,755	63,484	78,205	
Total	225	81,730	1,504	78,783	84,677	
Nº gestações						
0	27	70,844	3,755	63,484	78,205	<0,001
1 a 3	87	87,500	1,909	83,759	91,241	
≥ 4	111	74,209	2,458	69,392	79,027	
Total	225	81,730	1,504	78,783	84,677	

*Calculado somente com os valores conhecidos; ACO= Anticoncepcional Oral; TRH= Terapia de Reposição Hormonal

Tabela 25: Análise de Kaplan Meier da sobrevida global conforme características relacionadas ao tratamento e prognóstico da população geral (n=1.038)

Variável	Nº Eventos	Tempo de sobrevida				Log Rank*
		Média	DP	IC 95% (mín/máx)		
Intervalo entre sintoma e diagnóstico						
≥ 180 dias	91	79,304	2,485	74,433	84,175	0,821
< 180 dias	97	82,136	2,196	77,832	86,440	
Total	188	81,763	1,656	78,517	85,010	
Intervalo entre diagnóstico e tratamento						
≤ 60 dias	32	80,870	3,643	73,730	88,009	0,861
> 60 dias	188	82,286	1,635	79,082	85,490	
Total	220	82,288	1,505	79,339	85,237	
PS						
0	11	79,835	3,651	72,679	86,991	<0,001
1	195	82,602	1,559	79,546	85,657	
≥2	17	38,995	5,560	28,098	49,893	
Total	223	82,339	1,480	79,439	85,239	
Cirurgia incompleta						
Sim	113	71,078	2,576	66,028	76,128	<0,001
Não	114	87,393	1,725	84,012	90,773	
Total	227	82,188	1,476	79,295	85,082	
Período tratamento						
2000 a 2005	137	80,182	1,950	76,359	84,004	0,125
2006 a 2011	91	65,328	1,504	62,380	68,277	
Total	228	82,167	1,472	79,282	85,051	
Recidiva						
Sim	137	35,048	2,344	30,454	39,642	<0,001
Não	91	94,906	1,238	92,479	97,333	
Total	228	82,167	1,472	79,282	85,051	
Local da recidiva						
Loco-regional	16	35,810	4,548	26,896	44,725	0,322
À distância	91	31,557	2,426	26,801	36,312	
Ambos	6	25,778	6,659	12,725	38,830	
Total	113	32,637	2,196	28,332	36,941	

*Calculado somente com os valores conhecidos; PS= *Performance Status*

A análise de SG univariada conforme as características anátomo-patológicas encontra-se na tabela 26. Nesta população, todos os critérios histopatológicos de prognóstico (invasão miometrial, presença de êmbolos neoplásicos, subtipo histológico, grau de diferenciação e tamanho do tumor), estadiamento pela FIGO e *status* da cirurgia foram estatisticamente significantes ($p < 0,001$ para cada variável).

Tabela 26: Análise de Kaplan Meier da sobrevida global conforme características anátomo-patológicas da população geral (n=1.038)

Variável	Nº Eventos	Tempo de sobrevida				Log Rank*
		Média	DP	IC 95% (mín/máx)		
Invasão miometrial						
< 50%	56	89,971	1,642	86,752	93,190	<0,001
≥ 50%	78	77,560	2,781	72,110	83,011	
Total	134	87,934	1,534	84,928	90,941	
Êmbolos						
Sim	85	59,966	3,361	53,378	66,554	<0,001
Não	133	87,362	1,583	84,258	90,465	
Total	218	82,147	1,500	79,206	85,087	
Subtipo						
Endometriode	165	84,255	1,470	81,373	87,136	<0,001
Seroso+céls. claras	58	56,883	4,445	48,171	65,595	
Total	223	82,156	1,493	79,230	85,082	
FIGO						
I	82	93,818	1,372	91,130	96,507	<0,001
II	43	60,808	3,462	54,023	67,593	
III	65	59,200	3,949	51,459	66,941	
IV	37	23,823	3,266	17,422	30,224	
Total	227	82,192	1,476	79,298	85,085	
Grau diferenciação						
1	35	91,564	2,212	87,229	95,899	<0,001
2	72	84,551	2,136	80,364	88,738	
3	119	65,909	2,908	60,209	71,609	
Total	226	82,097	1,480	79,196	84,997	
Tamanho tumor (cm)						
≤ 5,0	89	87,554	1,718	84,187	90,921	<0,001
> 5,0	117	71,821	2,761	66,409	77,233	
Total	206	82,469	1,539	79,453	85,486	
Status cirurgia						
R0	181	84,882	1,505	81,932	87,831	<0,001
R1+R2	38	32,262	5,004	22,454	42,069	
Total	219	82,047	1,508	79,092	85,001	

*Calculado somente com os valores conhecidos

4.7 Sobrevida Global – Análise Univariada dos Tumores Tipo I

Para análise de SG das pacientes submetidas ao tratamento de adenocarcinoma tipo I, o tempo médio de seguimento foi de 84,3 meses (IC 95% 81,37 - 87,14) (figura 12).

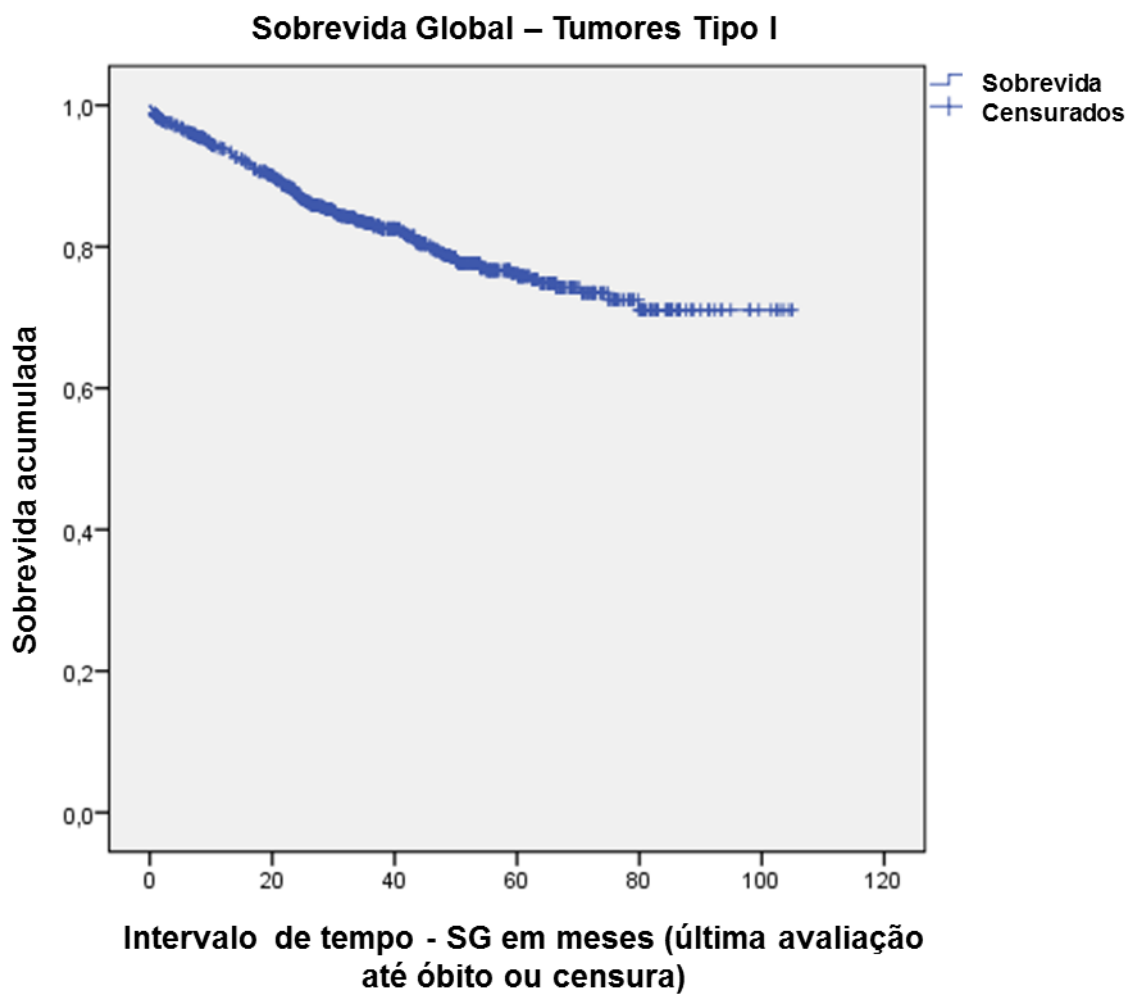


Figura 12: Curva de sobrevida global nos tumores Tipo I (n=912)

A análise de SG univariada das características clínicas desta população encontra-se na tabela 27. Idade ($p < 0,001$) e cardiopatia associada ($p < 0,001$) foram estatisticamente significantes.

Tabela 27: Análise de Kaplan Meier da sobrevida global conforme as características clínicas dos casos de adenocarcinoma Tipo I (n=912)

Variável	Nº Eventos	Tempo de sobrevida				Log Rank*
		Média	DP	IC 95% (Mín/máx)		
Idade						
< 65	70	89,375	1,755	85,936	92,815	<0,001
≥ 65	95	76,092	2,378	71,432	80,752	
Total	165	84,255	1,470	81,373	87,136	
Diabetes						
Sim	40	83,837	2,860	78,232	89,442	0,774
Não	122	84,215	1,697	80,890	87,540	
Total	162	84,519	1,467	81,643	87,394	
Cardiopatia						
Sim	25	63,425	4,487	54,631	72,220	<0,001
Não	135	85,860	1,522	82,877	88,842	
Total	160	84,660	1,467	81,784	87,536	
Hipertensão						
Sim	125	82,662	1,794	79,145	86,179	0,053
Não	39	87,328	2,394	82,635	92,021	
Total	164	84,334	1,469	81,455	87,214	
IMC						
Adequado	27	85,109	3,186	78,865	91,353	0,699
Sobrepeso	45	84,142	2,725	78,801	89,482	
Obesidade	69	82,181	1,942	78,375	85,988	
Total	141	85,311	1,499	82,372	88,250	

*Calculado somente com os valores conhecidos; IMC= Índice de Massa Corporal

A análise de SG univariada conforme as características relacionadas à história ginecológica destas pacientes é descrita na tabela 28. O uso de ACO ($p=0,003$), diagnóstico da doença na pré-menopausa ($p=0,001$) e o número de gestações ($p<0,001$) foram associados a SG.

A análise de SG univariada conforme as características relacionadas ao tratamento e as características anátomo-patológicas desta população é descrita nas tabelas 29 e 30, respectivamente. Cirurgia incompleta, PS e recidiva de doença foram estatisticamente significantes para o desfecho ($p<0,001$ para cada variável). Todos os critérios histopatológicos relacionados ao prognóstico (invasão miometrial, presença de êmbolos neoplásicos, grau de diferenciação e tamanho do tumor), estadiamento pela FIGO e o *status* da cirurgia também foram estatisticamente significantes ($p<0,001$ para cada variável).

Tabela 28: Análise de Kaplan Meier da sobrevida global conforme as características relacionadas à história ginecológica dos casos de adenocarcinoma Tipo I (n=912)

Variável	Nº Eventos	Tempo de sobrevida				Log Rank*
		Média	DP	IC 95%	(mín/máx)	
1º sintoma						
Outros	9	73,284	3,661	66,109	80,459	0,457
Sangramento	155	83,852	1,539	80,835	86,868	
Total	164	84,219	1,475	81,328	87,110	
Uso ACO						
Sim	26	82,575	2,012	78,630	86,519	0,003
Não	74	82,790	2,338	78,207	87,373	
Total	100	86,498	1,711	83,144	89,852	
Uso TRH						
Sim	8	74,907	4,133	66,807	83,008	0,462
Não	85	87,285	1,767	83,823	90,748	
Total	93	86,872	1,798	83,349	90,395	
Idade menarca						
≤ 11 anos	27	88,860	2,826	83,321	94,399	0,400
> 11anos	90	84,469	1,903	80,740	88,199	
Total	117	85,779	1,615	82,614	88,944	
Idade menopausa						
≤ 45 anos	26	79,376	4,275	70,997	87,756	0,187
> 45 anos	85	85,217	1,890	81,512	88,921	
Total	111	84,350	1,753	80,914	87,786	
Pré-menopausa						
Sim	3	89,833	2,034	85,846	93,819	0,001
Não	125	83,168	1,744	79,749	86,587	
Total	128	85,142	1,586	82,032	88,251	
Gestação						
Sim	139	84,782	1,550	81,744	87,819	0,084
Não	24	71,276	3,919	63,595	78,956	
Total	163	83,995	1,492	81,072	86,919	
Nº gestações						
0	24	71,276	3,919	63,595	78,956	<0,001
1 a 3	58	88,799	1,818	85,237	92,362	
≥ 4	81	78,276	2,538	73,302	83,251	
Total	163	83,995	1,492	81,072	86,919	

*Calculado somente com os valores conhecidos; ACO= Anticoncepcional Oral; TRH= Terapia de Reposição Hormonal

Tabela 29: Análise de Kaplan Meier da sobrevida global conforme características relacionadas ao tratamento e prognóstico dos casos de adenocarcinoma Tipo I (n=912)

Variável	Nº Eventos	Tempo de sobrevida				Log Rank*
		Média	DP	IC 95% (mín/máx)		
Intervalo entre sintoma e diagnóstico						
≥ 180 dias	67	83,625	2,344	79,030	88,219	0,860
< 180 dias	68	84,114	2,260	79,684	88,544	
Total	135	84,095	1,625	80,909	87,281	
Intervalo entre diagnóstico e tratamento						
≤ 60 dias	26	81,801	3,933	74,092	89,510	0,619
> 60 dias	133	84,995	1,577	81,904	88,086	
Total	159	84,414	1,498	81,477	87,351	
PS						
0	11	78,059	4,366	69,502	86,616	<0,001
1	139	84,870	1,547	81,838	87,901	
≥2	13	42,477	6,075	30,569	54,385	
Total	163	84,278	1,478	81,382	87,174	
Cirurgia incompleta						
Sim	85	74,472	2,777	69,028	79,915	<0,001
Não	79	89,447	1,647	86,219	92,676	
Total	164	84,342	1,469	81,462	87,222	
Período tratamento						
2000 a 2005	90	83,769	1,965	79,918	87,620	0,835
2006 a 2011	75	66,425	1,598	63,292	69,557	
Total	165	84,255	1,470	81,373	87,136	
Recidiva						
Sim	92	39,549	3,036	33,599	45,499	<0,001
Não	73	94,129	1,248	91,683	96,575	
Total	165	84,255	1,470	81,373	87,136	
Local recidiva						
Loco-regional	12	38,409	5,421	27,783	49,034	0,362
À Distância	60	34,863	3,104	28,780	40,946	
Ambos	5	24,700	8,049	8,925	40,475	
Total	77	35,539	2,779	30,091	40,986	

*Calculado somente com os valores conhecidos

Tabela 30: Análise de Kaplan Meier da sobrevida global conforme características anátomo-patológicas dos casos de adenocarcinoma Tipo I (n=912)

Variável	N° Eventos	Tempo de sobrevida				Log Rank*
		Média	DP	IC 95% (mín/máx)		
Invasão miometrial						
< 50%	38	93,182	1,431	90,376	95,988	<0,001
≥ 50%	57	79,537	2,884	73,885	85,189	
Total	95	89,726	1,458	86,869	92,584	
Êmbolos						
Sim	60	64,157	3,764	56,778	71,535	<0,001
Não	96	88,916	1,536	85,905	91,927	
Total	156	84,370	1,499	81,431	87,309	
FIGO						
I	64	93,615	1,343	90,984	96,247	<0,001
II	36	58,543	3,593	51,501	65,585	
III	41	65,973	4,494	57,165	74,781	
IV	23	25,543	4,255	17,202	33,884	
Total	164	84,300	1,474	81,411	87,188	
Grau diferenciação						
1	35	91,524	2,216	87,180	95,868	<0,001
2	71	84,565	2,156	80,339	88,790	
3	59	59,739	3,077	53,709	65,769	
Total	165	84,075	1,480	81,175	86,975	
Tamanho Tumor (cm) 2 categ.						
≤ 5,0	60	90,915	1,761	87,463	94,367	<0,001
> 5,0	90	70,217	2,572	65,176	75,257	
Total	150	84,269	1,553	81,225	87,313	
Status cirurgia						
R0	140	85,651	1,503	82,706	88,596	<0,001
R1+R2	21	39,172	6,943	25,564	52,781	
Total	161	83,881	1,509	80,924	86,838	

*Calculado somente com os valores conhecidos

4.8 Sobrevida Global - Análise Univariada dos Tumores Tipo II

Para análise de SG das pacientes submetidas ao tratamento de adenocarcinoma tipo II, o tempo médio foi de 56,9 meses (IC 95% 48,17-65,60) (Figura 13).

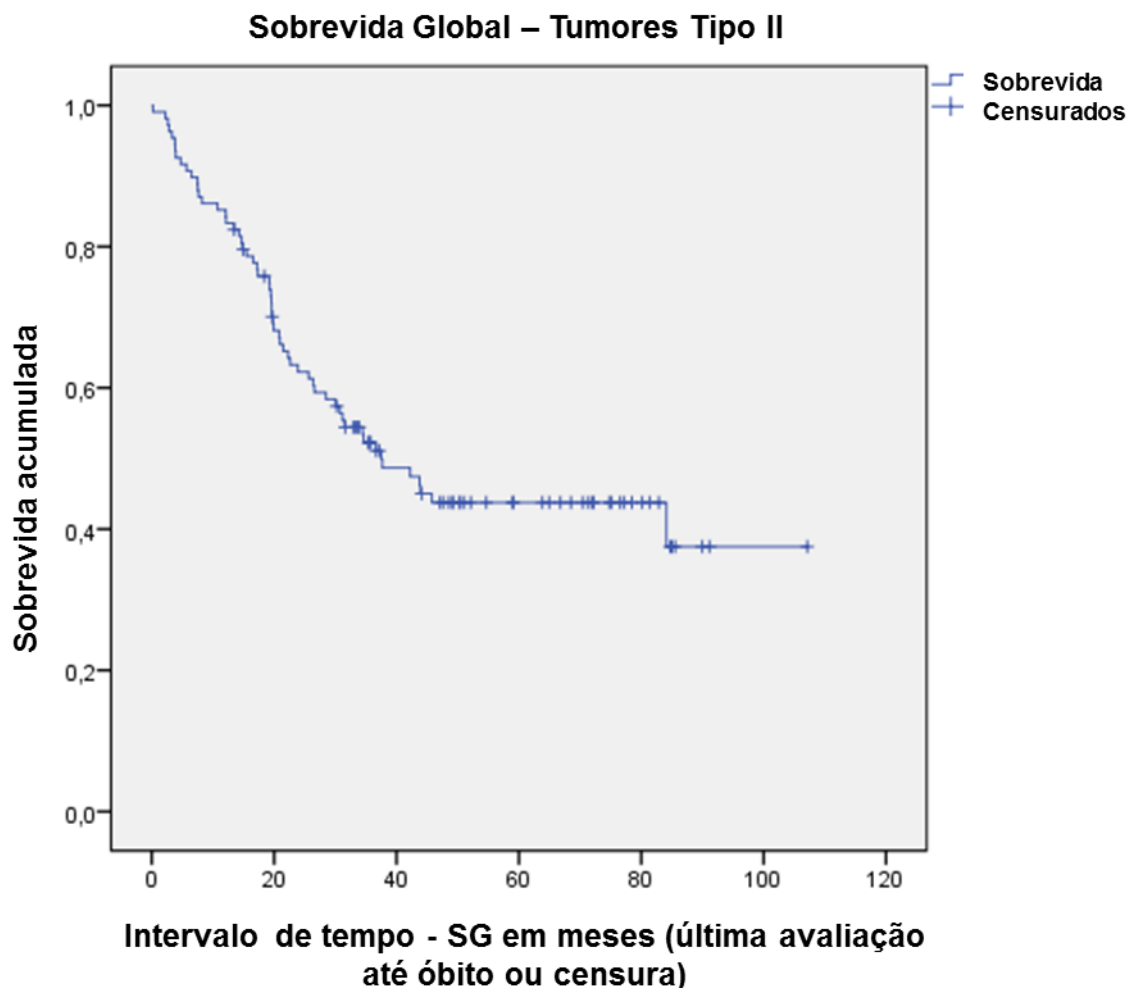


Figura 13: Curva de sobrevida global nos tumores Tipo II (n=108)

A análise de SG univariada das características clínicas desta população encontra-se na tabela 31. Nesta população, apenas IMC (quando categorizado em dois grupos) se mostrou estatisticamente significativa ($p=0,043$).

Tabela 31: Análise de Kaplan Meier da sobrevida global conforme as características clínicas dos casos de adenocarcinoma Tipo II (n=108)

Variável	Nº Eventos	Média	Tempo de sobrevida			Log Rank
			DP	IC 95%	(Mín/máx)	
Idade						
< 65	22	64,828	6,491	52,105	77,551	0,064
≥ 65	36	44,698	4,874	35,145	54,250	
Total	58	56,883	4,445	48,171	65,595	
Diabetes						
Sim	11	53,531	7,518	38,796	68,267	0,605
Não	47	55,247	5,062	45,326	65,167	
Total	58	56,399	4,457	47,664	65,135	
Cardiopatia						
Sim	6	46,626	11,949	23,207	70,046	0,701
Não	52	56,619	4,694	47,419	65,820	
Total	58	56,399	4,457	47,664	65,135	
Hipertensão						
Sim	44	48,884	4,143	40,765	57,004	0,561
Não	14	61,137	8,470	44,535	77,739	
Total	58	56,399	4,457	47,664	65,135	
IMC						
Adequado	13	36,024	6,755	22,785	49,264	0,121
Sobrepeso	22	61,822	6,723	48,645	74,998	
Obesidade	16	56,099	5,696	44,935	67,262	
Total	51	59,224	4,605	50,198	68,250	
IMC (2 categorias)						
Adequado	13	36,024	6,755	22,785	49,264	0,043
Sobrepeso e Obesidade	38	63,271	5,093	53,289	73,253	
Total	51	59,224	4,605	50,198	68,250	

*Calculado somente com os valores conhecidos; IMC= Índice de Massa Corporal

A análise de SG univariada conforme as características relacionadas à história ginecológica e ao tratamento desta população é descrita nas tabela 32 e 33. Nenhuma das variáveis relacionadas à história ginecológica se mostrou estatisticamente significativa. Cirurgia incompleta ($p < 0,046$) e recidiva da doença ($p < 0,001$), foram estatisticamente significantes, independente do sítio da recorrência.

Tabela 32: Análise de Kaplan Meier da sobrevida global conforme as características relacionadas à história ginecológica dos casos de adenocarcinoma Tipo II (n=108)

Variável	Nº Eventos	Tempo de sobrevida				Log Rank*
		Média	DP	IC 95%	(mín/máx)	
1º sintoma						
Outros	5	51,189	11,414	28,818	73,560	0,791
Sangramento	52	56,182	4,712	46,947	65,418	
Total	57	56,735	4,494	47,927	65,543	
Uso ACO						
Sim	9	46,565	7,141	32,568	60,561	0,821
Não	23	53,476	5,385	42,921	64,031	
Total	32	53,186	4,581	44,208	62,164	
Uso TRH						
Sim	2	77,100	11,508	54,544	99,656	0,127
Não	28	48,823	5,300	38,436	59,211	
Total	29	51,771	5,054	41,865	61,678	
Idade menarca						
≤ 11 anos	8	63,099	6,659	50,047	76,151	0,120
> 11anos	44	56,254	5,109	46,239	66,268	
Total	52	58,973	4,601	49,954	67,992	
Idade menopausa						
≤ 45 anos	13	38,058	7,583	23,195	52,921	0,110
> 45 anos	37	59,596	5,374	49,063	70,128	
Total	50	56,647	4,769	47,300	65,993	
Pré-menopausa						
Sim	1	67,433	12,067	43,783	91,084	0,258
Não	55	55,005	4,616	45,959	64,052	
Total	56	56,137	4,547	47,226	65,049	
Gestação						
Sim	55	53,366	4,653	44,246	62,487	0,309
Não	3	50,154	8,398	33,695	66,613	
Total	58	54,780	4,517	45,926	63,634	
Nº gestações						
0	3	50,154	8,398	33,695	66,613	0,573
1 a 3	27	55,371	6,450	42,729	68,013	
≥ 4	28	46,762	5,336	36,303	57,220	
Total	58	54,780	4,517	45,926	63,634	

*Calculado somente com os valores conhecidos; ACO= Anticoncepcional Oral; TRH= Terapia de Reposição Hormonal

Tabela 33: Análise de Kaplan Meier da sobrevida global conforme características relacionadas ao tratamento e prognóstico dos casos de adenocarcinoma Tipo II (n=108)

Variável	Nº Eventos	Tempo de sobrevida				Log Rank*
		Média	DP	IC 95% (mín/máx)		
Intervalo entre sintoma e diagnóstico						
≥ 180 dias	22	44,640	5,739	33,391	55,888	0,400
< 180 dias	27	59,681	6,365	47,207	72,156	
Total	49	55,213	4,955	45,500	64,926	
Intervalo entre diagnóstico e tratamento						
≤ 60 dias	4	65,179	10,820	43,971	86,388	0,276
> 60 dias	52	54,806	4,767	45,463	64,149	
Total	56	57,113	4,522	48,249	65,976	
Cirurgia incompleta						
Sim	27	40,423	5,311	30,013	50,833	0,046
Não	31	62,494	5,667	51,387	73,601	
Total	58	56,163	4,493	47,356	64,970	
Período tratamento						
2000 a 2005	42	54,572	5,284	44,215	64,928	0,370
2006 a 2011	16	50,722	5,423	40,094	61,351	
Total	58	56,883	4,445	48,171	65,595	
Recidiva						
Sim	42	23,725	2,813	18,212	29,238	<0,001
Não	16	82,964	5,215	72,742	93,186	
Total	58	56,883	4,445	48,171	65,595	
Local recidiva						
Locorregional	4	29,627	6,821	16,258	42,995	0,475
À Distância	30	23,283	3,433	16,554	30,011	
Ambos	1	31,167	,000	31,167	31,167	
Total	35	24,711	3,195	18,450	30,973	

*Calculado somente com os valores conhecidos

A análise de SG univariada conforme as características anátomo-patológicas destas pacientes está descrita na tabela 34. Nesta população, invasão miometrial ($p=0,024$), presença de êmbolos neoplásicos ($p<0,001$), estadiamento pela FIGO ($p<0,001$) e o *status* da cirurgia ($p<0,001$) foram estatisticamente significantes.

Tabela 34: Análise de Kaplan Meier da sobrevida global conforme características anátomo-patológicas dos casos de adenocarcinoma Tipo II (n=108)

Variável	Nº Eventos	Tempo de sobrevida				Log Rank*
		Média	DP	IC 95%	(mín/máx)	
Invasão miometrial						
< 50%	17	61,405	4,637	52,316	70,494	0,024
≥ 50%	21	54,395	7,335	40,019	68,771	
Total	38	62,576	5,115	52,550	72,601	
Êmbolos						
Sim	24	30,266	4,621	21,209	39,322	<0,001
Não	33	65,699	5,246	55,418	75,980	
Total	57	57,344	4,462	48,598	66,090	
FIGO						
I	17	74,539	6,211	62,366	86,712	<0,001
II	5	65,920	8,829	48,615	83,226	
III	22	36,100	5,836	24,662	47,538	
IV	14	18,800	3,886	11,183	26,417	
Total	58	56,883	4,445	48,171	65,595	
FIGO (2 categorias)						
I e II	22	75,116	5,413	64,507	85,725	<0,001
III e IV	36	31,290	4,473	22,523	40,057	
Total	58	56,883	4,445	48,171	65,595	
Tam. Tum (cm) 2 categ.						
≤ 5,0	27	55,407	4,821	45,957	64,857	0,446
> 5,0	25	55,794	6,912	42,246	69,341	
Total	52	59,712	4,554	50,786	68,639	
Status cirurgia						
R0	37	66,423	4,965	56,692	76,154	<0,001
R1+R2	16	20,106	5,061	10,187	30,026	
Total	53	58,623	4,590	49,627	67,619	

*Calculado somente com os valores conhecidos

4.9 Sobrevida Livre de Doença – Regressão de Cox

O modelo final de associação entre as variáveis independentes e a sobrevida livre de doença para a população geral foi composto pelo subtipo histológico, estadiamento pela FIGO, presença de êmbolos neoplásicos e tamanho do tumor (tabela 35).

As mulheres com tumores Tipo II apresentaram um risco 2 vezes maior de evoluir com recidiva em relação àquelas com subtipo I ($p < 0,001$). Quanto mais avançado o estágio na ocasião do tratamento, pior a sobrevida livre de doença, representando um aumento do risco de 2,09, 3,09 e 9,31, para os estádios II, III e IV, respectivamente. Tumores com êmbolos neoplásicos na microscopia tiveram 2,09 mais risco de recidiva ($p = 0,002$), e aqueles com maior dimensão tiveram aumento do risco de 3,06 ($p = 0,033$).

Tabela 35: Análise da sobrevida livre de doença da população geral – Regressão de Cox (n=1.038)

Variáveis	HR*	IC 95%**	p valor
Subtipo Histológico			
Tipo I	1,00	----	----
Tipo II	2,00	1,37 - 2,92	<0,001
Estadiamento (FIGO)			
I	1,00	----	----
II	2,09	1,25 - 3,49	0,005
III	3,09	1,98 - 4,81	<0,001
IV	9,31	5,48 - 15,79	<0,001
Êmbolos neoplásicos			
Não	1,00	----	----
Sim	2,09	1,47 - 2,98	0,002
Tamanho do tumor			
≤2,0 cm	1,00	----	----
> 2,0 a ≤ 5,0 cm	1,76	0,63 - 4,91	0,280
> 5,0 cm	3,06	1,09 - 8,56	0,033

*HR= Hazard Ratio; **IC=Intervalo de Confiança

Para as 912 pacientes da população diagnosticada com adenocarcinoma Tipo I, a análise de SLD pela regressão de Cox demonstrou que estadiamento pela FIGO, invasão miometrial e presença de êmbolos neoplásicos foram associados a sobrevida livre de doença (tabela 36).

Quanto mais avançada a doença, pior o prognóstico, sendo que os casos com estadiamento IV tiveram risco 17,81 vezes maior de evoluir com pior SLD em relação ao estadiamento I ($p < 0,001$). Tumores com invasão de 50% ou mais do miométrio representaram risco de 2,18 ($p = 0,004$) e aqueles com êmbolos neoplásicos um risco de 1,80 ($p = 0,043$). O restante das variáveis estudadas não demonstrou impacto na SLD deste grupo.

Tabela 36: Análise da sobrevida livre de doença dos casos de adenocarcinoma Tipo I – Regressão de Cox (n=912)

Variáveis	HR*	IC 95%**	p valor
Estadiamento (FIGO)			
I	1,00	----	----
II	3,97	1,82 - 6,68	0,001
III	3,09	1,42 - 6,67	0,004
IV	17,81	6,18 - 51,31	<0,001
Êmbolos neoplásicos			
Não	1,00	----	----
Sim	1,80	1,02 - 3,19	0,043
Invasão miometrial			
< 50%	1,00	----	----
≥ 50%	2,18	1,28 - 3,71	0,004

*HR= Hazard Ratio; **IC=Intervalo de Confiança

Para as 108 pacientes da população diagnosticada com adenocarcinoma do Tipo II, a análise de SLD pela regressão de Cox demonstrou associação com estadiamento pela FIGO (I e II versus III e IV), status da cirurgia, presença de êmbolos neoplásicos e o IMC (tabela 37).

Pacientes diagnosticadas nos estádios avançados (III e IV) apresentaram risco de 2,17 vezes maior de evoluir com recidiva ($p = 0,44$). Este risco também foi maior quando houve doença residual nas cirurgias (HR=3,37 e IC 95% 1,38 - 8,23) e na presença de êmbolos neoplásicos (invasão linfovascular) na microscopia (HR=2,14 e

IC 95% 1,06 - 4,35). Pacientes com sobrepeso ou obesidade tiveram menor risco de recidiva em relação aquelas com peso adequado (HR=0,41 e IC 95% 0,19 - 0,89).

Tabela 37: Análise da sobrevida livre de doença dos casos de adenocarcinoma Tipo II – Regressão de Cox (n=108)

Variáveis	HR*	IC 95%**	p valor
Estadiamento (FIGO)			
I e II	1,00	----	----
III e IV	2,17	1,02 - 4,61	0,044
Status da cirurgia			
R0	1,00	----	----
R1+R2	3,37	1,38 - 8,23	0,008
Êmbolos neoplásicos			
Não	1,00	----	----
Sim	2,14	1,06 - 4,35	0,034
Índice de massa corporal			
Adequado	1,00	----	----
Sobrepeso e obeso	0,41	0,19 - 0,89	0,025

*HR= Hazard Ratio; **IC=Intervalo de Confiança

4.10 Sobrevida Global – Regressão de Cox

Para as 1.038 pacientes da população geral, a análise de SG pela regressão de Cox demonstrou associação com subtipo histológico, estadiamento pela FIGO, invasão miometrial, PS, cirurgia incompleta e idade (tabela 38).

Tumores Tipo II apresentaram risco 1,90 maior de evolução com óbito ($p=0,004$). Quanto maior o estadiamento, maior o risco, variando de 2,89 (Ec II) a 7,81 (Ec IV). Aqueles com invasão miometrial profunda ($\geq 50\%$) apresentaram risco 2,09 vezes maior de óbito ($p<0,001$), bem como mulheres com piores condições clínicas à matrícula ($PS \geq 2$), submetidas a cirurgia incompleta e idosas ($p=0,023$, $p=0,003$ e $p<0,001$, respectivamente).

Tabela 38: Análise da sobrevida global da população geral – Regressão de Cox (n=1.038)

Variáveis	HR*	IC 95%**	p valor
Subtipo Histológico			
Tipo I	1,00	----	----
Tipo II	1,90	1,23 - 2,94	0,004
Estadiamento (FIGO)			
I	1,00	----	----
II	2,89	1,62 - 5,17	<0,001
III	4,04	2,36 - 6,90	<0,001
IV	7,81	4,07 - 14,99	<0,001
Invasão miometrial			
< 50%	1,00	----	----
≥ 50%	2,09	1,45 - 3,00	<0,001
PS			
0	1,00	----	----
1	1,72	0,75 - 3,98	0,201
≥2	3,40	1,18 - 9,80	0,023
Cirurgia incompleta			
Não	1,00	----	----
Sim	1,75	1,21 - 2,52	0,003
Idade			
< 65 anos	1,00	----	----
≥ 65 anos	2,06	1,42 - 2,97	<0,001

*HR= Hazard Ratio; **IC=Intervalo de Confiança

O modelo final da associação entre as variáveis independentes e a SG, para as 912 pacientes da população diagnosticada com adenocarcinoma Tipo I, encontra-se na tabela 39.

O estadiamento IV apresentou risco 9,19 vezes maior de evoluir com óbito, em relação ao estágio I ($p < 0,001$). Mulheres que trataram tumores com invasão miometrial profunda, com alto grau de diferenciação, cardiopatas, com recidiva e idosas apresentaram pior sobrevida global ($p = 0,001$, $p = 0,008$, $p = 0,004$, $p < 0,001$ e $p < 0,001$, respectivamente).

Tabela 39: Análise da sobrevida global dos casos de adenocarcinoma Tipo I – Regressão de Cox (n=912)

Variáveis	HR*	IC 95%**	p valor
Estadiamento (FIGO)			
I	1,00	----	----
II	2,79	1,47 - 5,30	0,002
III	1,87	0,93 - 3,73	0,078
IV	9,19	4,02 - 20,97	<0,001
Invasão miometrial			
< 50%	1,00	----	----
≥ 50%	2,00	1,30 - 3,06	0,001
Grau de diferenciação			
1 e 2	1,00	----	----
3	1,89	1,17 - 3,02	0,008
Cardiopatia			
Não	1,00	----	----
Sim	2,26	1,29 - 3,95	0,004
Recidiva			
Não	1,00	----	----
Sim	6,19	3,98 - 9,64	<0,001
Idade			
< 65 anos	1,00	----	----
≥ 65 anos	2,39	1,55 - 3,67	<0,001

*HR= Hazard Ratio; **IC=Intervalo de Confiança

Para as 108 pacientes da população diagnosticada com adenocarcinoma Tipo II, a análise de SG pela regressão de Cox demonstrou que o estadiamento avançado (III e IV) foi associado a pior sobrevida em relação aos estádios precoces (HR=1,92 e IC 95% 1,06 - 3,47). Os tumores com êmbolos neoplásicos (HR=1,93 e IC 95% 1,09 - 3,40) e os casos com recidiva também foram associados a maior risco de óbito (HR=6,20 e IC 95% 3,23 - 11,92) (tabela 40).

Tabela 40: Análise da sobrevida global dos casos de adenocarcinoma Tipo II – Regressão de Cox (n=108)

Variáveis	HR*	95% IC**	p valor
Estadiamento (FIGO)			
I e II	1,00	----	----
III e IV	1,92	1,06 - 3,47	0,032
Êmbolos neoplásicos			
Não	1,00	----	----
Sim	1,93	1,09 - 3,40	0,024
Recidiva			
Não	1,00	----	----
Sim	6,20	3,23 - 11,92	<0,001

*HR= Hazard Ratio; **IC=Intervalo de Confiança

5. RESULTADOS ANÁLISES MOLECULARES

5.1 Análise Randômica por Microarranjo

De 1.038 pacientes elegíveis para o estudo, 912 foram diagnosticadas como adenocarcinoma endometriode (Tipo I), sendo 879 nos estádios I (n=644), II (n=124) e III (n=111). Inicialmente, foram selecionados 21 casos de pacientes submetidas a cirurgia completa, com estadiamento final em uma destas três categorias. Em 10 casos não houve história de recorrência até dezembro de 2013 (5 deles com Ec I), e 11 casos haviam cursado com recidiva (5 deles com Ec I). O tempo médio de seguimento entre os casos com recidiva foi de 12,7 meses (DP=4,53); o tempo entre os sem recidiva foi de 24,7 meses (DP=19,65). Não houve diferença significativa entre os dois intervalos (p=0,064). Foi extraído RNA total do tecido tumoral fresco congelado de 10 casos no Ec I, 4 no Ec II e 7 Ec no III, com obtenção de concentrações satisfatórias para proceder à análise de microarranjo (tabela 41).

Tabela 41: Casos de adenocarcinoma Tipo I, nos Ec I, II e III, com extração de RNA total para a análise de microarranjo (n=21)

Pacientes	Estadiamento	Status Recidiva
1	IAG1	SR
2	IAG1	SR
3	IBG3	SR
4	IBG3	SR
5	IAG1	SR
11	IAG1	CR
12	IBG3	CR
13	IBG2	CR
14	IBG3	CR
15	IAG1	CR
6	IIG2	SR
7	IIG2	SR
16	IIG2	CR
17	IIG2	CR
8	IIIC1G2	SR
9	IIIC2G2	SR
10	IIIC1G3	SR
18	IIIAG2	CR
19	IIIC2G1	CR
20	IIIC1G2	CR
21	IIIC1G3	CR

SR= sem recidiva; CR= com recidiva; G=grau de diferenciação histológica (1, 2 ou 3); algarismos romanos= estádios conforme critérios da FIGO

Primeiramente, na análise de microarranjo, foram avaliados somente os tumores de pacientes com o Ec I, que apresentaram ou não recidiva. Os parâmetros estatísticos iniciais aplicados para a seleção dos genes diferencialmente expressos (GDE) entre estes tumores foram $p < 0,1$ e *fold-change* de pelo menos duas vezes. Como não foi possível identificar nenhum GDE por meio destes parâmetros, o p valor não foi mais aplicado e o critério de seleção passou a ser o *fold-change* de pelo menos três vezes entre os casos com e sem recidiva. Assim, foram identificados 99 GDE que caracterizaram o *status* “recidiva”. Destes, quatro não apresentam *gene symbol* e foram retirados das análises, totalizando 95 genes (36 com níveis de expressão menores e 59 com níveis de expressão maiores no grupo “recidiva” em relação ao grupo “não-recidiva”) (anexo 5).

Inicialmente foi realizada análise de agrupamento hierárquico Bayesiano (BHC, *Bayesian Hierarchical Clustering*), ou seja, uma análise não supervisionada, com os 10 casos do estágio I, utilizando-se os 95 genes. Observou-se a separação de dois grupos distintos neste estadiamento, um com recidiva e outro sem recidiva. O grupo A foi caracterizado somente com casos que apresentaram recidiva; o grupo B foi caracterizado com casos predominantemente sem recidiva, à exceção de R1_12. (figura 14).

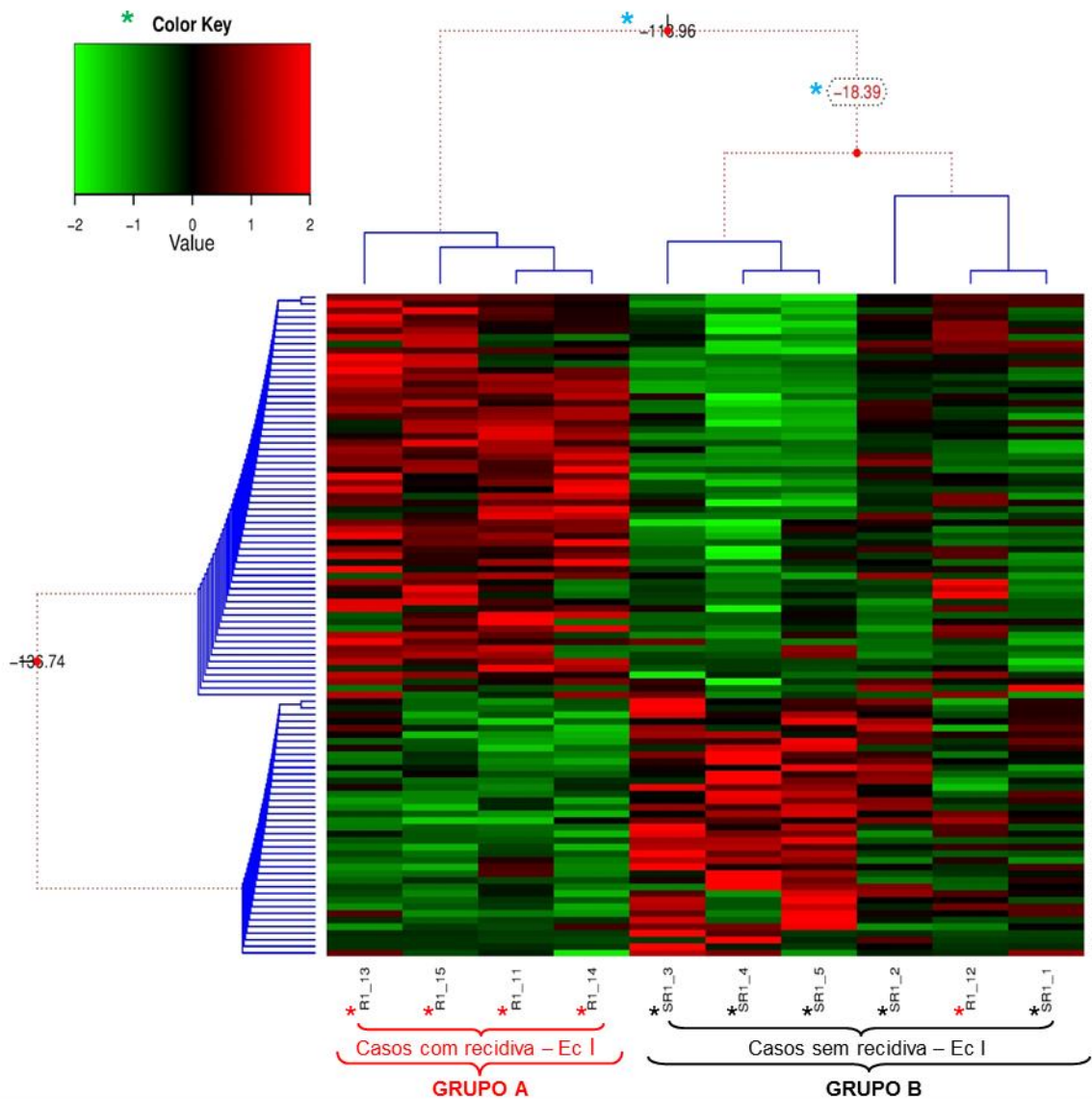


Figura 14: *Heatmap* representativo do agrupamento dos casos de adenocarcinoma Tipo I, no estágio I, com e sem recidiva (n=10).

- * As cores em vermelho e verde representam a escala Z de fluorescência que varia de 2 a -2, respectivamente. **Grupo A**: casos com recidiva; **Grupo B**: casos predominantemente sem recidiva.
- * R= casos com recidiva, discriminada a paciente de cada caso. Ex: R1_13= paciente 13, no Ec I, com recidiva.
- * SR= casos sem recidiva, discriminada paciente de cada caso. Ex: SR1_3= paciente 3, no Ec I, sem recidiva. R1_12 foi o único caso de recidiva agrupado com os casos de não recidiva.
- * Os números sobre os ramos são as chances de *log* para fusão.

No intuito de avaliar se o mesmo conjunto de GDE discriminaria o *status* “recidiva” nos diferentes estadiamentos, foi realizada nova análise de agrupamento (BHC) com as 21 amostras dos Ec I, II e III, utilizando os valores de expressão dos 95 GDE. Mais uma vez observou-se um agrupamento de casos com recidiva (grupo C) e um agrupamento de casos sem recidiva (grupo D), com exceção dos casos SR3_8 e SR3_9 (casos sem recidiva, agrupados em C) e R2_17 e R3_21 (casos com recidiva, agrupados em D). Nesta análise, comparando apenas os casos do estágio I nos dois grupos, observou-se que todos aqueles com recidiva se encontravam no grupo C e todos sem recidiva no grupo D, demonstrando que os tumores diagnosticados neste estadiamento caracterizam melhor as amostras com e sem recidiva quando comparados aos tumores dos Ec II e III (figura 15).

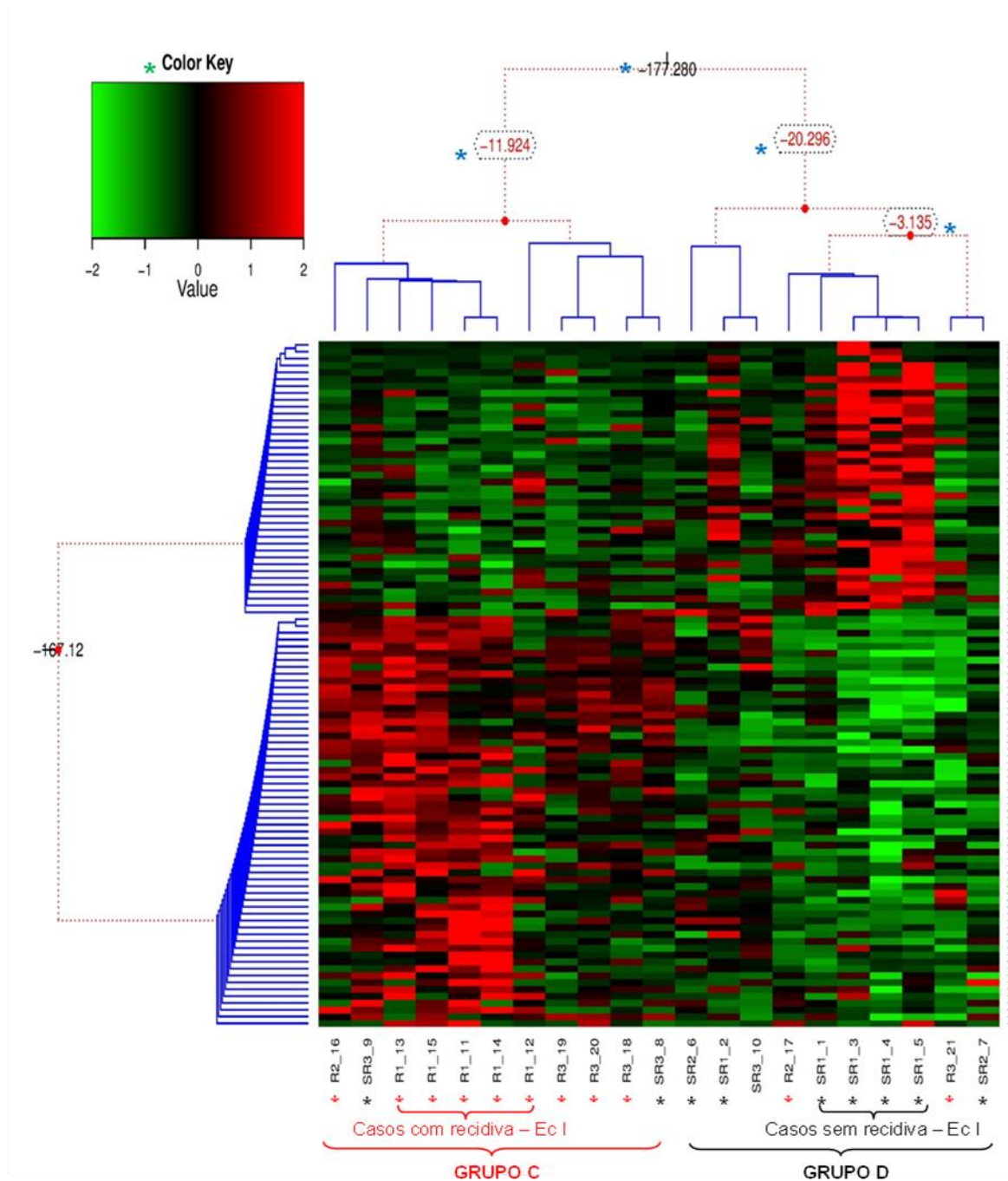


Figura 15: Heatmap representativo do agrupamento dos casos de adenocarcinoma Tipo I, nos estádios I, II e III, com e sem recidiva (n=21).

* As cores em vermelho e verde representam a escala Z de fluorescência que varia de 2 a -2, respectivamente. **Grupo C**: casos predominantemente com recidiva; **Grupo D**: casos predominantemente sem recidiva. * R= casos com recidiva, discriminados estadiamento e paciente de cada caso. Ex: R2_16= paciente 16, no Ec II, com recidiva. * SR= casos sem recidiva, discriminados estadiamento e paciente de cada caso. Ex: SR3_8= paciente 8, no Ec III, sem recidiva.

*Os números sobre os ramos são as chances de *log* para fusão.

Posteriormente, por meio do programa PAM (*Prediction Analysis for Microarrays*) [COOKE *et al.*, 2011], foi realizada uma análise supervisionada dos 21 casos utilizando os 95 GDE, que resultou em 62 genes discriminantes do *status* “recidiva”, sendo 20 com níveis de expressão menores e 42 com níveis de expressão maiores na recidiva (anexo 6). O gene de maior nível de expressão nas amostras com recidiva foi *PGR*.

A partir dos 62 genes mais informativos do desfecho “recidiva”, foi realizado o enriquecimento de vias através do pacote de análise de dados *Ingenuity Systems Inc*[®]. Desta análise foram identificadas cinco vias de sinalização celular diferentes, sendo que numa delas *PGR* foi novamente destacado como gene mais expresso na recidiva. Com isto, foram selecionados para validação os genes de relevância com potencial para possível uso como marcador prognóstico de recidiva da doença relacionados à via de *PGR* (figura 16). As outras vias enriquecidas pelo programa estão representadas no anexo 7. Os genes selecionados para validação e respectivos *fold-changes* estão enumerados na tabela 42.

Tabela 42: : Genes selecionados pela análise de microarranjo, mais expressos nos casos de recidiva do Ec I em comparação com os casos que não apresentaram recidiva no mesmo estágio

Gene	Nome	Ordem*	<i>Fold-Change</i>
<i>PGR</i>	Regulador do Receptor de Progesterona	1º	16,98
<i>ESR1</i>	Regulador do Receptor de Estrogênio 1	16º	4,03
<i>GREB1</i>	<i>Growth Regulation by Estrogen in Breast Cancer 1</i>	22º	3,37

* Ordem decrescente em expressão nos casos de recidiva no Ec I

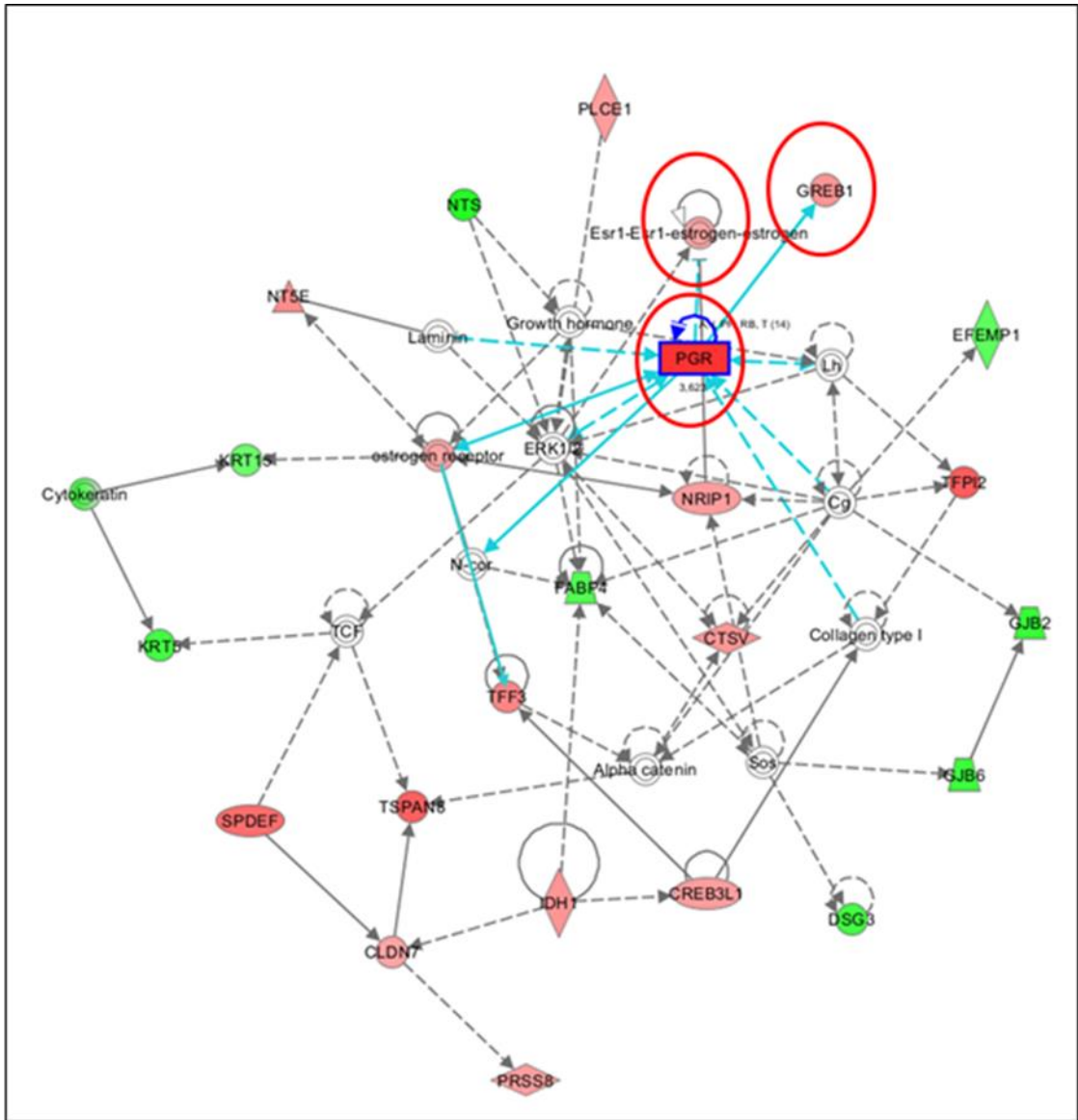


Figura 16: Esquema representativo de via com genes mais expressos nos casos de recidiva de adenocarcinoma Tipo I, no estádio I, e os genes selecionados para validação

PGR: gene com maior expressão entre os 62 do *status* "recidiva"; selecionados *ESR1* e *GREB1* (interligados a *PGR* numa mesma via) para validação; Genes em caixas em vermelho: genes com níveis de expressão maior; Genes em caixas em verde: genes com níveis de expressão menor.

Linha tracejada: interação indireta; linha contínua: interação direta

□ Receptor nuclear ligante-dependente

⊙ Grupo ou complexo

○ Outro

→ "Atua em"

⊥ → "Inibe e atua em"

5.2 Análise de Expressão Gênica por PCR em Tempo Real

Após a análise de expressão gênica global por microarranjo, os genes diferencialmente expressos foram selecionados e, posteriormente, tiveram suas vias enriquecidas. Dentre as vias enriquecidas, destacou-se a via envolvendo os genes codificantes dos receptores hormonais de estrogênio (*ESR1*) e progesterona (*PGR*), ambos diferencialmente expressos nessa análise, além do gene *GREB1*. *PGR* foi identificado como o gene de maior expressão nos casos de pacientes com recidiva quando comparados com aqueles sem recidiva. Com a finalidade de validar os resultados ora encontrados, primeiramente foi realizada PCRq para os três genes selecionados, nas mesmas amostras dos dez casos utilizados no microarranjo e apenas *PGR* mostrou diferença significativa entre os dois grupos ($p=0,0159$) (figura 17). Como controle positivo, utilizamos o RNA da linhagem MCF-7 (linhagem de câncer de mama que expressa os receptores estrogênio e progesterona).

Posteriormente, foi avaliada a expressão dos três genes selecionados em um número maior de amostras. Após a extração de RNA dessas amostras armazenadas em blocos de parafina (denominadas de “amostras independentes”, excluindo as dez utilizadas no microarranjo), foi possível prosseguir com a análise por PCRq em 29 (96,7%) de 30 casos que apresentaram recidiva e em 59 (88,1%) dos 67 que não apresentaram recidiva, já que no restante não foi obtida concentração suficiente ou qualidade de RNA para aplicação da metodologia.

Os genes de referência utilizados inicialmente nesta etapa foram *GAPDH* e *ACTB*. Após o término da reação com ambos genes, observou-se com *GAPDH* a formação de um produto que ultrapassou o limiar de detecção de fluorescência (*threshold*) em um ciclo mais adequado, ao contrário de *ACTB*. Da mesma forma, a curva de dissociação de *GAPDH* não apresentou a formação de produtos inespecíficos e/ou contaminações durante a reação. Por isto, *GAPDH* foi utilizado como o gene referência nas análises de *PGR*, *ESR1* e *GREB1*.

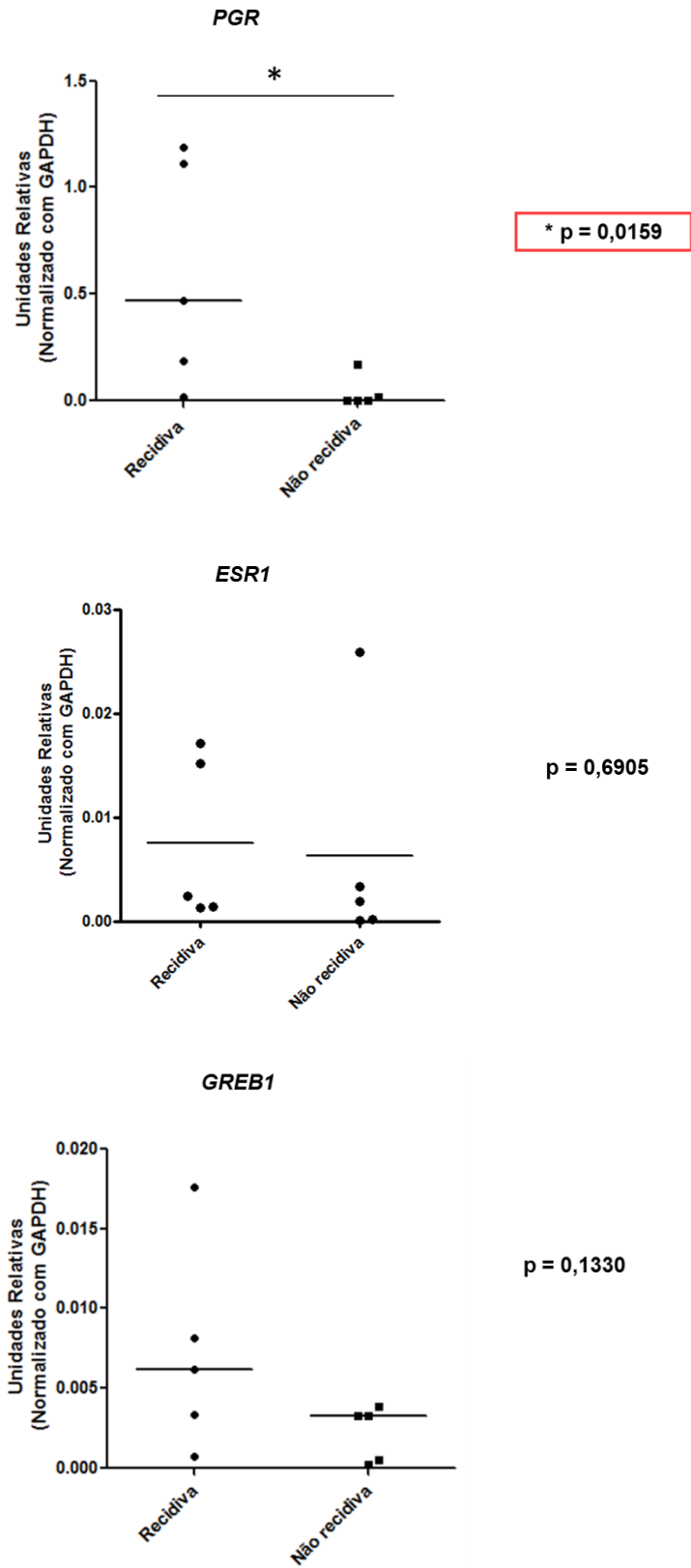


Figura 17: PCRq de *PGR*, *ESR1* e *GREB1* (normalizados por *GAPDH*) das amostras de adenocarcinoma Tipo I no Ec I, analisadas por microarranjo (5 casos com recidiva e 5 casos sem recidiva) - n=10.

O primeiro gene a ser analisado foi *ESR1*. De todos os casos utilizados, os resultados foram satisfatórios em 22 (75,9%) pacientes com recidiva e 42 (71,9%) pacientes sem recidiva, ou seja, no restante das amostras *ESR1* não se encontrava expresso ou apresentava nível de expressão muito baixo para que sua amplificação pudesse ser detectada. Através do teste de Mann-Whitney foi observada uma diferença de expressão estatisticamente significativa entre “recidiva” e “não recidiva” ($p < 0,0001$), ou seja, *ESR1* apresentou níveis de expressão maiores nos casos com recidiva do que naqueles que não apresentaram recidiva (figura 18).

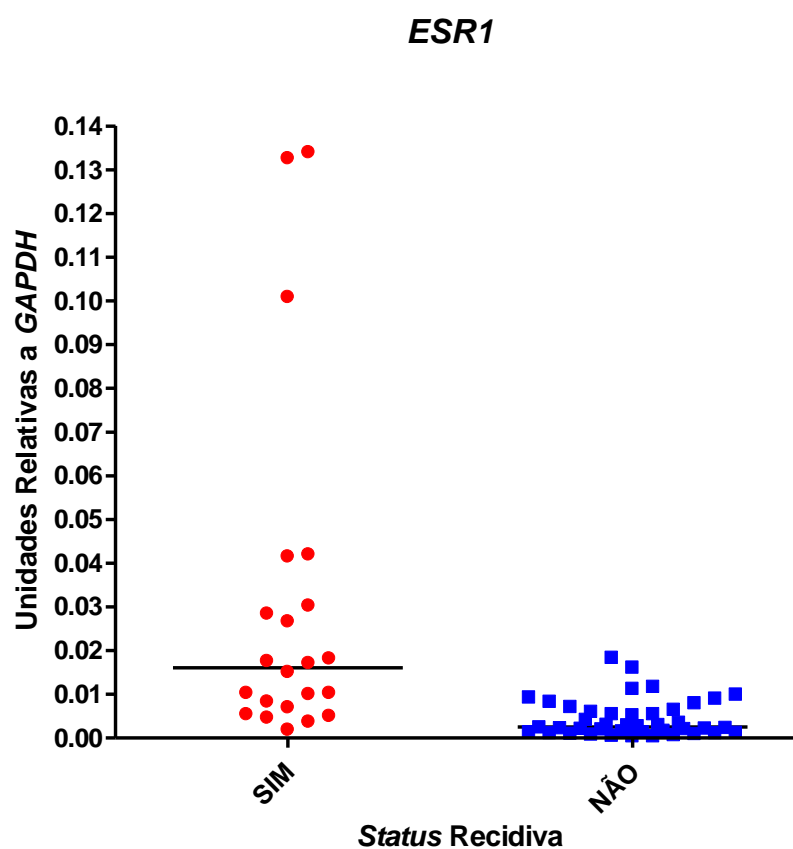


Figura 18: Gráfico da expressão gênica de *ESR1* por PCRq em amostras de adenocarcinoma Tipo I no estágio I, com recidiva (n=22) e sem recidiva (n=42), relativas a *GAPDH*.

Status “recidiva”: sim = com recidiva; não = sem recidiva. *** $p < 0,0001$

Embora tenham sido observadas três amostras discrepantes entre os casos com recidiva, ou seja, com níveis de expressão maiores que o restante, o teste de Grubbs (para avaliar se eram *outliers*) demonstrou que estes resultados não se tratavam de *outliers* em relação às outras amostras de tumores com recidiva.

Em seguida, foi realizada nova análise dos dados da PCRq de *ESR1* obtidos a partir das “amostras independentes” juntamente com aqueles obtidos das amostras utilizadas no microarranjo, totalizando 27 com recidiva e 47 sem recidiva. A diferença de expressão entre os casos “com recidiva” e os “sem recidiva” se manteve estatisticamente significativa ($p < 0,0001$).

A partir do resultado com as “amostras independentes”, foram verificadas a sensibilidade e a especificidade da expressão gênica de *ESR1* em distinguir pacientes com e sem recidiva e, para isso, foi feita uma curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*). Esta curva demonstrou que o mesmo confere elevados níveis de sensibilidade (81,4%) e especificidade (65,9%), com $p < 0,0001$ e acurácia de 87% (IC 95% 0,781 – 0,960). O *cut-off* foi $> 0,003912$ (figura 19).

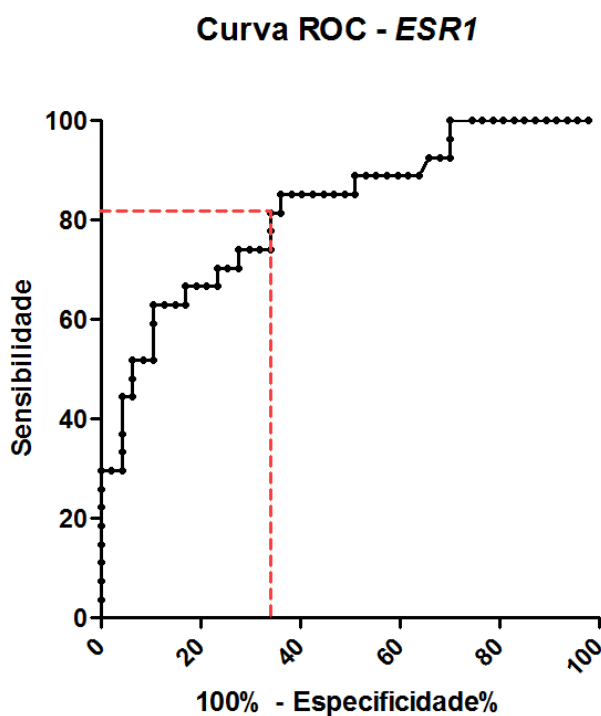


Figura 19: Curva ROC representativa da sensibilidade e especificidade da expressão gênica de *ESR1* por PCRq em amostras de adenocarcinoma Tipo I no Ec I, com recidiva (n=22) e sem recidiva (n=42).

Em seguida, o gene analisado foi *PGR*. De todos os casos utilizados, os resultados foram satisfatórios em 19 (65,5%) pacientes com recidiva e 19 (32,2%) pacientes sem recidiva, ou seja, no restante das amostras *PGR* não se encontrava expresso ou apresentava nível de expressão muito baixo para que sua amplificação pudesse ser detectada. O teste de Mann-Whitney mostrou que não houve uma diferença de expressão estatisticamente significativa entre “recidiva” e “não recidiva” ($p=0,3502$), ou seja, *PGR* não apresentou níveis de expressão maiores nos casos com recidiva em comparação aos que não apresentaram recidiva (figura 20).

Em seguida, foi realizada nova análise dos dados da PCRq de *PGR* obtidos a partir das “amostras independentes” juntamente com aqueles obtidos das amostras utilizadas no microarranjo, totalizando 24 com recidiva e 24 sem recidiva. A diferença de expressão entre os dois grupos também não foi significativa ($p=0,8447$).

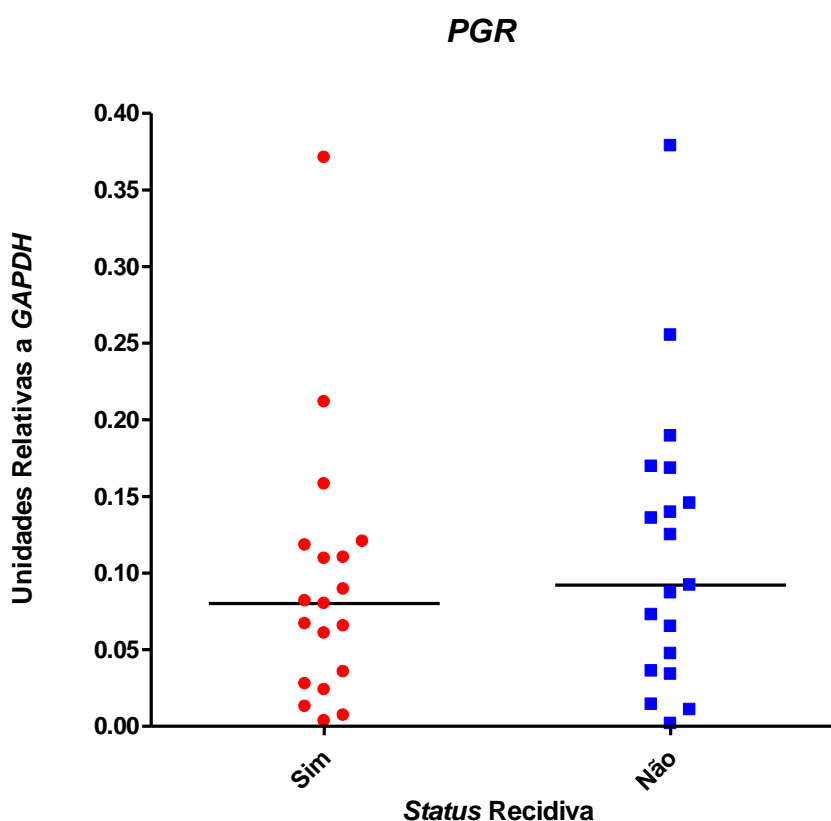


Figura 20: Gráfico da expressão gênica de *PGR* por PCRq em amostras de adenocarcinoma Tipo I no Ec I, com recidiva (n=19) e sem recidiva (n=19), relativas a *GAPDH*.

Status “recidiva”: sim = com recidiva; não = sem recidiva. $p=0,3502$

O terceiro gene a ser analisado foi *GREB1*. De todos os casos utilizados, os resultados foram satisfatórios em apenas 2 (6,9%) pacientes com recidiva e 13 (22,0%) pacientes sem recidiva. Portanto, no restante das amostras *GREB1* não se encontrava expresso ou apresentava nível de expressão muito baixo para que sua amplificação pudesse ser detectada, o que tornou a análise deste gene inviável (figura 21).

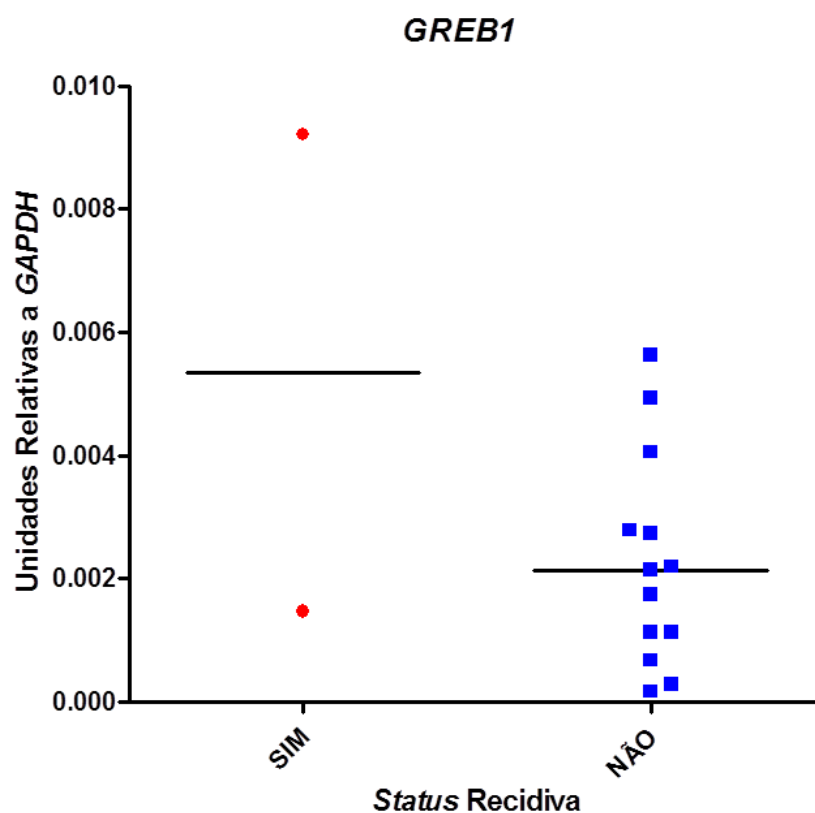


Figura 21: Gráfico da expressão gênica de *GREB1* por PCRq em amostras de adenocarcinoma Tipo I no Ec I, com recidiva (n=2) e sem recidiva (n=13), relativas a *GAPDH*.

Status "recidiva": sim = com recidiva; não = sem recidiva. Não foi possível o cálculo do p valor

Com a finalidade de avaliar se tal resultado estava relacionado a uma baixa expressão de *GREB1*, característica própria deste gene, ou à conservação do material por se tratar de RNA total extraído de tumores armazenados em blocos de parafina, foi realizada PCRq de 12 amostras frescas congeladas de adenocarcinoma Tipo I, no Ec I. Com esta análise observou-se que, embora fosse possível detectar a expressão de *GREB1* em todas as amostras, os níveis de expressão deste gene são muito baixos, o que provavelmente representa a incapacidade de análise por PCRq a partir da extração de RNA de bloco de parafina (figura 22).

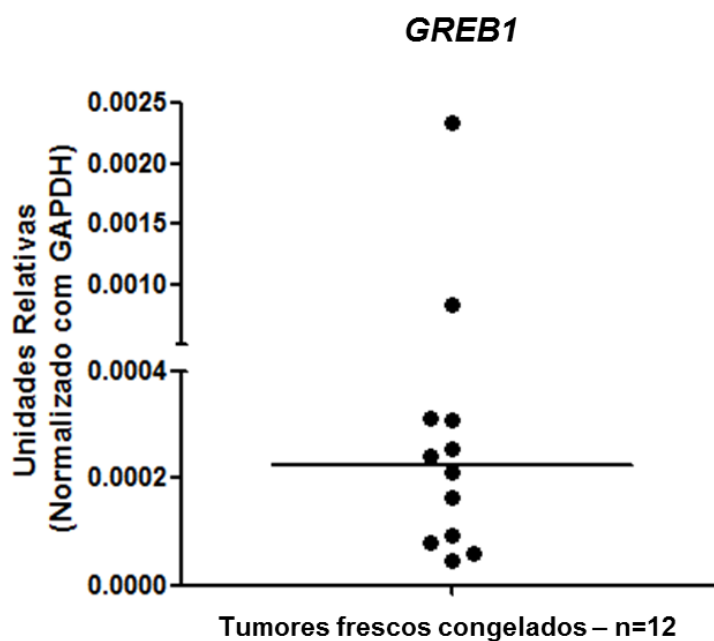


Figura 22: Gráfico da expressão gênica de *GREB1* por PCRq em amostras frescas congeladas de adenocarcinoma Tipo I no Ec I, relativas a *GAPDH* (n=12)

5.3 Análise de Expressão Proteica por Imuno-Histoquímica

A avaliação da expressão proteica do receptor de estrogênio 1 ou α (ER), do receptor de progesterona (PR) e do *Growth Regulation by Estrogen in Breast Cancer 1* (GREB1) foi realizada em tumores de 35 pacientes que apresentaram recidiva e em 72 que não recidivaram. Dentre estes 107 casos avaliados, estão incluídos os dez tumores submetidos à análise de microarranjo.

Dos 107 casos, ER se mostrou positivo em 93 (86,9%) e negativo em 14 (13,1%); PR foi considerado positivo em 85 (79,4%) e negativo em 22 (20,6%); GREB1 foi positivo em 54 (50,5%) e negativo em 53 (49,5%) (tabela 43).

A IH para ER nos 35 tumores com recidiva mostrou que 4 (11,4%) foram negativos; 9 (25,8%) foram considerados 1+; 11 positivos para 2+ e 11 para 3+ (31,4 % cada). Dos 72 casos sem recidiva, 10 (13,9%) foram considerados negativos; 16 (22,2%) foram positivos para 1+; 16 (22,2%) para 2+; 30 (41,7%) para 3+; (tabela 44 e figura 23). Não houve diferença significativa entre os grupos de pacientes que recidivaram daqueles que não apresentaram recidiva ($p=0,6443$). Entre os tumores dos 10 casos utilizados na análise de microarranjo, dos 5 que não apresentaram recidiva, três foram positivos e dois negativos; os 5 casos com recidiva foram positivos.

A IH para PR nos 35 tumores com recidiva mostrou que 6 (17,1%) foram negativos; 10 (28,6%) foram considerados 1+; 10 considerados (28,6%) 2+; e 9 foram 3+ (25,7 % cada). Dos 72 casos sem recidiva, 16 (22,2%) foram considerados negativos; 18 (25,0%) foram positivos para 1+; 15 (20,8%) para 2+; 23 (32,0%) para 3+ (tabela 44 e figura 24). Assim como observado para ER, não houve diferença significativa entre os grupos avaliados ($p=0,7245$). Entre os tumores dos 10 casos utilizados na análise de microarranjo, dos 5 que não apresentaram recidiva, três foram positivos e dois negativos; os 5 casos com recidiva foram positivos.

A IH para GREB1 nos 35 tumores com recidiva mostrou que 23 (65,7%) foram negativos e 12 (34,3%) foram positivos. Dos 72 casos sem recidiva 30 (41,7%) foram negativos e 42 (58,3%) foram positivos (tabela 44 e figura 25), sendo encontrada uma diferença estatisticamente significativa entre estes dois grupos ($p=0,0196$). Entre os tumores dos 10 casos utilizados na análise de microarranjo, dos 5 que não apresentaram recidiva, dois foram positivos e 3 negativos; dos 5 casos com recidiva, um foi positivo e 4 negativos.

Tabela 43: Expressão detectada por imuno-histoquímica de ER, PR e GREB1, conforme classificação por área de marcação nuclear, de 107 casos de adenocarcinoma Tipo I no Ec I

Anticorpo	Classificação	Frequência (%)	Frequência Total + (%)
ER	Negativo	14 (13,1)	
	1+	25 (23,4)	
	2+	27 (25,2)	93 (86,9)
	3+	41 (38,3)	
	Total	107	
PR	Negativo	22 (20,6)	
	1+	28 (26,2)	
	2+	25 (23,4)	85 (79,4)
	3+	32 (29,8)	
	Total	107	
GREB1	Negativo	53 (49,5)	
	Positivo	54 (50,5)	54 (50,5)
	Total	107	

ER = Receptor de Estrogênio; PR = Receptor de Progesterona; GREB1= *Growth Regulation by Estrogen in Breast Cancer 1*

Tabela 44: Expressão detectada por imuno-histoquímica de ER, PR e GREB1, conforme classificação por área de marcação nuclear, nos casos com recidiva (n=35) e sem recidiva (n=72), de adenocarcinoma Tipo I no Ec I

Anticorpo	Classificação	Casos com Recidiva (%)	Casos sem Recidiva (%)	p valor
ER	Negativo	4 (11,4)	10 (13,9)	0,6443
	1+	9 (25,8)	16 (22,2)	
	2+	11 (31,4)	16 (22,2)	
	3+	11(31,4)	30 (41,7)	
	Total	35	72	
PR	Negativo	6 (17,1)	16 (22,2)	0,7245
	1+	10 (28,6)	18 (25,0)	
	2+	10 (28,6)	15 (20,8)	
	3+	9 (25,7)	23 (32,0)	
	Total	35	72	
GREB1	Negativo	23 (65,7)	30 (41,7)	0,0196
	Positivo	12 (34,3)	42 (58,3)	
	Total	35	72	

ER = Receptor de Estrogênio; PR = Receptor de Progesterona; GREB1= *Growth Regulation by Estrogen in Breast Cancer 1*

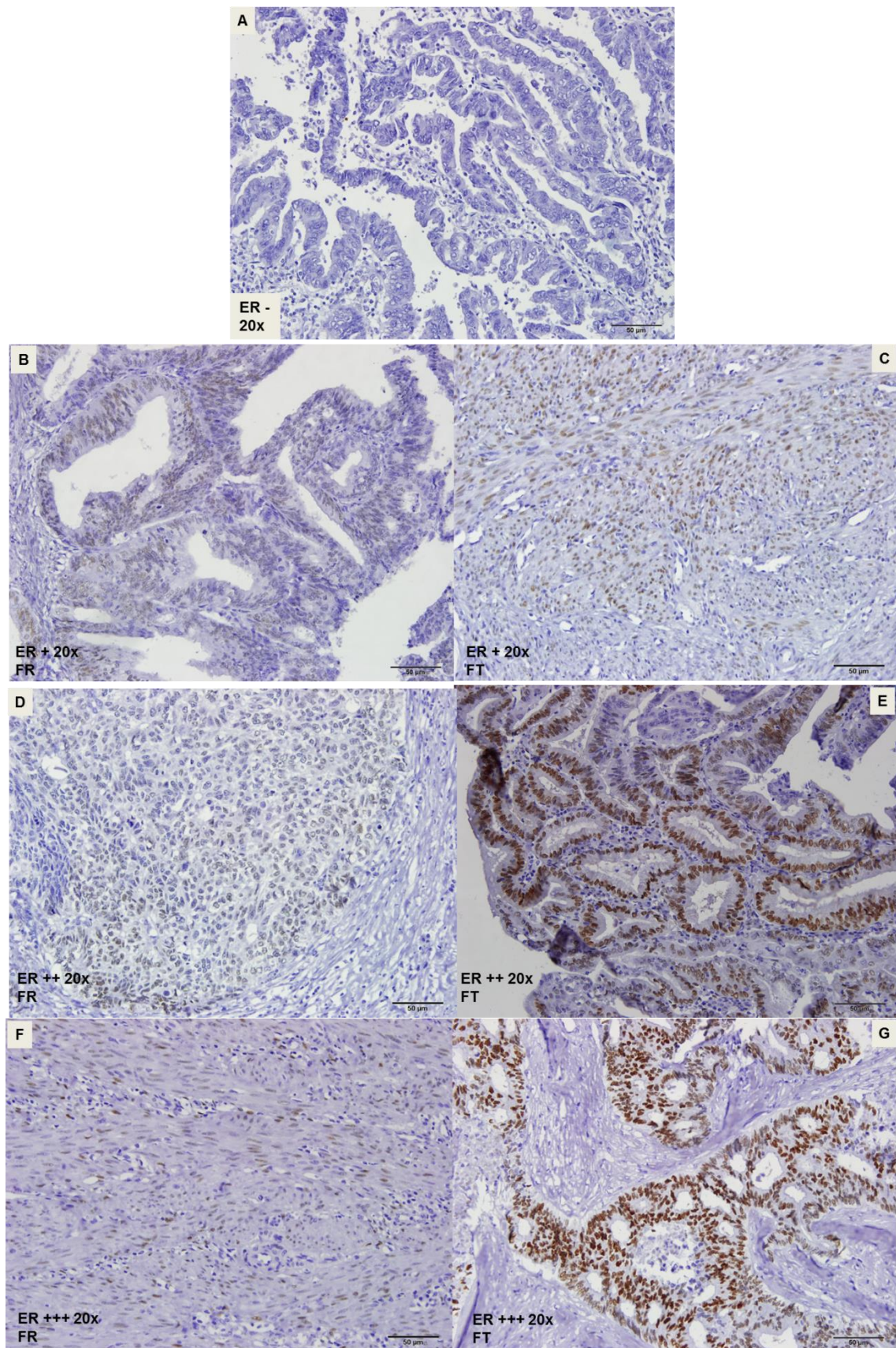


Figura 23: Amostras representativas dos diferentes scores de classificação da expressão proteica do receptor de estrogênio (ER), de acordo com a intensidade de marcação e com o percentual de células marcadas.

FR = intensidade de marcação fraca; FT = intensidade de marcação forte; A) Marcação negativa; B) 1+ FR; C) 1+ FT; D) 2+ FR; E) 2+ FT; F) 3+ FR; G) 3+ FT (objetiva de 20X)

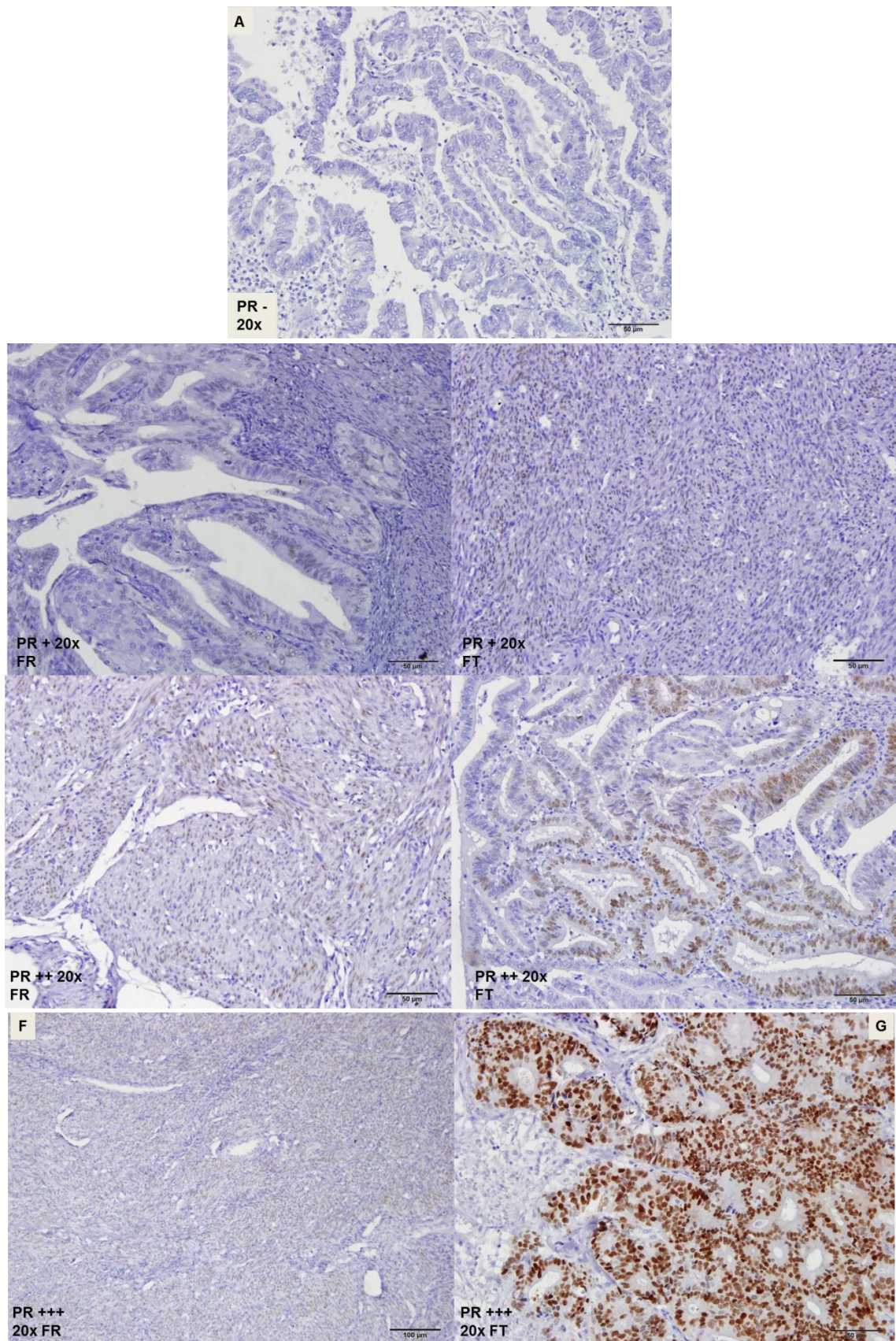


Figura 24: Amostras representativas dos diferentes scores de classificação da expressão proteica do receptor de progesterona (PR), de acordo com a intensidade de marcação e com o percentual de células marcadas.

FR = intensidade de marcação fraca; FT = intensidade de marcação forte; A) Marcação negativa; B) 1+ FR; C) 1+ FT; D) 2+ FR; E) 2+ FT; F) 3+ FR; G) 3+ FT (objetiva de 20X)

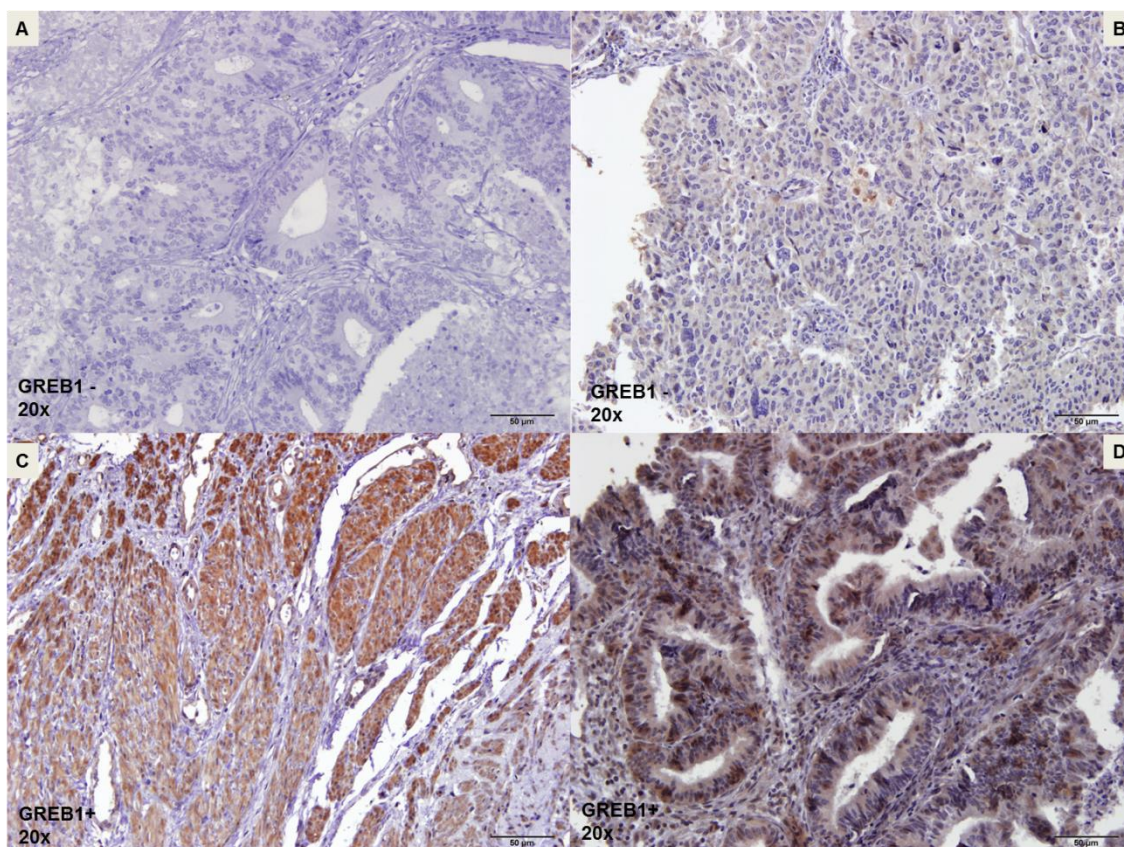


Figura 25: Classificação da expressão proteica de GREB1, de acordo com o percentual de células com marcação nuclear.

A) Marcação negativa (0%); B) Marcação negativa (marcação nuclear \leq 10%); C e D) Marcação positiva (marcação nuclear $>$ 10%). (objetiva de 20X)

A classificação conforme a intensidade e o percentual de células com marcação nuclear de ER e PR está representada na tabela 45. A frequência encontrada de cada um dos grupos se mostrou bastante heterogênea e não foi observada diferença estatisticamente significativa quando comparada a marcação fraca em ER entre os casos de recidiva e os sem recidiva ($p=0,8435$); com a marcação forte em ER entre os dois grupos ($p=0,8065$); com a marcação fraca em PR entre os casos de recidiva e os sem recidiva ($p= 0,2149$); e com a marcação forte em PR entre os dois grupos ($p= 0,0698$).

Tabela 45: Expressão detectada por imuno-histoquímica de PR e ER, conforme classificação por área e intensidade de marcação, dos casos com recidiva (n=35) e sem recidiva (n=72), de adenocarcinoma Tipo I no Ec I

Anticorpo	Classificação/ Marcação*	Casos com Recidiva (%)	Casos sem Recidiva (%)
ER	Negativo	4 (11,4)	10 (13,9)
	1+ FT	1 (2,8)	4 (5,5)
	2+ FT	3 (8,6)	7 (9,7)
	3+ FT	5 (14,3)	20 (27,8)
	1+ FR	8 (22,9)	12 (16,7)
	2+ FR	8 (22,9)	9 (12,5)
	3+ FR	6 (17,1)	10 (13,9)
	Total	35	72
PR	Negativo	6 (17,1)	16 (22,2)
	1+ FT	7 (20,0)	6 (8,3)
	2+ FT	7 (20,0)	8 (11,1)
	3+ FT	5 (14,3)	20 (27,8)
	1+ FR	3 (8,6)	12 (16,7)
	2+ FR	3 (8,6)	7 (9,7)
	3+ FR	4 (11,4)	3 (4,2)
	Total	35	72

ER = Receptor de Estrogênio; PR = Receptor de Progesterona; *FT= marcação forte; FR= marcação fraca

Além da avaliação da expressão proteica de ER, PR e GREB1 por percentual de marcação nuclear, foi analisada a associação das frequências da sua expressão às características clínico-patológicas e ao prognóstico.

Para expressão de ER, não foi encontrada associação com as características clínicas de adenocarcinoma Tipo I no Ec I (tabela 46). Considerando as características anátomo-patológicas, as pacientes com invasão miometrial menor que 50% apresentaram uma chance 3,911 vezes maior de ER ser positivo ($p=0,035$). Foi também observada associação entre grau de diferenciação e ER positivo, onde pacientes com tumores G1 e G2 tiveram chance 10,938 vezes maior de ER ser positivo ($p<0,001$) (tabela 47).

Tabela 46: Expressão de ER detectada por imuno-histoquímica, de casos positivos (n=93 – 86,9%) e negativos (n=14 – 13,1%), conforme as características clínicas de adenocarcinoma Tipo I no Ec I

Variável	ER		OR	IC 95%	(Mín/máx)	p valor
	Positivo (%)	Negativo (%)				
Idade						
< 65	52 (55,9)	9 (64,3)	0,795	0,219	2,264	0,555
≥ 65	41 (44,1)	5 (35,7)	Referência	-	-	
Total	93	14				
Diabetes						
Sim	27 (29,0)	3 (21,4)	0,667	0,172	2,579	0,555
Não	66 (71,0)	11 (78,6)	Referência	-	-	
Total	93	14				
Cardiopatía						
Sim	6 (6,5)	1 (7,1)	1,103	0,123	9,910	0,931
Não	86 (93,5)	13 (92,9)	Referência	-	-	
Total	92	14				
Hipertensão						
Sim	63 (67,7)	9 (64,3)	0,857	0,264	2,780	0,797
Não	30 (32,3)	5 (35,7)	Referência	-	-	
Total	93	14				
IMC						
Adequado	18 (20,2)	3 (30,0)	0,592	0,139	2,517	0,473
Sobrepeso+obesidade	71 (79,8)	7 (70,0)	Referência	-	-	
Total	89	10				
Uso ACO						
Sim	27 (45,0)	2 (28,6)	0,489	0,088	2,722	0,406
Não	33 (55,0)	5 (71,4)	Referência	-	-	
Total	60	7				
Uso TRH						
Sim	7 (12,3)	3 (30,0)	3,061	0,639	14,667	0,147
Não	50 (87,7)	7 (70,0)	Referência	-	-	
Total	57	10				
Idade menarca						
≤ 11 anos	16 (20,5)	4 (33,3)	0,516	0,138	1,932	0,320
> 11anos	62 (79,5)	8 (66,7)	Referência	-	-	
Total	78	12				
Idade menopausa						
≤ 45 anos	11 (16,2)	1 (9,1)	1,930	0,224	16,643	0,544
> 45 anos	57 (83,8)	10 (90,9)	Referência	-	-	
Total	68	11				

IMC= Índice de Massa Corporal; ACO= anticoncepcional oral; TRH= terapia de reposição hormonal

Tabela 47: Expressão de ER detectada por imuno-histoquímica, de casos positivos (n=93 – 86,9%) e negativos (n=14 – 13,1%), conforme as características anátomo-patológicas de adenocarcinoma Tipo I no Ec I

Variável	ER		OR	IC 95%	(mín/máx)	p valor
	Positivo (%)	Negativo (%)				
Invasão miometrial						
< 50%	48 (51,6)	3 (21,4)	3,911	1,024	14,934	0,035
≥ 50%	45 (48,4)	11 (78,6)	Referência	-	-	
Total	93	14				
Êmbolos neoplásicos						
Sim	13 (14,6)	2 (14,3)	1,023	0,254	4,119	1,000
Não	76 (85,4)	12 (85,7)	Referência	-	-	
Total	89	14				
Grau diferenciação						
1 e 2	79 (85,9)	5 (35,7)	10,938	3,163	37,824	<0,001
3	13 (14,1)	9 (64,3)	Referência	-	-	
Total	92	14				
Tamanho tumor (cm)						
≤ 5,0	49 (58,3)	4 (30,8)	0,571	0,056	5,873	0,159
> 5,0	28 (33,4)	8 (61,5)	Referência	-	-	
Total	84	13				
Óbito						
Sim	21 (22,6)	4 (28,6)	0,729	0,207	2,564	0,621
Não	72 (77,4)	10 (71,4)	Referência	-	-	
Total	93	14				

Para expressão de PR, as mulheres com peso adequado apresentaram 70% menos chance de PR ser positivo ($p=0,027$) (tabela 48). As pacientes com tumores de baixo grau (graus de diferenciação 1 e 2) apresentaram chance 3,781 vezes maior de PR ser positivo ($p=0,009$) (tabela 49).

Tabela 48: Expressão de PR detectada por imuno-histoquímica, de casos positivos (n=85 – 79,4%) e negativos (n=22 – 20,6%), conforme as características clínicas de adenocarcinoma Tipo I no Ec I

Variável	PR		OR	IC 95%	(Mín/máx)	p valor
	Positivo (%)	Negativo (%)				
Idade						
< 65	47 (55,3)	14 (63,6)	0,707	0,268	1,861	0,481
≥ 65	38 (44,7)	8 (36,4)	Referência	-	-	
Total	85	22				
Diabetes						
Sim	25 (29,4)	5 (22,7)	0,706	0,235	2,122	0,534
Não	60 (70,6)	17 (77,3)	Referência	-	-	
Total	85	22				
Cardiopatía						
Sim	6 (7,1)	1 (4,8)	0,658	0,075	5,784	0,704
Não	79 (92,9)	20 (95,2)	Referência	-	-	
Total	85	21				
Hipertensão						
Sim	58 (68,2)	14 (63,6)	0,815	0,305	2,174	0,682
Não	27 (31,8)	8 (36,4)	Referência	-	-	
Total	85	22				
IMC						
Adequado	14 (17,1)	7 (41,2)	0,294	0,096	0,905	0,027
Sobrepeso+obesidade	68 (82,9)	10 (58,8)	Referência	-	-	
Total	82	17				
Uso ACO						
Sim	22 (41,5)	7 (50,0)	1,409	0,432	4,593	0,568
Não	31 (58,5)	7 (50,0)	Referência	-	-	
Total	53	14				
Uso TRH						
Sim	9 (17,0)	1 (7,1)	0,376	0,044	3,250	0,358
Não	44 (83,0)	13 (92,9)	Referência	-	-	
Total	53	14				
Idade menarca						
≤ 11 anos	15 (20,3)	5 (31,3)	0,559	0,169	1,856	0,338
> 11anos	59 (79,7)	11 (68,7)	Referência	-	-	
Total	74	16				
Idade menopausa						
≤ 45 anos	11 (16,9)	1 (7,1)	2,648	0,313	22,391	0,355
> 45 anos	54 (83,1)	13 (92,9)	Referência	-	-	
Total	65	14				

IMC= Índice de Massa Corporal; ACO= anticoncepcional oral; TRH= terapia de reposição hormonal

Tabela 49: Expressão de PR detectada por imuno-histoquímica, de casos positivos (n=85 – 79,4%) e negativos (n=22 – 20,6%), conforme as características anátomo-patológicas de adenocarcinoma Tipo I no Ec I

Variável	PR		OR	IC 95%	(mín/máx)	p valor
	Positivo (%)	Negativo (%)				
Invasão miometrial						
< 50%	44 (51,8)	7 (31,8)	2,300	0,852	6,207	0,095
≥ 50%	41 (48,2)	15 (68,2)	Referência	-	-	
Total	85	22				
Êmbolos neoplásicos						
Sim	12 (14,5)	03 (15,0)	0,958	0,243	3,774	1,000
Não	71 (85,5)	17 (85,0)	Referência	-	-	
Total	83	20				
Grau diferenciação						
1 e 2	71 (84,5)	13 (59,1)	3,781	1,343	10,648	0,009
3	13 (15,5)	9 (40,9)	Referência	-	-	
Total	84	22				
Tamanho tumor (cm)						
> 2,0 e ≤ 5,0	51 (66,2)	10 (50,0)	1,962	0,725	5,309	0,202
> 5,0	26 (33,8)	10 (50,0)	Referência	-	-	
Total	77	20				
Óbito						
Sim	19 (22,4)	6 (27,3)	0,768	0,264	2,234	0,627
Não	66 (77,6)	16 (72,7)	Referência	-	-	
Total	85	22				

Não foi observada associação entre a expressão de GREB1 e as características clínicas (tabela 50). Entretanto, as mulheres com tumores de baixo grau de diferenciação (1 e 2) tiveram uma chance 2,722 vezes maior de GREB1 ser positivo (p=0,044) (tabela 51).

Tabela 50: Expressão de GREB1 detectada por imuno-histoquímica, de casos positivos (n=54 – 49,1%) e negativos (n=53 - 48,2%), conforme as características clínicas de adenocarcinoma Tipo I no Ec I

GREB1						
Variável	Positivo (%)	Negativo (%)	OR	IC 95%	(Mín/máx)	p valor
Idade						
< 65	32 (59,3)	29 (54,7)	1,204	0,559	2,590	0,635
≥ 65	22 (40,7)	24 (46,3)	Referência	-	-	
Total	54	53				
Diabetes						
Sim	17 (31,5)	13 (24,5)	0,707	0,303	1,654	0,423
Não	37 (68,5)	40 (75,5)	Referência	-	-	
Total	54	53				
Cardiopatía						
Sim	1 (1,9)	6 (11,5)	6,913	0,802	59,557	0,058
Não	53 (98,1)	46 (88,5)	Referência	-	-	
Total	54	52				
Hipertensão						
Sim	35 (64,8)	37 (69,8)	1,255	0,559	2,821	0,582
Não	19 (35,2)	16 (30,2)	Referência	-	-	
Total	54	53				
IMC						
Adequado	11 (21,2)	10 (21,3)	0,993	0,378	2,605	
Sobrepeso+obesidade	41 (78,8)	37 (78,7)	Referência	-	-	0,988
Total	52	47				
Uso ACO						
Sim	14 (41,2)	15 (45,5)	1,190	0,452	3,132	
Não	20 (58,8)	18 (54,5)	Referência	-	-	0,724
Total	34	33				
Uso TRH						
Sim	5 (14,7)	5 (15,2)	1,036	0,270	3,971	
Não	29 (85,3)	28 (84,8)	Referência	-	-	0,959
Total	34	33				
Idade menarca						
≤ 11 anos	11 (22,9)	9 (21,4)	1,090	0,402	2,958	
> 11anos	37 (77,1)	33 (78,6)	Referência	-	-	0,865
Total	48	42				
Idade menopausa						
≤ 45 anos	8 (18,6)	4 (11,1)	1,829	0,502	6,659	
> 45 anos	35 (81,4)	32 (88,9)	Referência	-	-	0,355
Total	43	36				

IMC= Índice de Massa Corporal; ACO= anticoncepcional oral; TRH= terapia de reposição hormonal

Tabela 51: Expressão de GREB1 detectada por imuno-histoquímica, de casos positivos (n=54 – 49,1%) e negativos (n=53 - 48,2%), conforme as características anátomo-patológicas de adenocarcinoma Tipo I no Ec I

Variável	GREB1					
	Positivo (%)	Negativo (%)	OR	IC 95%	(mín/máx)	p valor
Invasão miometrial						
< 50%	27 (50,0)	24 (45,3)	1,208	0,565	2,583	0,625
≥ 50%	27 (50,0)	29 (54,7)	Referência	-	-	
Total	54	53				
Êmbolos neoplásicos						
Sim	08 (14,8)	07 (14,3)	1,043	0,348	3,126	1,000
Não	46 (85,2)	42 (85,7)	Referência	-	-	
Total	54	49				
Grau diferenciação						
1 e 2	47 (87,0)	37 (71,2)	2,722	1,006	7,364	0,044
3	7 (13,0)	15 (28,8)	Referência	-	-	
Total	54	52				
Tamanho tumor (cm)						
≤ 5,0	27 (55,1)	26 (54,2)	2,889	0,534	15,633	0,321
> 5,0	16 (32,7)	20 (41,7)	Referência	-	-	
Total	49	48				
Óbito						
Sim	11 (20,4)	14 (26,4)	0,713	0,289	1,754	0,460
Não	43 (79,6)	39 (73,6)	Referência	-	-	
Total	54	53				

Foi analisada a chance de recidiva conforme a expressão das três proteínas por meio do cálculo da *Odds Ratio* (OR). A recidiva não foi estatisticamente associada à expressão positiva de PR e ER, tanto na análise bruta como na ajustada por idade. A expressão positiva de GREB1, bruta e ajustada por idade, conferiu uma associação de proteção, ou seja, tumores GREB1 positivos oferecem um risco 63% menor de evoluir com recidiva do que os negativos (OR= 0,37; p=0,021) (tabela 52).

Tabela 52: Chance de Recidiva conforme a Expressão de PR, ER e GREB1 detectada por imunohistoquímica, casos com recidiva (n=35) e sem recidiva (n=72), de adenocarcinoma Tipo I no Ec I

Anticorpo	Recidiva		OR Bruta		OR Ajustada *	
	Sim (%)	Não (%)	OR (IC 95%)	p valor	OR (IC 95%)	p valor
PR						
Positivo	29 (82,9)	56 (77,8)	1,38 (0,49- 3,91)	0,543	1,37 (0,49-3,90)	0,548
Negativo	6 (17,1)	16 (22,2)	Referência		Referência	
ER						
Positivo	31 (88,6)	62 (86,1)	1,25 (0,36-4,30)	0,724	1,00 (0,96-1,05)	0,846
Negativo	4 (11,4)	10 (13,9)	Referência		Referência	
GREB1						
Positivo	12 (34,3)	42 (58,3)	0,37 (0,16-0,87)	0,021	0,37 (0,16-0,86)	0,021
Negativo	23 (65,7)	30 (41,7)	Referência		Referência	

*Ajustada por idade; PR = Receptor de Progesterona; ER = Receptor de Estrogênio; GREB1= *Growth Regulation by Estrogen in Breast Cancer 1*

Por fim, foi determinada a associação entre a expressão de RNAm dos genes *PGR* e *ESR1*, e a expressão proteica de PR e ER, respectivamente. Para *PGR* foi observada uma associação estatisticamente significativa entre expressão de RNAm e expressão proteica, ou seja, quanto maior o score da expressão proteica, maiores os níveis de expressão gênica ($p=0,0230$) (figura 26). Para *ESR1* não há uma associação estatisticamente significativa entre ambas ($p=0,5999$) (figura 27).

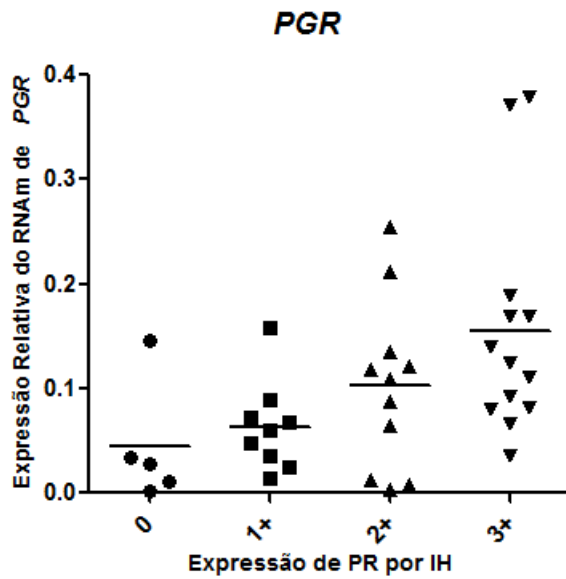


Figura 26: Representação gráfica da associação entre expressão de RNAm de *PGR* e expressão proteica de PR.

($p=0,0230$)

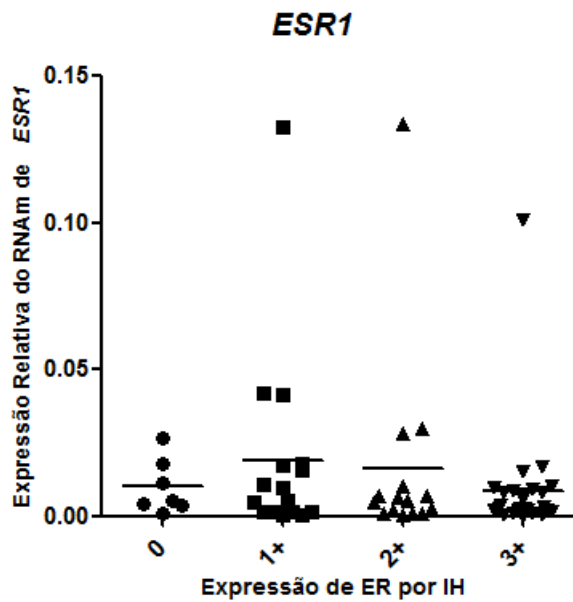


Figura 27: Representação gráfica da associação entre expressão de RNAm de *ESR1* e expressão proteica de ER.

($p= 0,5999$)

6. DISCUSSÃO

O câncer de endométrio é considerado a quinta neoplasia maligna mais incidente entre mulheres no mundo (IARC, 2012) e o câncer ginecológico mais comum nos EUA (SEER - NCI, 1975-2010). Entretanto, a sua incidência vem aumentando também em alguns países em desenvolvimento, sobretudo pela exposição cada vez mais frequente aos fatores de risco. No Brasil, a doença já foi o oitavo tumor maligno mais frequente e atualmente ocupa o sétimo lugar em ocorrência de câncer nas mulheres (INCA, MS, 2012 e 2014). Ainda assim, não foi identificado na literatura um estudo clínico-epidemiológico de maior abrangência para avaliar o seu comportamento no país. Apesar da doença apresentar uma baixa taxa de mortalidade quando diagnosticada nos estádios iniciais, parte das pacientes que apresentam critérios clínico-patológicos de bom prognóstico pode evoluir com recidiva inesperada e apresentar resposta limitada ao tratamento sistêmico (JEMAL *et al.*, 2009). Ainda que já tenham sido descritas algumas alterações moleculares características desta neoplasia (BANSAL *et al.*, 2009; LLOBET *et al.*, 2009), não está bem estabelecida associação destes marcadores moleculares ao risco de progressão e recidiva da doença. Por isto, o presente estudo teve por objetivo analisar alterações moleculares envolvidas na recidiva do câncer de endométrio do Tipo I (endometriode) e associá-las à análise de dados clínico-patológicos e de sobrevida; e fazer uma análise descritiva e de sobrevida das pacientes com adenocarcinoma de endométrio tratadas no INCA.

Inicialmente foi organizado um banco de dados com 1.132 pacientes submetidas ao tratamento cirúrgico de “adenocarcinoma de endométrio” no INCA, no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2011, para análise descritiva das frequências das alterações clínico-patológicas e por dois períodos de matrícula (2000 a 2005; 2006 a 2011). Esta amostra foi denominada de “população geral”. Cabe salientar a importância deste registro detalhado de informações sobre a doença, a partir de tamanho amostral desta magnitude, conduzido em uma única instituição. Não foi identificado na última década qualquer trabalho com descrição de características clínico-patológicas e/ou de sobrevida em câncer de endométrio similares às apontadas no presente estudo. Tal fato demonstra que o INCA é uma das poucas instituições capazes de prover um levantamento de dados deste porte, ainda que o

objeto de investigação seja um tipo de câncer que não figura entre os mais incidentes nas mulheres no país.

Nesta amostra, a idade mediana das pacientes (63,7 anos) se mostrou em conformidade com a literatura que referencia a idade média de ocorrência da doença aos 61 anos (SEER – NCI, 2010). Quando comparados os dois períodos de tratamento, houve uma frequência maior de mulheres idosas no primeiro período, o que pode sugerir que a doença vem aumentando em pacientes com menos idade nos últimos anos. A maior ocorrência de um segundo tumor primário no primeiro período sugere que o intervalo de seguimento maior destas pacientes pode ter influenciado este resultado. Esta frequência pode aumentar com a atualização deste banco de dados nos próximos anos. As neoplasias mais prevalentes também apresentam alta incidência na população mundial feminina (IARC, 2012). A frequência de condições clínicas associadas às pacientes desta amostra, consideradas importantes fatores de risco, corrobora os dados de literatura (LUCENTEFORTE *et al.*, 2007), bem como o sintoma mais comum (sangramento) que levou à investigação diagnóstica (ACOG, 2005). O método diagnóstico para obtenção de amostra do tumor para diagnóstico histopatológico mais utilizado foi a vídeo-histeroscopia, tendo sido mais frequente no segundo período de estudo ($p < 0,001$), já que a disponibilidade deste exame no Sistema Único de Saúde (SUS) aumentou nos últimos anos. O uso de terapia de reposição hormonal (TRH) foi baixo, possivelmente pelo fato de a sua indicação no SUS ainda ser limitada. Igualmente baixa foi a ocorrência da doença na pré-menopausa, porém foi maior no segundo período ($p = 0,006$), o que pode estar relacionado ao aumento da exposição a fatores de risco como a obesidade (FADER *et al.*, 2009). Segundo dados do IBGE, sobrepeso e obesidade vêm aumentando progressivamente na população brasileira nas últimas décadas (IBGE, 2010).

A elevada mediana de tempo entre o início do primeiro sintoma e o diagnóstico foi bastante elevada (178 dias). Não é possível estabelecer com certeza as causas desse intervalo, mas é aceitável questionar-se o padrão de atendimento oferecido pelo SUS, bem como o grau de informação individual de cada mulher para que um sintoma atípico indicasse a necessidade de procura por atendimento médico. Na maior parte da população, o intervalo entre o diagnóstico e o tratamento cirúrgico foi maior que 60 dias, sobretudo no segundo período do estudo. A recomendação do Ministério da Saúde para que o tratamento oncológico seja realizado em até 60 dias

após a confirmação do diagnóstico de câncer é recente e a maioria das mulheres ainda não foi beneficiada por esta recomendação (<http://sintse.tse.jus.br/documentos/2013/Mai/17/portaria-no-876>). Apesar disto, a condição clínica da maioria das pacientes na ocasião da matrícula foi considerada boa (PS 1), já que o câncer de endométrio é uma neoplasia diagnosticada nos estádios iniciais na maior parte dos casos (CREASMAN *et al.*, 2006). Embora a maior parte delas tenha se mostrado com bom PS, a associação de comorbidades e/ou obesidade foi igualmente elevada, o que pode justificar o fato de o número de cirurgias incompletas ter sido maior que um terço dos casos em ambos períodos.

Quando analisadas as características anátomo-patológicas e outros fatores prognósticos, os resultados obtidos nesta população corroboram o que a literatura já estabeleceu (KELSEY, 1982; WHARTON *et al.*, 1986; CREASMAN *et al.*, 1987), assim como a frequência dos diferentes estádios da doença (CREASMAN *et al.*, 2006). Recidivas e óbitos ocorreram mais no primeiro período de estudo, o que mais uma vez sugere que o intervalo de seguimento maior destas pacientes pode ter influenciado o resultado. A frequência das recidivas loco-regionais foi maior que a das recidivas à distância no segundo período, o que pode estar relacionada à incorporação de novas tecnologias no diagnóstico e no tratamento primário da doença. A maior parte da população não realizou pesquisa dos receptores hormonais, uma vez que esta só é indicada em casos selecionados para tratamento de recidiva com hormonioterapia (MARKMAN, 2005; SINGH *et al.*, 2007).

Em seguida, partindo do banco de dados inicial com 1.132 pacientes, foi organizado um novo banco de dados com 1.113 pacientes para a mesma análise descritiva segundo os dois grupos de subtipos histológicos, adenocarcinoma Tipo I (endometriode) e adenocarcinoma Tipo II (não endometrioides) (BOKHMAN, 1983). Mais uma vez, os resultados ora encontrados nas pacientes tratadas no INCA coincidem com aqueles estabelecidos por vários autores nas últimas décadas: tumores Tipo I são mais frequentes, desenvolvem-se em mulheres na perimenopausa (menos idosas), estão associados a estádios mais precoces da doença e a um baixo grau de diferenciação histológica; são o tipo de câncer de endométrio estrógeno-dependente e, por conseguinte, mais associado à obesidade mais frequente neste grupo (KELSEY, 1982; THOMA, 1984; CALLE *et al.*, 2004; FADER *et al.*, 2009). Os tumores Tipo II são menos frequentes, desenvolvem-se em mulheres mais idosas, estão associados a estádios mais avançados da doença e

cursam com maior chance de recorrência. Apesar da maior frequência de diagnóstico em idade avançada dos tumores Tipo II, não foi observada diferença na frequência de comorbidades entre pacientes dos dois subtipos histológicos (ENGELSEN *et al.*, 2009; MENDIVIL *et al.*, 2009). A ocorrência de adenocarcinoma Tipo I foi maior em mulheres que tiveram a menarca até os 11 anos de idade, iniciando a exposição ao estrogênio mais precocemente, e a maior parte das mulheres jovens que desenvolvem câncer de endométrio é nulípara e obesa, fatores estes ligados à exposição contínua ao estrogênio (SOLIMAN *et al.*, 2005). Mulheres que apresentaram câncer de endométrio na pré-menopausa tiveram o diagnóstico de adenocarcinoma Tipo I em maior frequência, possivelmente por apresentarem características clínico-patológicas que se inserem neste grupo de risco. O percentual de cirurgias consideradas incompletas também se manteve elevado em ambos grupos, o que denota mais uma vez que a associação de comorbidades e/ou da obesidade ao câncer é determinante na opção de escolha do tipo de tratamento cirúrgico.

Uma vez estabelecidas as frequências das características clínico-patológicas nas diferentes populações estudadas, foram determinadas a SLD e a SG destas mesmas populações pela Regressão de Cox. Para estas análises foram excluídos os casos com história de câncer prévio ou com ocorrência de segundo tumor primário. Após o controle das variáveis de confundimento, ou seja, o ajuste por aquelas que possivelmente influenciariam a sobrevida, os resultados obtidos tanto para SLD como para SG nas populações estudadas, reproduzem ou corroboram os dados da literatura.

A análise de SLD da população geral de 1.038 pacientes confirmou que critérios já reconhecidos como importantes para a determinação do prognóstico estão associados a um maior risco de recidiva nestas pacientes: subtipo histológico (ENGELSEN *et al.*, 2009; MENDIVIL *et al.*, 2009), estadiamento segundo a FIGO (PECORELLI, 2009), presença de invasão linfovascular e tumores maiores que 2,0 cm (COHN *et al.*, 2002; MARIANI *et al.*, 2002; MARIANI *et al.*, 2003; MARIANI *et al.*, 2005). Para a análise de SLD dos tumores Tipo I das 912 pacientes, além do estadiamento e da invasão linfovascular, invasão miometrial também eleva o risco de recorrência, pois invasão miometrial profunda já é reconhecida como fator preditivo independente de recidiva (MORROW *et al.*, 1991; ZAINO, 1996). Para a SLD dos tumores Tipo II das 108 pacientes, além do estadiamento e da invasão

linfovascular, a presença de doença residual após a cirurgia imprime um pior prognóstico às pacientes deste grupo (RANDALL *et al.*, 2006). Já sobrepeso e/ou obesidade conferem um menor risco de recidiva nestes tumores. Não há plausibilidade biológica que justifique o IMC como fator de proteção para recidiva, pois pode estar atuando como uma variável de confundimento. Entretanto foi mantido no modelo final por poder contribuir futuramente para o conhecimento de algum mecanismo clínico ou molecular relacionado à recidiva.

Após avaliação da SLD na população geral, nos tumores Tipo I e nos tumores Tipo II, pode-se ressaltar que estadiamento e presença de invasão linfovascular foram fatores prognósticos independentes presentes em todas elas, o que indica sua importância para o risco de recidiva da doença.

A análise de SG da população geral de 1.038 pacientes também revelou que alguns fatores prognósticos citados pela literatura se mostraram como fatores independentes para um maior risco de óbito nestas pacientes: subtipo histológico (ENGELSEN *et al.*, 2009; MENDIVIL *et al.*, 2009), invasão miometrial (MORROW *et al.*, 1991; ZAINO, 1996) e estadiamento segundo a FIGO (PECORELLI, 2009). O estadiamento final do câncer de endométrio é cirúrgico, ou seja, é estabelecido após análise histopatológica das estruturas anatômicas ressecadas durante a cirurgia. Dentre estas estruturas, os linfonodos pélvicos e/ou para-aórticos que apresentam doença metastática constituem um importante fator prognóstico independente (CREASMAN *et al.*, 2006; HOEKSTRA *et al.*, 2008). Além da importância para avaliação do prognóstico, o estágio final determina a indicação ou não de tratamento adjuvante com a finalidade de reduzir o risco de recidiva e óbito (PECORELLI, 2009). Pacientes submetidas a tratamento cirúrgico incompleto podem ser consideradas sub-estadiadas, o que compromete a indicação precisa de adjuvância e, por conseguinte, piora o prognóstico. A realização de cirurgia incompleta também determinou um risco maior de óbito nas pacientes do INCA, assim como a presença de algum grau de comprometimento físico com limitação de suas atividades na ocasião da matrícula (PS elevado). Embora não haja um consenso na literatura sobre a idade ser reconhecida como fator prognóstico independente, para alguns autores mulheres idosas têm um risco maior de óbito do que as mais jovens (UHARCEK *et al.*, 2008), o que se observou nesta população estudada.

Para a análise de SG dos tumores Tipo I das 912 pacientes, mais uma vez corroborando os dados de vários autores, estadiamento, invasão miometrial e alto

grau de diferenciação nos tumores são fatores que implicam num risco de óbito elevado (MORROW *et al.*, 1991; ZAINO, 1996; PECORELLI, 2009). Apesar de cardiopatia ser ainda considerada controversa como fator de risco para a doença, podendo estar relacionada ou não à obesidade concomitante (KULIE *et al.*, 2011), nesta população esta comorbidade se comportou como fator prognóstico independente, determinando um risco de morte maior em comparação às mulheres saudáveis do ponto de vista cardiovascular. A ocorrência de recidiva durante o seguimento, independente de realização ou não de tratamento da mesma, aumentou o risco de óbito, assim como a idade avançada (UHARCEK *et al.*, 2008). Para a SG dos tumores Tipo II das 108 pacientes, o risco de óbito é maior nos casos de estadiamento avançado (PECORELLI, 2009), nos tumores com invasão linfovascular (COHN *et al.*, 2002), com doença residual após a cirurgia e naqueles que recidivaram (MARIANI *et al.*, 2002; MARIANI *et al.*, 2005; RANDALL *et al.*, 2006).

Vale ressaltar que na SG das três diferentes populações o estadiamento despontou como o fator prognóstico independente presente em todas elas, o que confirma sua importância para o risco de óbito. Apesar disto, assim como em todos os tipos de câncer, o estadiamento não mostra uma previsão absoluta sobre o prognóstico, fato este ligado a heterogeneidade molecular intertumoral, o que leva à necessidade de identificação de biomarcadores de prognóstico na tentativa de eliminar este problema.

Até o momento, poucos estudos foram publicados com análise de microarranjo no câncer de endométrio. Apesar de todos os estudos citados terem contribuído de alguma forma no avanço do conhecimento das alterações moleculares presentes nesta neoplasia, nenhum deles procurou identificar biomarcadores associados à recidiva da doença.

As análises moleculares do presente estudo foram feitas com amostras tumorais de casos de adenocarcinoma Tipo I por se tratar do tipo histológico mais comum (KELSEY, 1982). Para o microarranjo, foram inicialmente incluídos tumores de 10 pacientes submetidas a cirurgia completa, no estágio I, sendo 5 amostras provenientes de tumores que apresentaram recidiva e 5 de tumores sem recidiva. Como os parâmetros iniciais não permitiram a identificação de nenhum GDE, o critério de identificação destes genes foi baseado apenas na diferença de expressão (*mfold-change* de pelo menos três vezes) entre os casos com recidiva e sem recidiva, não levando em consideração o valor de *p*, o que torna esta seleção menos

estridente. Além do número limitado de amostras, contribuiu para um menor poder estatístico o fato de se tratar de uma análise comparando apenas tecido tumoral, do mesmo subtipo histológico e do mesmo estadiamento. Com esta análise, foram identificados 95 GDE que caracterizaram o *status* “recidiva”. A análise não supervisionada com estes genes nos 10 casos do Ec I demonstrou a formação de dois grupos bem caracterizados de tumores com e sem recidiva. Quando nova análise não supervisionada com estes mesmos genes foi realizada num maior número de casos (n=21), incluindo três estádios diferentes, observou-se novamente a separação de dois grupos bem caracterizados, ou seja, um grupo predominante de recidivas e outro predominante de casos sem recidiva. Curiosamente, dois casos sem recidiva se agruparam àqueles com recorrência, o que pode sugerir que a doença venha recidivar nestas pacientes no futuro. Entretanto, os prontuários de ambos casos foram revistos em março de 2014 e, após um período de seguimento de 32 meses para um deles e 48 meses para o outro, estas mulheres se encontravam sem evidência de doença. Ainda nesta segunda análise, o agrupamento entre os casos do Ec I mostrou a formação de dois grupos exclusivos: um compreende todos os casos de recidiva e outro todos os casos sem recidiva, o que indica uma melhor caracterização do *status* “recidiva” neste estadiamento do que nos Ec II e III desta amostra.

Em seguida, foi realizada análise supervisionada dos 21 casos com os 95 GDE selecionados, separando aqueles com recidiva e os que não apresentaram recorrência. Esta nova análise teve por objetivo excluir os genes que apresentaram valores de expressão próximos nos dois grupos (com recidiva e sem recidiva), uma vez que esta comparação inicial foi feita pela média de expressão em cada grupo. Com isto, foi possível identificar os genes com maior poder de discriminação entre estes grupos e, conseqüentemente, estabelecer uma melhor caracterização daqueles diferencialmente expressos na recidiva. Foram identificados 62 genes que em seu conjunto foram discriminantes do *status* “recidiva” (20 sub-expressos e 42 super-expressos na recidiva). O gene que obteve a maior diferença de valores de expressão nas amostras com recidiva em relação a não-recidiva foi *PGR* (gene codificante do receptor de progesterona). Adicionalmente, foi realizado o enriquecimento de vias a partir destes 62 genes mais informativos do desfecho “recidiva”. Das cinco vias de sinalização celular que se mostraram alteradas, *PGR* foi novamente destacado como gene mais expresso na recidiva numa delas. Como o desenvolvimento do adenocarcinoma Tipo I está relacionado ao estímulo hormonal

de estrogênio e *PGR* encontrava-se inserido numa via com outros genes que também exercem influência em alguma função hormonal, foram selecionados para validação por PCRq três genes super-expressos presentes nesta via e com potencial para uso como marcador prognóstico de recidiva da doença relacionados à via de *PGR*: *ESR1* (gene codificante do receptor de estrogênio), *GREB1* (gene regulador do crescimento pelo estrogênio no câncer de mama) e *PGR*.

A identificação de genes alterados a partir de análises randômicas de microarranjo de expressão requerem necessariamente uma validação por uma técnica mais robusta de análise de expressão gênica individual como a PCRq, uma vez que microarranjos identificam genes expressos de forma diferencial através de hibridização obtida a partir das sondas presentes nos *chips* com os cDNAs diferencialmente expressos. De forma complementar, a análise da expressão proteica dos referidos genes por imuno-histoquímica (IH) também pode proporcionar uma possível incorporação de um biomarcador na clínica, uma vez que esta é a metodologia mais utilizada para a avaliação de biomarcadores na rotina clínica.

Assim, inicialmente foi realizada PCRq para os três genes selecionados nas mesmas amostras dos dez casos utilizados no microarranjo, e apenas *PGR* mostrou maior expressão significativa na recidiva. Em seguida, a PCRq foi realizada com amostras armazenadas em blocos de parafina: em 29 (96,7%) de 30 casos que apresentaram recidiva e em 59 (88,1%) de 67 casos que não apresentaram recidiva, o que demonstra um bom aproveitamento do material. A expressão das proteínas codificadas por estes genes, avaliada por IH, foi realizada em 107 amostras parafinadas, sendo 35 casos com recidiva e 72 sem recidiva, incluindo as 10 amostras do microarranjo. Assim, para a IH, a metodologia foi possível nos cortes das 107 amostras, com um aproveitamento de 100% do material.

O primeiro gene analisado no maior número de amostras foi ***ESR1***. Este gene codifica o receptor de estrogênio α (ER), um fator de transcrição composto de vários domínios importantes para ligação hormonal, ligação de DNA e para ativação da transcrição. A proteína codificada pelo gene se localiza no núcleo onde pode formar um homodímero ou um heterodímero com o receptor de estrogênio β (NCBI, 2014; HUMAN PROTEIN ATLAS). O estrogênio e seus receptores são indispensáveis para o desenvolvimento sexual e reprodução, além de exercerem ação numa série de sistemas, órgãos e tecidos onde promovem respostas fisiológicas (GRUBER *et al.*, 2002). Entretanto, também estão envolvidos em processos patológicos, inclusive

algumas neoplasias como câncer de endométrio e de mama. Tanto ER α como ER β estão presentes no endométrio normal, porém ER α é o de maior expressão e é sua ativação que leva à proliferação por meio da modulação de genes alvo como fatores de crescimento, proto-oncogenes e outras moléculas envolvidas na regulação do ciclo celular (SHANG, 2006; CHESKIS *et al.*, 2007). ER ativa a via de PI3K/AKT e ativa mecanismos moleculares por meio das MAPKinases ligadas à via de RAS (ZHOU *et al.*, 2013). Porém, já foi demonstrado que tumores com expressão proteica positiva de ER estão associados a fatores clínico-patológicos de bom prognóstico e conferem uma sobrevida maior do que aquela em tumores ER negativos (ERLICH *et al.*, KOTHARI *et al.*, 2010; 1988; HUVILA *et al.*, 2013; ZANNONI *et al.*, 2013).

Embora a associação da expressão proteica de ER a fatores prognósticos já seja bem conhecida, a expressão do RNAm de *ESR1* ainda não foi bem estudada no câncer de endométrio. Foi identificado apenas um estudo com avaliação da sobrevida global. Wik *et al.* analisaram a expressão de ER α e de *ESR1* por IH e PCRq em tumores Tipo I e II, e compararam os resultados à sobrevida relacionada à doença. Os autores observaram uma associação direta entre expressão proteica e gênica ($p < 0,001$). A maior parte dos casos com ER α negativo foi associado a um fenótipo clínico-patológico agressivo e menor sobrevida ($p < 0,001$). A combinação de baixa expressão proteica de ER α e de RNAm de *ESR1* também mostrou pior sobrevida relacionada à doença em comparação aos tumores com expressão elevada ($p < 0,001$). Todavia, não houve avaliação da expressão deste gene na sobrevida livre de doença (WIK *et al.*, 2013).

No presente estudo, na análise feita com o maior número de amostras, ***ESR1*** apresentou níveis de expressão por PCRq maiores nos casos com recidiva do que naqueles que não apresentaram recidiva ($p < 0,0001$). Tal resultado foi corroborado por meio de uma curva ROC que demonstrou elevados níveis de sensibilidade (81,4%) e especificidade (65,9%) - $p < 0,0001$ - com acurácia de 87% (IC 95% 0,781 – 0,960). O *cut off* foi $> 0,003912$. Porém, não foi observada diferença significativa da expressão por IH de **ER** entre os grupos de pacientes que recidivaram daquelas que não apresentaram recidiva, assim como não foi significativa a diferença entre intensidade de marcação dos tumores com e sem recidiva. Complementando os resultados de IH, fatores relacionados a bom prognóstico foram associados a uma maior chance de apresentarem expressão positiva de ER: as pacientes com invasão miometrial superficial apresentaram uma chance 4 vezes maior de ER ser positivo

($p=0,035$). Foi também observada associação entre grau de diferenciação e ER positivo, onde pacientes com tumores G1 e G2 tiveram chance 11 vezes maior de ER ser positivo ($p<0,001$). Por fim, foi analisada a chance de recidiva conforme a expressão de ER pelo cálculo da *Odds Ratio* (OR). A recidiva não foi estatisticamente associada à expressão positiva de ER, tanto na análise bruta como na ajustada por idade. Não foi possível determinar a SLD e a SG associadas à expressão proteica de ER ou à expressão do RNAm de *ESR1* devido à limitação do número de pacientes de cada grupo (com e sem recidiva).

O segundo gene analisado em uma amostra maior para validação foi **PGR**. Este gene codifica um membro de uma super família de receptores nucleares esteroides, o receptor de progesterona (PR), também conhecido como NR3C3 (*Nuclear Receptor Subfamily 3, Group C, Member 3*). PR atua principalmente como fator de transcrição de genes alvo e faz a mediação de efeitos fisiológicos da progesterona. Este hormônio exerce papel fundamental na ovulação, desenvolvimento das glândulas mamárias e na reprodução, sobretudo na manutenção da gravidez. PR é codificado por um único gene *PGR* e tem duas isoformas idênticas, PRA e PRB, que diferem no seu peso molecular e fazem a mediação de seus próprios genes de resposta e efeitos fisiológicos com pequena sobreposição. Ambas parecem exercer atividades transcricionais distintas: PRA parece atuar de forma negativa, antagonizando a atividade transcricional de PRB e de outros receptores nucleares (como mineralocorticoides, glucocorticoides, e receptores de estrogênio e androgênio) (CONNELLY *et al.*, 2002). Progesterona e PR também estão envolvidos em algumas neoplasias como câncer de mama e de endométrio. Esta proteína ativa a via de RAS/ERK e de PI3K/AKT, desempenhando um papel importante na carcinogênese destes tumores (CARNEVALE *et al.*, 2007). Assim como para ER, a expressão positiva de **PR** é considerada indicador independente de bom prognóstico no câncer de endométrio, conferindo também melhor sobrevida do que tumores PR negativos (ERLICH *et al.*, 1988; ZANNONI *et al.*, 2013). Fatores clínico-patológicos associados a mau prognóstico e sobrevida menor são observados com mais frequência em pacientes cujo tumor é PR negativo (KOTHARI *et al.*, 2010; HUVILA *et al.*, 2013). Não há menção na literatura de análise de expressão do RNAm de *PGR* no câncer de endométrio.

No presente estudo não houve associação da expressão do RNAm de *PGR* ao *status* "recidiva" ($p=0,3502$) nas "amostras independentes", com tumores em

parafina. Ainda foi feita uma nova análise acrescentando as 10 amostras utilizadas no microarranjo e esta se manteve sem significância ($p=0,8447$). De forma complementar, a expressão proteica de **PR** não apresentou diferença significativa entre as pacientes com recidiva e sem recidiva por IH ($p=0,7245$), assim como não foi significativa a diferença entre intensidade de marcação dos tumores com e sem recidiva. Considerando as características clínico-patológicas, alguns fatores relacionados a bom prognóstico foram associados a uma maior chance de apresentarem expressão positiva de PR, corroborando alguns dados da literatura que associam expressão positiva de PR e bom prognóstico: as mulheres com peso adequado apresentaram 70% menos chance de PR ser positivo ($p=0,027$), já que obesidade é fator de risco para tumor Tipo I, o subtipo de melhor prognóstico; tumores de baixo grau (graus de diferenciação 1 e 2) apresentaram chance 4 vezes maior de PR ser positivo ($p=0,009$). Por fim, foi analisada a chance de recidiva conforme a expressão de PR pelo cálculo da *Odds Ratio* (OR). Como ocorreu em ER, a recidiva não foi associada à expressão positiva de PR por IH, tanto na análise bruta como na ajustada por idade. Não foi possível determinar a SLD e a SG associadas à expressão proteica de PR e à expressão do RNAm de *PGR* devido à limitação do número de pacientes de cada grupo (com e sem recidiva).

O uso de progestágenos está indicado para o tratamento de câncer de endométrio avançado ou recidivado há algumas décadas e a resposta é significativamente melhor quando os tumores são de baixo grau e receptores-positivos (THIGPEN et al., 1999; SINGH et al., 2007; DECRUZE et al., 2007). No entanto, ainda não foi esclarecida a razão pela qual muitos tumores hormônio-positivos respondem mal ao tratamento, ao passo que alguns com expressão proteica negativa respondem satisfatoriamente.

A associação entre expressão de RNAm de *ESR1* e expressão proteica de ER não foi estatisticamente significativa, o que pode estar relacionado a alguns conceitos. O RNAm pode sofrer alterações pós-transcricionais que comprometeriam a expressão da proteína e, conseqüentemente, seus níveis de expressão não acompanhariam aqueles da expressão gênica. Os níveis de ER também podem ser controlados por mecanismos pós-transducionais (como fosforilação e ubiquitinação) recentemente demonstrados em câncer de mama (RAJBHANDARI et al., 2014), o que pode comprometer a expressão proteica sem interferir na expressão gênica. Por fim, IH é uma técnica semi-quantitativa, ao passo que PCRq é uma técnica

quantitativa, sugerindo que a associação entre os valores de duas técnicas diferentes pode não ser possível. Já a associação entre expressão de RNAm de *PGR* e expressão proteica de PR foi estatisticamente significativa, sugerindo que talvez esta proteína não seja tão vulnerável a alterações pós-transcricionais e a modificações pós-tradução.

O terceiro gene analisado foi ***GREB1***. Este é um gene responsivo ao estrogênio que caracteriza uma resposta precoce na via regulada pelo ER e parece desempenhar um importante papel nos tecidos responsivos ao hormônio e no câncer. É reconhecido como mediador de proliferação celular em linhagens hormônio-dependentes de câncer de mama e de próstata (RAE *et al.*, 2006). Entretanto, seu papel em tecidos normais ainda não está definido. O gene foi descrito por Ghosh *et al.* quando se mostrou diferencialmente expresso em linhagem MCF7 estimulada por β estradiol (GHOSH *et al.*, 2000). Estes e outros autores demonstraram uma forte associação da sua expressão com o fenótipo de ER positivo em linhagens de câncer de mama, ou seja, a super-expressão deste gene está ligada à positividade de ER α (GHOSH *et al.*, 2000; RAE *et al.*, 2005). A expressão gênica também já foi associada aos estádios precoces de câncer de próstata (ANTUNES *et al.*, 2012). Segundo o *Human Protein Atlas*, a expressão proteica de GREB1 pode ser observada em endométrio normal e no tumor, e é predominantemente citoplasmática ou membranar. Em ambos a expressão é considerada baixa, porém ainda não foram publicados estudos em câncer de endométrio. A única referência de literatura que menciona uma análise da expressão proteica em tecido endometrial foi publicada por Pellegrini *et al.* Os autores fizeram uma comparação entre a expressão em tecido endometrial normal e endometriose, e observaram positividade significativa na expressão de GREB1 na endometriose. Como este é um tecido que também apresenta proliferação contínua por influência hormonal, optou-se por utilizar o mesmo anticorpo no presente estudo de câncer de endométrio (PELLEGRINI *et al.*, 2012).

Nesta análise da expressão de *GREB1* em câncer de endométrio, a PCRq das 10 amostras utilizadas no microarranjo já havia mostrado níveis de expressão baixos, porém em todas foi possível quantificar o valor da expressão. Quando realizada a validação com um número maior de amostras incluídas em parafina, os resultados foram satisfatórios em apenas 2 (6,7%) pacientes com recidiva e 13 (19,4%) pacientes sem recidiva, o que impossibilitou a análise de expressão deste

gene. Diante disto, foi realizada avaliação da expressão com outras 12 amostras frescas congeladas, com a finalidade de verificar se tal resultado estava relacionado a uma real baixa expressão do gene, ou se a conservação do material em blocos de parafina interferiu na amplificação do mesmo. Embora tenha sido possível detectar a expressão de *GREB1* em todas as 12 amostras, os níveis de expressão deste gene realmente se confirmaram muito baixos. Tal fato sugere que a detecção por PCRq deste gene a partir de material conservado em parafina não seja factível, o que pode ser explicado pela limitação de detecção do método, uma vez que genes pouco expressos (com menos de 11 cópias de seu RNAm transcrito, BERNARDO *et al.*, 2013) podem exibir uma grande variabilidade na quantificação de cada amostra analisada.

A expressão proteica de **GREB1** (presença de marcação nuclear na IH) se mostrou associada aos tumores que não apresentaram recorrência ($p=0,0196$). Não foi observada associação entre a expressão por IH de GREB1 e as características clínicas. Entretanto, dentre os fatores anátomo-patológicos de prognóstico, apenas o grau de diferenciação foi significativo para a expressão positiva: mulheres com tumores de baixo grau (1 e 2) tiveram uma chance 3 vezes maior de GREB1 ser positivo ($p=0,044$). Não há dados na literatura sobre a expressão desta proteína no câncer de endométrio para comparação com estes resultados. Por fim, foi analisada a chance de recidiva conforme a expressão de GREB1 pelo cálculo da *Odds Ratio* (OR): a expressão positiva, bruta e ajustada por idade, conferiu uma associação de proteção, ou seja, tumores GREB1 positivos oferecem uma chance 63% menor de evoluir com recidiva do que os negativos (OR= 0,37; $p=0,021$). Não foi possível determinar a SLD e a SG associadas à expressão proteica de GREB1 e à expressão gênica devido à limitação do número de pacientes de cada grupo (com e sem recidiva).

Embora ainda não esteja disponível na literatura informação sobre esta proteína em câncer de endométrio, a expressão proteica de GREB1 em câncer de mama já foi descrita por alguns autores: é positiva em cerca de 40 a 55% dos casos e está intimamente relacionada à positividade de ER α (em mais 90% dos casos) (HNATYSZYN *et al.*, 2010; MOHAMMED *et al.*, 2013). Recentemente, um consórcio de pesquisadores avaliou, entre outras metodologias, sua expressão proteica por IH e gênica por PCRq (MOHAMMED *et al.*, 2013). A expressão de GREB1 foi observada em 46% dos tumores de mama, sendo 96,6% deles ER positivos. Apesar

de *GREB1* ser um gene induzido por estrogênio e a expressão proteica de *GREB1* seja limitada a tumores ER positivos, os níveis de expressão de RNAm de *ESR1* não puderam ser comparados aos de *GREB1* devido à baixa expressão gênica do segundo, impossibilitando assim uma quantificação do mesmo. Dentre os tumores de mama ER α positivos, aqueles igualmente positivos para *GREB1* mostraram associação com melhor sobrevida cumulativa ($p=0,007$), o que pode sugerir que este gene desempenha um papel funcional como um componente do complexo de ER. Num modelo de análise multivariada de risco, *GREB1* se mostrou um fator independente de bom prognóstico no câncer de mama (HR = 0.49, IC: 0.26–0.90). Tais resultados sustentam que sua expressão contribui funcionalmente para a atividade transcricional do complexo ER (MOHAMMED *et al.*, 2013). Ainda que os autores tenham avaliado o câncer de mama, esta neoplasia possui fatores de risco similares aos do câncer de endométrio, sobretudo do ponto de vista hormonal. Por isto, pode-se considerar que o resultado descrito por Mohammed *et al.* vai ao encontro do resultado da análise de chance para recidiva apresentado nesta tese.

Para concluir, cabem algumas considerações sobre a impossibilidade de validação por PCRq dos resultados obtidos pela análise de microarranjo que mostrou *PGR*, *ESR1* e *GREB1* diferencialmente expressos na recidiva. A metodologia de microarranjo se baseia na hibridação, ou seja, os níveis de expressão são obtidos pela média dos valores de expressão de diferentes sondas que se ligam ao longo de determinado gene, o que pode limitar a análise. Em contrapartida, PCRq é uma técnica quantitativa que analisa uma única região do gene, o que confere maior robustez aos resultados. Foram utilizadas 10 amostras de tumor para a análise de microarranjo, sendo 5 de casos com recidiva e 5 sem recidiva. A PCRq de *PGR* nestes 10 casos confirmou a diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos, porém estes resultados não foram validados quando analisada a expressão gênica num maior número de amostras armazenadas em parafina. Tal fato sugere que o reduzido número amostral utilizado para o microarranjo não permitiu avaliar a heterogeneidade da expressão deste gene entre os tumores dos dois grupos. Já a PCRq de *ESR1* nas 10 mesmas amostras não demonstrou o mesmo perfil de expressão encontrado inicialmente. Todavia, a realização de PCRq com maior número de amostras reproduziu o resultado obtido inicialmente pela análise de larga escala. Mais uma vez, o reduzido número amostral utilizado na validação das mesmas amostras utilizadas no microarranjo não permitiu reconhecer a tendência de expressão de *ESR1* conforme observada em um amostra

com maior número de tumores. *GREB1* se mostrou diferencialmente expresso na análise de larga escala, mas os resultados não foram reproduzidos tanto na validação por PCRq das amostras do microarranjo, como naquela onde se usou um maior número de amostras em parafina. A PCRq de 12 amostras de tecido tumoral fresco congelado mostrou baixos níveis de expressão do RNAm deste gene, o que pode justificar a inviabilidade de identificação da expressão em tecido armazenado em parafina, uma vez que ocorre degradação significativa de RNAm em amostras armazenadas desta forma. Para *GREB1*, as análises de microarranjo e PCRq sugerem que este parece se tratar de um gene de baixa expressão no tecido endometrial tumoral.

Em resumo: não houve diferença entre expressão proteica de ER e PR e os casos que apresentaram ou não recidiva. Já a expressão positiva de *GREB1* se mostrou associada aos tumores que não apresentaram recorrência ($p=0,0196$), conferindo proteção. A expressão gênica por PCRq de *PGR* e *GREB1* não caracterizou o *status* "recidiva". No entanto, embora não tenha sido possível determinar a SLD e a SG associadas à expressão proteica de ER e à expressão gênica de *ESR1* devido à limitação do número de pacientes de cada grupo (com e sem recidiva), os resultados da análise por PCRq demonstraram com exatidão um perfil de expressão gênica característico da recidiva no adenocarcinoma Tipo I de endométrio. Até o momento, não foi encontrada em literatura qualquer análise entre a associação do nível expressão do RNAm de *ESR1* e recidiva tumoral, sendo o presente estudo o primeiro a encontrar essa associação por esta abordagem.

7. CONCLUSÕES

Os tumores Tipo I, de baixo grau de diferenciação, com invasão superficial do miométrio e diagnosticados nos estádios mais precoces são os mais frequentes nas pacientes com diagnóstico de câncer de endométrio tratadas no INCA.

Os tumores Tipo II cursam com maior frequência de recidiva e óbito nas pacientes com diagnóstico de câncer de endométrio tratadas no INCA, quando comparados aos casos do Tipo I.

Estadiamento avançado e presença de invasão linfovascular se mostraram como fatores prognósticos independentes para o risco de recidiva nas três populações de pacientes com câncer de endométrio estudadas.

Estadiamento avançado se mostrou como fator prognóstico independente para o risco de óbito nas três populações de pacientes com câncer de endométrio estudadas.

Dentre os genes super-expressos que caracterizaram o “*status* recidiva” pela análise de microarranjo nos tumores Tipo I, três pertencem a uma mesma via hormonal: *PGR*, *ESR1* e *GREB1*.

A expressão do RNAm de *PGR* e a expressão proteica de ER e PR não estão associadas à recidiva de tumores Tipo I de endométrio.

Pacientes com recidiva apresentaram maiores níveis de expressão do RNAm de *ESR1* quando comparados com as pacientes sem recidiva.

GREB1 apresenta níveis de expressão muito baixos no adenocarcinoma de endométrio Tipo I e não foi possível avaliar sua associação ao “*status* recidiva” nestes tumores.

A expressão proteica de *GREB1* está associada aos casos de tumores Tipo I que não apresentaram recidiva e confere proteção da recorrência da doença.

8. REFERÊNCIAS

ACOG (*American Congress of Obstetricians and Gynecologists*) Practice Bulletin, Clinical Management Guidelines for Obstetrician-Gynecologists, number 65, August 2005: Management of Endometrial Cancer. *Obstet Gynecol*, 106(2):413-25, 2005.

ALVES AC, SILVA ID, VILLANOVA FE, NICOLAU SM, CUSTÓDIO MA, BORTOLETTO C, GONÇALVES WJ. Differential Gene Expression Profile Reveals Overexpression of MAP3K8 in Invasive Endometrioid Carcinoma. *Eur J Gynaecol Oncol*, 27(6):589-93, 2006.

AMANT F, MOERMAN P, NEVEN P *et al.* Endometrial Cancer. *Lancet*, 366(9484):491-505, 2005.

ACS (*American Cancer Society*). Cancer Facts and Figures 2012. Atlanta, GA: *American Cancer Society*, 2012.

AN HJ, KIM KI, KIM JY, *et al.* Microsatellite Instability Endometrioid Type Adenocarcinoma is Associated with Poor Prognostic Factors. *Am J Surg Pathol*, 31(6):846-53, 2007.

ANTUNES AA, LEITE KR, REIS ST, SOUSA-CANAVEZ JM, CAMARA-LOPES LH, DALL'OGGIO MF, SROUGI M. GREB1 Tissue Expression is Associated with Organ-Confined Prostate Cancer. *Urol Oncol*, 30(1):16-20, 2012.

AZIM A, OKTAY K. Letrozole for Ovulation Induction and Fertility Preservation by Embryo Cryopreservation in Young Women with Endometrial Carcinoma. *Fertil Steril*, 88(3):657-64. 2007.

BANSAL N, YENDLURI V, WENHAM RM. The Molecular Biology of Endometrial Cancers and the Implications for Pathogenesis, Classification, and Targeted Therapies. *Cancer Control*, 16(1):8-13, 2009.

BEINER ME, FINCH A, ROSEN B, *et al.* The Risk of Endometrial Cancer in Women with BRCA1 and BRCA2 Mutations. A prospective study. *Gynecol Oncol*, 104(1):7-10, 2007.

BERNARDO V, RIBEIRO PINTO LF, ALBANO RM. Gene Expression Analysis by Real-Time PCR: Experimental Demonstration of PCR Detection Limits. *Anal Biochem*, 432(2):131-3, 2013.

BIGELOW B, VEKSHEIN V, DEMOPOULOS RI. Endometrial Carcinoma, Stage II: Route and Extent of the Spread to the Cervix. *Obstet Gynecol*, 62(3):363-66, 1983.

BIDUS MA, RISINGER JI, GADISSETTI V.R. CHANDRAMOULI GV *et al.* Prediction of Lymph Node Metastasis in Patients with Endometrioid Endometrial Cancer Using Expression Microarray. *Clin Cancer Res*, 12(1):83-8, 2006.

BLOSS JD, BERMAN ML, BLOSS LP, BULLER RE. Use of Vaginal Hysterectomy for the Management of Stage I Endometrial Cancer in the Medically Compromised Patient. *Gynecol Oncol*, 40(1):74-7, 1991.

BOKHMAN JV. Two Pathogenetic Types of Endometrial Carcinoma. *Gynecol Oncol*; 15(1):10–17, 1983.

BORONOW R, MORROW , CREASMAN W *et al.* Surgical Staging in Endometrial Cancer: Clinical-Pathologic Findings of a Prospective Study. *Obstet Gynecol*, 63(6): 825-32, 1984.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº- 876, de 16 de maio de 2011, dispõe sobre a aplicação da Lei nº 12.732, de 22 de novembro de 2012, que versa a respeito do primeiro tratamento do paciente com neoplasia maligna comprovada no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS). Diário Oficial [da República Federativa do Brasil], Brasília DF, n 94, 17 mai. 2013. Seção 1, páginas 135-136. Disponível em: <http://sintse.tse.jus.br/documentos/2013/Mai/17/portaria-no-876-de-16-de-maio-de-2013-dispoe-sobre> (acesso em março de 2014).

BRINTON LA, BERMAN ML, MORTEL R, TWIGGS LB, *et al.* Reproductive, Menstrual, and Medical Risk Factors for Endometrial Cancer: Results from a Case-Control Study. *Am J Obstet Gynecol*, 167(5):1317-25, 1992.

CALLE EE, KAAKS R. Overweight, Obesity and Cancer: Epidemiological Evidence and Proposed Mechanisms. *Nature Reviews Cancer*, 4(8):579-91, 2004.

CAO QJ, BELBIN T, SOCCI N, BALAN R, PRYSTOWSKY MB, CHILDS G, JONES JG. Distinctive Gene Expression Profiles by cDNA Microarrays in Endometrioid and Serous Carcinomas of the Endometrium. *Int J Gynecol Pathol*, 23(4):321-29, 2004.

CARLSON MJ, THIEL KW, LESLIE KK. Past, Present, And Future Of Hormonal Therapy In Recurrent Endometrial Cancer. *Int J Womens Health*, 6:429-35, 2014.

CARNEVALE RP, PROIETTI CJ, *et al.* Progestin Effects on Breast Cancer Cell Proliferation, Proteases Activation, and in vivo Development of Metastatic Phenotype All Depend on Progesterone Receptor Capacity to Activate Cytoplasmic Signaling Pathways. *Mol Endocrinol*, 21(6):1335-58, 2007.

CHAUDHARY S, PANDA AK, MISHRA DR, MISHRA SK. Association of +331G/A PgR Polymorphism with susceptibility to Female Reproductive Cancer: Evidence from a Meta-Analysis. *PLoSOne*, 8(1):e53308, 2013.

CHAVES, CBP. Avaliação da Presença de Instabilidade de Microssatélites no Adenocarcinoma de Endométrio e Associação com Prognóstico em Pacientes Tratadas no Instituto Nacional de Câncer. 2010. 116f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Oncologia, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, 2010.

CHEKIS BJ, GREGER JG, NAGPAL S, FREEDMAN LP. Signaling by Estrogens. *J Cell Physiol*, 213(3):610–17, 2007.

COHEN, I. Endometrial Pathologies Associated with Postmenopausal Tamoxifen Treatment. *Gynecol Oncol*, 94(2):256-66, 2004.

COHN D, HOROWITZ N, MUTCH D, KIM S, MANOLITSAS T, FOWLER J. Should the presence of Lymphovascular Space Involvement be Used to Assign Patients to Adjuvant Therapy Following Hysterectomy for Unstaged Endometrial Cancer? *Gynecol Oncol*, 87(3):243-46, 2002.

CONNELLY OM, MULAC-JERICEVIC B, DEMAYO F, LYDON JP, O'MALLEY BW. Reproductive Functions of Progesterone Receptors. *Recent Prog Horm Res*, 57:339-355, 2002.

COOKE EJ, SAVAGE RS, KIRK PD, DARKINS R, WILD DL. Bayesian Hierarchical Clustering for Microarray Time Series Data with Replicates and Outlier Measurements. *BMC Bioinformatics*, 12:399, 2011.

CREASMAN WT, MORROW CP, BUNDY BN, *et al.* Surgical Pathologic Spread Patterns of Endometrial Cancer (a GOG Study). *Cancer*, 60(8suppl):2035-2041, 1987.

CREASMAN WT, ODICINO F, MAISONNEUVE P, QUINN MA, BELLER U, HEINTZ APM, NGAN HYS and PECORELLI S. Carcinoma of the corpus uteri. FIGO 6th Annual Report on the Results of Treatment in Gynecological Cancer. *Int J Gynaecol Obst*, 95 Suppl 1:S105-143, 2006.

CREUTZBERG CL. GOG-99: Ending of the Controversy Regarding Pelvic Radiotherapy for Endometrial Carcinoma? *Gynecol Oncol*, 92(3):740-3, 2004.

DASH RC, DOUD LG. Correlation of Pap Smear Abnormalities in Endometrial Adenocarcinomas (Abstract). *Acta Cytol*, 45:835, 2001.

DECRUZE SB, GREEN JA. Hormone therapy in advanced and recurrent endometrial cancer: a systematic review. *Int J Gynecol Cancer*, 17(5):964-78, 2007.

DeRISI J, PENLAND L, BROWN PO, BITTNER ML, MELTZER PS, RAY M, CHEN Y, SU YA, TRENT JM. Use of a cDNA Microarray to Analyse Gene Expression Patterns in Human Cancer. *Nat Genet*, 14(4):457-60, 1996.

DOLL A, ABAL M, RIGAU M, *et al.* Novel Molecular Profiles of Endometrial Cancer – New Light through Old Windows. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 108(3-5):221-29, 2008.

ENG C. Genetics of Cowden Syndrome: Through the Looking Glass of Oncology. *Int J Oncol*, 12(3):701-10, 1998.

ENG C. Will the Real Cowden Syndrome Please Stand Up: Revised Diagnostic Criteria. *J Med Genet*, 37(11):828-30, 2000.

ENGELSEN IB, AKSLEN LA, SALVESEN HB. Biologic Markers in Endometrial Cancer Treatment. *APMIS*; 117(10): 693-707, 2009.

EPPLEIN M, REED SD, VOIGT LF *et al.* Risk of Complex and Atypical Endometrial Hyperplasia in Relation to Anthropometric Measures and Reproductive History. *Am J Epidemiol*, 168(6):563-76, 2008.

EHRlich CE, YOUNG PCM, STEHMAN FB, SUTTON GP, ALFORD WM. Steroid Receptors and clinical Outcome in Patients with Adenocarcinoma of the Endometrium. *Am J Obstet Gynecol*, 158(4):796-807, 1988.

ESTELLER M, LEVINE R, BAYLIN SB, *et al.* *MLH1* Promoter Hypermethylation is Associated with the Microsatellite Instability Phenotype in Sporadic Endometrial Adenocarcinomas. *Oncogene*, 17(18):2413-17, 1998.

EVERETT E, TAMIMI H, GREER B *et al.* The Effect of Body Mass Index on Clinical/Pathologic Features, Surgical Morbidity, and Outcome in Patients with Endometrial Cancer. *Gynecol Oncol*, 90(1):150-7, 2003.

FADER AN, ARRIBA LN, FRASURE HE, VON GRUENIGEN VE. Endometrial Cancer and Obesity: Epidemiology, Biomarkers, prevention and Survivorship. *Gynecol Oncol*, 114(1):121-7, 2009.

FISHMAN DA, ROBERTS KB, CHAMBERS JT, KOHORN EI, SCHWARTZ PE, CHAMBERS SK. Radiation Therapy as Exclusive Treatment for Medically Inoperable Patients with Stage I and II Endometrioid Carcinoma. *Gynecol Oncol*, 61(2):189-96, 1996.

FRIBERG E, MANTZOROS CS, WOLK A. Diabetes and Risk of Endometrial Cancer: a Population-Based Prospective Cohort Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16(2):276-80, 2007.

FRUMOVITZ M, SINGH DK, MEYERL *et al.* Predictors of Final Histology in Patients with Endometrial Cancer. *Gynecol Oncol*, 95(3):463-8, 2004.

GADDUCCI AA, GARGINI A, PALLA E *et al.* Polycystic Ovary Syndrome and Gynecological Cancers: Is There a Link? *Gynecol Endocrinol*, 20(4):200-8, 2005.

GALLUP DG, STOCK RJ. Adenocarcinoma of the Endometrium in Women 40 years of Age or Younger. *Obstet Gynecol*, 64(3):417-20, 1984.

GEHRIG PA, BAE-JUMP VL, BOGGESS JF, GROBEN PA, FOWLER WC Jr, VAN LE L. Association Between Uterine Serous Carcinoma and Breast Cancer. *Gynecol Oncol*, 94(1):208-11, 2004.

GENE CARDS (<http://www.genecards.org>). Acesso em junho de 2014.

GHOSH MG, THOMPSON DA, WEIGEL RJ. PDZK1 and GREB1 are Estrogen-Regulated Genes Expressed in Hormone-Responsive Breast Cancer. *Cancer Res*, 60(22):6367-75, 2000.

GOLUB TR, SLONIM DK, TAMAYO P, HUARD C *et al.* Molecular Classification of Cancer: Class Discovery and Class Prediction by Gene Expression Monitoring. *Science*, 286(5439):531-7, 1999.

GREER BE, KOH WJ, ABU-RUSTUM N, *et al.* Uterine Neoplasms: Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Can Netw*, 7(5):498-531, 2009.

GRUBER CJ, TSCHUGGUEL W, SCHNEEBERGER C *et al.* Production and Actions of Estrogens. *N Eng Med*, 346(5):340-52, 2002.

HACKER NF, FRIEDLANDER M. Uterine Cancer. *Gynecologic Oncology*, Berek & Hacker's, 5. Ed. Philadelphia (USA): Lippincott Williams, p 396-442, 2010.

HAITHAM A, GUAN H, KUMAR S, COTE M, *et al.* Impact of Microsatellite Instability (MSI) on Survival in High Grade Endometrial Carcinoma. *Gynecol Oncol*, 113(2):153-8, 2009.

HAMPEL H, FRANKEL W, PANESCU J, LOCKMAN J, *et al.* Screening for Lynch Syndrome among Endometrial Cancer Patients. *Cancer Res*, 66(15):7810-7, 2006.

HARDIMAN P, PILLAY OC, ATIOMO W. Polycystic Ovary Syndrome and Endometrial Carcinoma. *Lancet*, 361 (9371):1810-1812, 2003.

HAOULA Z, SALMAN M, ATIOMO W. Evaluating the Association Between Endometrial Cancer and Polycystic Ovary Syndrome. *Hum Reprod*, 27(5):1327-31, 2012.

HNATYSZYN HJ, LIU M, HILGER A, *et al.* Correlation of GREB1 mRNA with Protein Expression in Breast Cancer: Validation of a Novel GREB1 Monoclonal Antibody. *Breast Cancer Res Treat*, 122(2):371-80, 2010.

HOEKSTRA AV, KIM RJ, SMALL W *et al.* FIGO Stage IIIC Endometrial Carcinoma: Prognostic Factors and Outcomes. *Gynecol Oncol*, 114(2):273-8, 2008.

HORNREICH G, BELLER U, LAVIE O, RENBAUM P, COHEN Y, LEVY-LAHAD E. Is Uterine Serous Papillary Carcinoma a BRCA1-Related Disease? Case Report and Review of the Literature. *Gynecol Oncol*, 75(2):300-4, 1999.

HUH WK, STRAUGHN JM Jr, MARIANI A, PODRATZ KC *et al.* Salvage of Isolated Vaginal Recurrences in Women with Surgical Stage I Endometrial Cancer: a Multiinstitutional Experience. *Int J Gynecol Cancer*, 17(4):886-9, 2007.

HUVILA J, TALVE L, CARPÉN O, EDQVIST PH, *et al.* Progesterone Receptor Negativity is an Independent Risk Factor For Relapse in Patients with Early Stage Endometrioid Endometrial Adenocarcinoma. *Gynecol Oncol*, 130(3): 463-9, 2013.

THE HUMAN PROTEIN ATLAS (www.proteinatlas.org). Acesso em outubro de 2013.

IARC, *International Agency for Research on Cancer* – Globocan 2012 (<http://www.iarc.fr>). Acesso em janeiro de 2014.

IBGE, Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009: Antropometria e Estudo Nutricional de crianças, Adolescentes e Adultos no Brasil. *Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística* (IBGE), 2010.

IGNATOV T, EGGEMANN H, SEMCZUK A *et al.* Role of GPR30 in Endometrial Pathology after Tamoxifen for Breast Cancer. *Am J Obstet Gynecol*, 203(6):595e9-595e16, 2010.

INCA, *Registro de Câncer de Base Populacional (RCBP)*, INCA, Ministério da Saúde, 2010.

INCA, Incidência de Câncer no Brasil, *Estimativa 2012*. Ministério da Saúde, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2012.

INCA, Incidência de Câncer no Brasil, *Estimativa 2014*. Ministério da Saúde, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2014.

JACOBS SH, MURRAY MAF. The Premature Menopause. In: S. Campbell, ed., *The Management of the Menopause and Postmenopausal Years*. Lancaster. MTP Press, 359-68, 1976.

JEMAL A, SIEGEL R, WARD E. Cancer Statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 59(4):225-49, 2009.

JOHNSON N, CORNES P. Survival and Recurrent Disease after Postoperative Radiotherapy for Early Endometrial Cancer: Systematic Review and Metaanalysis. *Brit J Obstet Gynaecol*, 114(11):1313-20, 2007.

KARLSSON B, GRANBERG S, WIKLAND M *et al*. Transvaginal Ultrasonography of the Endometrium in Women with Postmenopausal Bleeding - a Nordic Multicenter Study. *Am J Obstet Gynecol*, 172(5):1488-94, 1995.

KELSEY, JL *et al*. A Case Control Study of Cancer of the Endometrium. *Am. J. Epidemiol*, 116(2):333-42, 1982.

KEYS HM, ROBERTS JA, BRUNETTO VL, ZAINO R, SPIRTOS NM, BLOSS JD *et al.* A Phase III Randomized Trial of Surgery with or without Adjunctive External Pelvic Radiation Therapy in Intermediate Risk Endometrial Adenocarcinoma: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol*, 92(3):744-51, 2004.

KOTHARI R, MORRISON C, RICHARDSON D, SEWARD S, O'MALLEY D, *et al.* The Prognostic Significance of the Triple Negative Phenotype in Endometrial Cancer. *Gynecol Oncol*, 118(2):172-5, 2010.

KONG CS, LONGACRE TA, HENDRICKSON MR. *Gynecologic Oncology*, Berek & Hacker's, 5. Ed. Philadelphia (USA): Lippincott Williams, p 155-166, 2010.

KOSARY CL. Cancer of the Corpus Uteri. In: RIES LAG *et al.* SEER Survival Monograph: Cancer Survival Among Adults, US SEER Program, 1988- 2001, Patient and Tumor Characteristics. *National Cancer Institute, SEER Program*, NIH pub. N° 07-6215, Bethesda, MD,123-32, 2007.

KULIE T, SLATTENGREN A, REDMER J, COUNTS H *et al.* Obesity and Women's Health: an Evidence-Based Review. *J Am Board Fam Med*, 24(1):75-85, 2011.

KURMAN R, KAMINSKI P, NORRIS H. The Behavior of Endometrial Hyperplasia. A Long-Term Study of "Untreated" Hyperplasia in 170 Patients. *Cancer*, 56(2):403-12, 1985.

LACHANCE JA, EVERETT EN, GREER B, *et al.* The Effect of Age on Clinical/Pathologic Features, Surgical Morbidity, and Outcome in Patients with Endometrial Cancer. *Gynecol Oncol*, 101(3):470-5, 2006.

LAX S, KENDALL B, TASHIRO H, *et al.* The Frequency of p53, K-ras Mutations and Microsatellite Instability Differs in Uterine Endometrioid and Serous Carcinoma: Evidence of Distinct Molecular Genetic Pathways. *Cancer*, 88(4):814-24, 2000.

LÉCURU F, METZGER U, SCARABIN C, LE FRÈRE BELDA MA, OLSCHWANG S, LAURENT PUIG P. Hysteroscopic Findings in Women at Risk of HNPCC. Results of a Prospective Observational Study. *Fam Cancer*, 6(3):295-9, 2007.

LEE E, HSU C, HAIMAN CA, RAZAVI P, HORN-ROSS PL, VAN DEN BERG D, BERNSTEIN L, LE MARCHAND L. Genetic Variation in the Progesterone Receptor Gene and Risk of Endometrial Cancer: A Haplotype-Based Approach. *Carcinogenesis*, 31(8):1392-9, 2010.

LEE TS, SEONG SJ, KIM JW *et al.* Management of Endometrial Hyperplasia with a Levonorgestrel-Releasing Intrauterine System: Single Arm, Prospective Multicenter Study: Korean Gynecologic Oncology Group Study (KGOG2006). *Jpn J Clin Oncol*, 41(6):817-819, 2011.

LEVINE DA, LIN O, BARAKAT RR, *et al.* Risk of Endometrial Carcinoma Associated with BRCA Mutation. *Gynecol Oncol*, 80(3):395-8, 2001.

LIAO BS, TWIGGS LB, LEUNG BS, YU WCY, POTISH RA, PREM KA. Cytoplasmic Estrogen and Progesterone Receptors as Prognostic Parameters in Primary Endometrial Carcinoma. *Obstet Gynecol*, 67(4):463-7, 1986.

LINDEMANN K, VATTEN LJ, ELLSTROM-ENGH M, ESKILD A. Body Mass, Diabetes and Smoking, and Endometrial Cancer Risk: a Follow-Up Study. *Br J Cancer*, 98(9):1582-5, 2008.

LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, (4):402-8, 2001.

LLOBET D, PALLARES J, YERAMIAN A, SANTACANA M, ERITJA N, VELASCO A, DOLCET X, MATIAS-GUIU X. Molecular Pathology of Endometrial Carcinoma: Practical Aspects from the Diagnostic and Therapeutic Viewpoints. *J Clin Pathol*, 62(9):777-85, 2009.

LOCHEN ML, LUND E. Childbearing and Mortality from Cancer of the Corpus Uteri. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 76(4):373-7, 1997.

LU KH, DINH M, KOHLMAN W, *et al.* Gynecologic Cancer as a "Sentinel Cancer" for Women with Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome. *Obstet Gynecol*, 105(3):569-74, 2005.

LUCENTEFORTE E, BOSETTI C, TALAMINI R, *et al.* Diabetes and Endometrial Cancer: Effect Modification by Body Weight, Physical Activity and Hypertension. *Br J Cancer*, 97(7):995-8, 2007.

LYNCH HT, KRUSH AJ. The Cancer Family Syndrome and Cancer Control. *Surg Gynecol Obstet*, 132(2):247-50, 1971.

MANDELQVIST M, STEFANSSON IM, BREDHOLT G, *et al.* Gene Expression Patterns Related to Vascular Invasion and Aggressive Features in Endometrial Cancer. *Am J Pathol*, 178(2):861-71, 2011.

MARIANI A, WEBB MJ, KEENEY GL, LESNICK TG, PODRATZ KC. Surgical Stage I Endometrial Cancer: Predictors of Distant Failure and Death. *Gynecol Oncol*, 87(3):274-80, 2002.

MARIANI A, WEBB MJ, KEENEY GL, ALETTI G, PODRATZ KC. Endometrial Cancer: Predictors of Peritoneal Failure. *Gynecol Oncol*, 89(2):236-42, 2003.

MARIANI A, DOWDY SC, KEENEY GL, HADDOCK MG, LESNICK TG, PODRATZ KC. Predictors of Vaginal Relapse in Stage I Endometrial Cancer. *Gynecol Oncol*, 97(3):820-7, 2005.

MARKMAN M. Hormonal Therapy of Endometrial Cancer. *Eur J Cancer*, 41(5):673-5, 2005.

MARZIALE P, ATLANTE G, POZZI M *et al.* 426 Cases of Stage I Endometrial Carcinoma: a Clinicopathological Analysis. *Gynecol Oncol*, 32(3):278-81, 1989.

MAXWELL GL, RISINGER JL, ALVAREZ AA, *et al.* Favorable Survival Associated with Microsatellite Instability in Endometrioid Endometrial Cancers. *Obstet Gynecol*, 97(3):417-22, 2001.

MAXWELL GL, CHANDRAMOULI GV, DAINY L, LITZI TJ, BERCHUCK A, BARRETT JC, RISINGER JI. Microarray Analysis of Endometrial Carcinomas and Mixed Mullerian Tumors Reveals Distinct Gene Expression Profiles Associated with Different Histologic Types of Uterine Cancer. *Clin Cancer Res*, 11(11):4056-66, 2005.

MAY K, BRYANT A, DICKINSON HO, KEHOE S, MORRISON J. Lymphadenectomy for the Management of Endometrial Cancer. *Cochrane Database Syst Ver*, (1):CD007585, 2010.

McKINLAY SM, BRAMBILLA DJ, POSNER JG. The Normal Menopause Transition. *Maturitas*, 14(2):103-115, 1992.

McPHERSON CP, SELLERS TA, POTTER JD, BOSTICK RM, FOLSOM AR. Reproductive Factors and Risk of Endometrial Cancer. The Iowa Women's Health Study. *Am J Epidemiol*, 143(12):1195-202, 1996.

MENDIVIL A, SCHULER KM, GEHRIG PA. Non-Endometrioid Adenocarcinoma of the Uterine Corpus: a Review of Selected Histological Subtypes. *Cancer Control*, 16(1):46-52, 2009.

MHAWECH-FAUCEGLIA P, WANG D, KESTERSON J, CLARK K, MONHOLLEN L *et al*. Microarray Analysis Reveals Distinct Gene Expression Profiles Among Different Tumor Histology, Stage and Disease Outcomes in Endometrial Adenocarcinoma. *PLoS ONE*, 5(11):1-9 e 15415, 2010.

MINAGUCHI T, YOSHIKAWA H, ODA K, ISHINO T, YASUGI T, ONDA T, NAKAGAWA S *et al*. PTEN Mutation Located only outside exons 5, 6, and 7 is an independent predictor of favorable Survival in Endometrial Carcinomas. *Clin Cancer Res*, 7(9):2636-42, 2001.

MIYAMOTO T, KASHIMA H, SUZUKI A, KIKUCHI N, KONISHI I, SEKI N, SHIOZAWA T. Laser-Captured Microdissection - Microarray Analysis of the Genes Involved in Endometrial Carcinogenesis: Stepwise Up-Regulation of Lipocalin2 Expression in Normal and Neoplastic Endometria and its Functional Relevance. *Hum Pathol*, 42(9):1265-74, 2010.

MOHAMMED H, D'SANTOS C, SERANDOUR AA, ALI HR, BROWN GD *et al.* Endogenous Purification Reveals Greb1 as a Key Estrogen Receptor Regulatory Factor. *Cell Rep*, 3(2):342-9, 2013.

MOORE SC, GIERACH GL, SCHATZKIN A, MATTHEWS CE. Physical Activity, Sedentary Behaviours, and the Prevention of Endometrial Cancer. *Br J Cancer*, 103(7):933-8, 2010.

MONGE M, COLAS E, DOLL A *et al.* ERM/ETV5 Up-Regulation Plays a Role during Myometrial Infiltration through Matrix Metalloproteinase-2 Activation in Endometrial Cancer. *Cancer Res*, 67(14):6753-59, 2007.

MORROW CP, BUNDY BN, KURMAN RJ *et al.* Relationship between Surgical-Pathologic Risk Factors and Outcome in Clinical Stage I and II Carcinoma of the Endometrium: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol*, 40(1):55-65, 1991.

MOURITS MJ, De VRIES EG, WILLEMSE PH, TEN HOOR KA, HOLLEMA H, VAN der ZEE AG. Tamoxifen Treatment and Gynecologic Side Effects: a Review. *Obstet Gynecol*, 97(5 Pt 2):855-66, 2001.

MUECK AO, SEEGER H, RABE T. Hormonal Contraception and Risk of Endometrial Cancer: a Systematic Review. *Endocr Relat Cancer*, 17(4):263-71, 2010.

MULHOLLAND HG, MURRAY LJ, CARDWELL CR, CANTWELL MM. Dietary Glycaemic Index, Glycaemic Load and Endometrial and Ovarian Cancer Risk: a Systematic Review and Meta-analysis. *Br J Cancer*, 99(3):434-41, 2008.

MURESU R, SINI MC, COSSU A, TORE S, BALDINU P, MANCA A *et al.* Chromosomal Abnormalities and Microsatellite Instability in Sporadic Endometrial Cancer. *Eur J Cancer*, 38(13):1802-9, 2002.

MUTTER GL, LIN MC, FITZGERALD JT *et al.* Altered PTEN Expression as a Diagnostic Marker for the Earliest Endometrial Precancers. *J Natl Cancer Inst*, 92(11):924-30, 2000.

NAPPI L, INDRACCOLO U, DI SPIEZIO SARDO A *et al.* Are Diabetes, Hypertension and Obesity Independent Risk Factors for Endometrial Polyps? *J Minim Invasive Gynecol*, 16(2):157-62, 2009.

NCBI – HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC), março de 2014 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

NCI Progress Review- Final Report in Gynecologic Cancers, 97-100, 2001 (www.prg.nci.nih.gov).

ODA K, STOKOE D, TAKETANI Y *et al.* High Frequency of Coexistent Mutations of PI3KCA and PTEN Genes in Endometrial Carcinoma. *Cancer Res*, 65(23): 10669-73, 2005.

OKEN, M.M., CREECH, R.H., TORMEY, D.C., HORTON, J., DAVIS, T.E., McFADDEN, E.T., CARBONE, P.P. Toxicity And Response Criteria Of The Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol*, 5(6):649-55, 1982.

O'MARA TA, FAHEY P, FERGUSON K, MARQUART L, LAMBRECHTS D, DESPIERRE E, VERGOTE I, AMANT F *et al.* Progesterone Receptor Gene Variants and Risk of Endometrial Cancer . *Carcinogenesis*, 32(3):331-5, 2011.

ORTOFT G, HANSEN ES, BERTELSEN K. Omitting Adjuvant Radiotherapy in Endometrial Cancer Increases the Rate of Locoregional Recurrences but has no Effect on Long-Term Survival: the Danish Endometrial Cancer Study. *Int J Gynecol Cancer*, 23(8):1429-37, 2013.

OSÓRIO-COSTA F, ROCHA GZ, DIAS MM *et al.* Epidemiological and Molecular Mechanisms Aspects Linking Obesity and Cancer. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, 53(2):213-26, 2009.

PARAZZINI F, NEGRI E, LA VECCHIA C *et al.* Role of Reproductive Factors on the Risk of Endometrial Cancer. *Int J Cancer*, 76(6):784-6, 1998.

PARENT AS, TEILMANN G *et al.* The Timing of Normal Puberty and the Age limits of Sexual Precocity: Variations Around the World, Secular Trends, and Changes after Migration. *Endocr Rev*, 24(5):668-93, 2003.

PECORELLI S. FIGO Committee on Gynecologic Oncology: Revised FIGO Staging for Carcinoma of the Vulva, Cervix, and Endometrium. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, 105(2):103-4, 2009.

PELLEGRIN GP, FINAN MA. Endometrial Cancer in Women 45 Years of Age or Younger: a Clinicopathological Analysis. *Am J Obstet Gynecol*, 193(5):1640-4, 2005.

PELLEGRINI C, GORI I, ACHTARI C, HORNUNG D *et al.* The expression of Estrogen Receptors as well as GREB1, c-MYC, and cyclin D1, Estrogen-Regulated Genes Implicated in Proliferation, is Increased in Peritoneal Endometriosis. *Fertil Steril*, 98(5):1200-8, 2012.

PÉREZ-MEDINA T, SALAZAR FJ, SAN-FRUTOS L *et al.* Hysteroscopic Dynamic Assessment of the Endometrium in Patients Treated with Long-Term Tamoxifen. *J Minim Invasive Gynecol*, 18(3):349-54, 2011.

PIJNENBORG JM, ROMANO A, DAM-DE VEEN GC, DUNSELMAN GA, FISCHER DC, *et al.* Aberrations in the Progesterone Receptor Gene and the Risk of Recurrent Endometrial Carcinoma. *J Pathol*, 205(5):597-605, 2005.

PINZONE JJ, STEVENSON H, STROBL JS, BERG PE. Molecular and Cellular Determinants of Estrogen Receptor Alpha Expression. *Mol Cell Biol*, 24(11):4605-12, 2004.

PLACK M, RAMBECH E, *et al.* High Frequency of Microsatellite Instability and Loss of Mismatch-Repair Protein Expression in Patients with Double Primary Tumors of the Endometrium and Colorectum. *Cancer*, 94(9):2502-10, 2002.

PLANAGUMÀ J, DÍAZ-FUERTE M, GIL-MORENO A *et al.* A Differential Gene Expression Profile Reveals Overexpression of RUNX1/AML1 in Invasive Endometrioid Carcinoma. *Cancer Res*, 64(24):8846-53, 2004.

PLANAGUMÀ J, ABAL M, GIL-MORENO A *et al.* Up-Regulation of ERM/ETV5 Correlates with the Degree of Myometrial Infiltration in Endometrioid Endometrial Carcinoma. *J Pathol*, 207(4):422-9, 2005.

RAJBHANDARI P, SCHALPER KA, SOLODIN NM, ELLISON-ZELSKI SJ *et al.* Pin1 Modulates ER α Levels in Breast Cancer through Inhibition of Phosphorylation-dependent Ubiquitination and Degradation. *Oncogene*, 33(11):1438–47, 2014.

RAE JM, JOHNSON MD, SCHEYS JO, CORDERO KE, LARIOS JM, LIPPMAN ME. GREB 1 is a Critical Regulator of Hormone Dependent Breast Cancer Growth Breast. *Cancer Res Treat*, 92(2):141-9, 2005.

RAE JM, JOHNSON MD, CORDERO KE, SCHEYS JO, LARIOS JM *et al.* GREB1 is a Novel Androgen-Regulated Gene Required for Prostate Cancer Growth. *Prostate*, 66(8):886-94, 2006.

RANDALL M, FILIACI V, MUSS H, SPIRTOS NM *et al.* Randomized Phase III Trial of Whole-Abdominal Irradiation versus Doxorubicin and Cisplatin Chemotherapy in Advanced Endometrial Carcinoma: a Gynecologic Oncology Group Study. *J Clin Oncol*, 24(1):36-44, 2006.

RENEHAN AG, TYSON M, EGGER M *et al.* Body-mass Index and Incidence of Cancer: a Systematic Review and Meta-Analysis of Prospective Observational Studies. *Lancet* , 371(9612):569-78, 2008.

RESNICK K, STRAUGHN Jr. M *et al.* Lynch Syndrome Screening Strategies among Newly Diagnosed Endometrial Cancer. *Am Col Obstet Gynecol*, 114(3):530-6, 2009.

RISINGER JI, MAXWELL GL, CHANDRAMOULI GV *et al.* Microarray Analysis Reveals Distinct Gene Expression Profiles Among Different Histologic Types of Endometrial Cancer. *Cancer Res*, 63(1):6-11, 2003.

SABiosciences (<http://www.sabiosciences.com>). Acesso em junho de 2014.

SAEGUSA M, HASHIMURA M, YOSHIDA T *et al.* Beta-catenin Mutations and Aberrant Nuclear Expression during Endometrial Tumorigenesis. *Br J Cancer*, 84(2): 209-17, 2001.

SAGHIR FS, ROSE IM, DALI AZ, SHAMSUDDIN Z, JAMAL AR, MOKHTAR NM. Gene Expression Profiling and Cancer-Related Pathways in Type I Endometrial Carcinoma. *Int J Gynecol Cancer*, 20(5):724-31, 2010.

SEER (Surveillance, Epidemiology and End Results): Cancer Statistics Review 1975-2010, NCI, Bethesda, MD, http://www.seer.cancer.gov/csr/1975_2010. Atualizado no *website* em junho de 2013.

SCHUMER ST, CANNISTRA SA. Granulosa Cell Tumor of the Ovary. *J Clin Oncol*, 21(6):1180-9, 2003.

SCOTTI V, BORGHESI S, MEATTINI I, SAIEVA C *et al.* Postoperative Radiotherapy in Stage I/II Endometrial Cancer: Retrospective Analysis of 883 Patients Treated at the University of Florence. *Int J Gynecol Cancer*, 20(9):1540-8, 2010.

SHOFF SM, NEWCOMB PA. Diabetes, Body Size and Risk of Endometrial Cancer. *Am J Epidemiol*, 148(3):234-40, 1998.

SHANG Y. Molecular Mechanisms of Oestrogen and SERMs in Endometrial Carcinogenesis. *Nat Rev Cancer*, 6(5):360–8, 2006.

SINGH M, ZAINO RJ, FILIACI VJ, LESLIE KK. Relationship of Estrogen and Progesterone Receptors to Clinical Outcome in Metastatic Endometrial Carcinoma: a Gynecologic Oncology Group Study. *Gynecol Oncol*, 106(2):325-33, 2007.

SKOV BG, BROHOLM H, ENGEL U, *et al.* Comparison of the Reproducibility of the WHO Classifications of 1975 and 1994 of Endometrial Hyperplasia. *Int J Gynecol Pathol*, 16(1):33-7, 1997.

SOLIMAN PT, OH JC, SCHMELER KM, *et al.* Risk Factors for Young Premenopausal Women with Endometrial Cancer. *Obstet Gynecol*, 105(3):575-80 2005.

SOUSA VPL, CHAVES CBP, HUGUENIN JFL, MOREIRA FCB, REIS BSB, CHIMELLI L, BERGMANN A, SIMÃO TA, PINTO LFR. ERM/ETV5 and RUNX1/AML1 Expression in Endometrioid Adenocarcinomas of Endometrium and Association with Neoplastic Progression. *Cancer Biol Ther*, 15(7):888-94, 2014.

SUSINI T, AMUNNI G, MOLINO C, CARRIERO C, RAPI S, BRANCONI F *et al.* Ten-Year Results of Prospective Study on the prognostic Role of ploidy in Endometrial Carcinoma. *Cancer*, 109(5):882-90, 2007.

THOMA DB. Do Hormones Cause Cancer? *Cancer*, 53(3 suppl):595–604, 1984.

THIGPEN JT, BRADY MF, ALVAREZ RD, ADELSON MD, HOMESLEY HD, MANETTA A, SOPER JT, GIVEN FT. Oral Medroxyprogesterone Acetate in the Treatment of Advanced or Recurrent Endometrial Carcinoma: A Dose-Response Study by the Gynecologic Oncology Group. *J Clin Oncol*, 17(6):1736-44 , 1999.

UHARCEK P. Prognostic Factors in Endometrial Carcinoma. *J Obstet Gynaecol Res*, 34(5):776-83, 2008.

VAN' T VEER LJ, DAI H, VAN HE YD, HART AA, MAO M, PETERSE HL *et al.* Gene Expression Profiling Predicts Clinical Outcome of Breast Cancer. *Nature*, 415(6871): 530-6, 2002.

WATARI H, TODO Y, TAKEDA M, EBINA Y, YAMAMOTO R, SAKURAGI N. Lymph-Vascular Space Invasion and Number of Positive Para-Aortic Node Groups Predict Survival in Node Positive Patients with Endometrial Cancer. *Gynecol Oncol*, 96(3):651-7, 2005.

WETTENHALL JM and SMYTH GK. LimmaGUI: a Grafical Use Interface for Linear Modeling of Microarray Data. *Bioinformatics*, 20(18):3705-6, 2004.

WATSON P, LYNCH HT. Cancer Risk in Mismatch Repair Gene Mutation Carriers. *Fam Cancer*, 1(1):57-60, 2001.

WEDRÉN S, LOVMAR L, HUMPHREYS K, MAGNUSSON C, MELHUS H, SYVÄNEN AC, KINDMARK A *et al.* Estrogen Receptor Alpha Gene Polymorphism and Endometrial Cancer Risk-a Case-Control Study. *BMC Cancer*, 8(:322, 2008.

WEISS AM. Cardiovascular Disease in Women. *Prim Care*, 36(1):73-102, 2009.

WHARTON JT, MIKUTA JJ, METTLIN C, *et al.* Risk Factors and Current Management in Carcinoma of the Endometrium. *Surg Gynecol Obstet*, 162(6):515-20, 1986.

WHO (*World Health Organization*): www.who.int. Acesso em março de 2014.

WIK E, RÆDER MB, KRAKSTAD C, TROVIK J, BIRKELAND E *et al.* Lack of Estrogen Receptor- α is Associated with Epithelial-Mesenchymal Transition and PI3K Alterations in Endometrial Carcinoma. *Clin Cancer Res*,19(5):1094-105, 2013.

YANCEY M, MAGELSEN D, DEMAUREZ A, LEE RB. Classification of Endometrial Cells on Cervical Cytology. *Obstet Gynecol*, 76(6):1000-5, 1990.

ZAINO RJ, KURMAN RJ, DIANA KL, MORROW CP. Pathologic Models to Predict Outcome for Women with Endometrial Adenocarcinoma. *Cancer*, 77(6):1115-1121, 1996.

ZAINO RJ, DAVIS ATL, OHLSSON-WILHELM BM, BRUNETTO VL. DNA Content is an Independent Prognostic Indicator in Endometrial Adenocarcinoma. *Int J Gynecol Pathol*, 17(4):312-9, 1998.

ZAINO RJ. FIGO Staging of Endometrial Adenocarcinoma: a Critical Review and Proposal. *Int J Gynecol Pathol*, 28(1):1-9, 2009.

ZANNONI GF, MONTEROSSO G, DE STEFANO I, GARGINI A, SALERNO MG *et al.* The Expression Ratios of Estrogen Receptor α (ER α) to Estrogen Receptor β 1 (ER β 1) and ER α to ER β 2 Identify Poor Clinical Outcome in Endometrioid Endometrial Cancer. *Hum Pathol*, 44(6):1047-54, 2013.

ZENDEHDEL K, NYREN O, OSTENSON CG, *et al.* Cancer Incidence in Patients with Type 1 Diabetes Mellitus: a Population-Based Cohort Study in Sweden. *J Natl Cancer Inst*, 95(23):1797-800, 2003.

ZHOU C, STEPLOWSKI TA, DICKENS HK, MALLOY KM, GEHRIG PA, BOGGESS JF, BAE-JUMP VL. Estrogen Induction of Telomerase Activity Through Regulation of the Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Dependent Pathway in Human Endometrial Cancer Cells. *PLoS One*, 8(2):e55730, 2013.

ZHOU X, GU Y, WANG DN, NI S, YAN J. Eight Functional Polymorphisms in the Estrogen Receptor 1 Gene and Endometrial Cancer Risk: A Meta-Analysis. *PLoS One*, 8(4):e60851, 2013.

9. ANEXOS

9.1 Anexo 1: Carta de Aprovação do CEP

9.2 Anexo 2: Ficha Clínica para Levantamento de Dados Clínico-Patológicos

9.3 Anexo 3: Escala de *Performance Status*

Escala de PS conforme critérios do ECOG* *Eastern Cooperative Oncology Group*

Grau	Status
0	Completamente ativo, capaz de seguir com suas atividades sem restrição
1	Restrito fisicamente a atividades pesadas, porém em regime ambulatorial e capaz de cumprir atividades leves ou de natureza sedentária (e.g.: trabalho de casa, trabalho de escritório)
2	Em regime ambulatorial e capaz de manter cuidados pessoais, porém incapaz de cumprir quaisquer outras atividades de trabalho. Permanece fora do leito 50% ou mais do tempo em que encontra-se desperto
3	Capaz de cuidados pessoais limitados, confinado ao leito ou cadeira em mais de 50% do tempo em que encontra-se desperto
4	Completamente incapaz. Não realiza qualquer tipo de cuidados pessoais. Totalmente confinado ao leito ou cadeira
5	Óbito

* Oken et al. *Am J Clin Oncol*, 1982; 5:649-655. ECOG, Robert Comis, *Group Chair*.

9.4 Anexo 4: Protocolo de Silanização de Lâminas para Imuno-Histoquímica

- Lâminas submetidas a 10 banhos em etanol absoluto
- Um banho em silano 4% (diluído em etanol absoluto) por 4 minutos
- Dez banhos em etanol absoluto
- Secar em temperatura ambiente
- Manter em estufa a 60°C por 20 minutos

9.5 Anexo 5: Tabelas com Genes Discriminantes do “Status Recidiva” – Análise Não Supervisionada (n=95)

Gene	Fold-change (recidiva)	Gene	Fold-change (recidiva)
<i>PGR</i>	16,98	<i>SERPINA3</i>	3,31
<i>PIGR</i>	16,34	<i>GNG11</i>	3,31
<i>KIAA1324</i>	12,19	<i>TESC</i>	3,29
<i>TSPAN8</i>	11,10	<i>MLPH</i>	3,28
<i>GLYATL2</i>	7,41	<i>GPR160</i>	3,27
<i>HLA-DRB1</i>	6,82	<i>ANO1</i>	3,24
<i>ASRGL1</i>	6,65	<i>CADPS2</i>	3,19
<i>PLEKHS1</i>	6,60	<i>LRIG1</i>	3,17
<i>TFPI2</i>	6,45	<i>SEMA3D</i>	3,16
<i>PKHD1L1</i>	6,21	<i>BMPR1B</i>	3,15
<i>SPDEF</i>	5,93	<i>STXBP6</i>	3,12
<i>CPM</i>	5,74	<i>FMO5</i>	3,12
<i>GRIA2</i>	5,29	<i>HEY2</i>	3,08
<i>C4BPA</i>	5,08	<i>SFRP4</i>	3,05
<i>FAM150B</i>	4,93	<i>PORCN</i>	3,05
<i>TFF3</i>	4,85	<i>NDP</i>	3,03
<i>NPAS3</i>	4,54	<i>PLCE1</i>	3,01
<i>WIF1</i>	4,26	<i>CREB3L1</i>	3,00
<i>SLC40A1</i>	4,10	<i>SLC5A1</i>	2,98
<i>ESR1</i>	4,03	<i>CGNL1</i>	2,98
<i>EYA2</i>	3,97	<i>SORBS2</i>	2,96
<i>OBP2B</i>	3,86	<i>SERINC2</i>	2,88
<i>SCGB2A1</i>	3,84	<i>EHF</i>	2,88
<i>HLA-DRB5</i>	3,78	<i>REPS2</i>	2,87
<i>SLC47A1</i>	3,66	<i>SCGB1D2</i>	2,86
<i>MANSC1</i>	3,64	<i>GCNT2</i>	2,84
<i>GALNT4</i>	3,57	<i>SLPI</i>	2,84
<i>ENPP3</i>	3,44	<i>CTSH</i>	2,84
<i>GREB1</i>	3,37	<i>MT1L</i>	2,84
<i>C2orf88</i>	3,35		

Gene	Fold-change (recidiva)	Gene	Fold-change (recidiva)
<i>MMP1</i>	0,18	<i>SLC16A1</i>	0,30
<i>FABP4</i>	0,19	<i>CDH3</i>	0,31
<i>PTPN13</i>	0,20	<i>AHNAK2</i>	0,31
<i>GJB6</i>	0,22	<i>CHI3L1</i>	0,31
<i>FREM2</i>	0,23	<i>SLFN13</i>	0,31
<i>GJB2</i>	0,23	<i>PLAT</i>	0,32
<i>TRIM29</i>	0,23	<i>TDGF1</i>	0,32
<i>FBN2</i>	0,23	<i>ITGB3</i>	0,32
<i>NTS</i>	0,25	<i>FLRT3</i>	0,32
<i>BMP7</i>	0,26	<i>SLC1A3</i>	0,32
<i>EFEMP1</i>	0,26	<i>FABP7</i>	0,32
<i>KRT5</i>	0,26	<i>SPRY4</i>	0,32
<i>PCDHB3</i>	0,27	<i>BNC2</i>	0,32
<i>ITGB6</i>	0,28	<i>TNS4</i>	0,33
<i>NRP2</i>	0,28	<i>CPXM2</i>	0,33
<i>KRT6A</i>	0,29	<i>PCDHB9</i>	0,34
<i>DSG3</i>	0,29	<i>PLA2G2A</i>	0,34
<i>ITGA3</i>	0,30	<i>PRNP</i>	0,34

9.6 Anexo 6: Tabelas com Genes Discriminantes do “Status Recidiva” – Análise Supervisionada (n=62)

GENE	NOME	Fold-change (recidiva)
PGR	Progesterone receptor	16,98
PIGR	Polymeric immunoglobulin receptor	16,34
KIAA1324	KIAA1324	12,19
TSPAN8	Tetraspanin 8	11,10
GLYATL2	Glycine-N-acyltransferase-like 2	7,41
ASRGL1	Asparaginase like 1	6,65
C10orf81	Chromosome 10 open reading frame 81	6,60
TFPI2	Tissue factor pathway inhibitor 2	6,45
PKHD1L1	Polycystic kidney and hepatic disease (autosomal recessive)-like 1	6,21
SPDEF	SAM pointed domain containing ets transcription factor	5,93
CPM	Carboxypeptidase M	5,74
GRIA2	Glutamate receptor, ionotropic, AMPA 2	5,29
FAM150B	Family with sequence similarity 150, member B	4,93
TFF3	Trefoil factor 3 (intestinal)	4,85
WIF1	WNT inhibitory factor 1	4,26
SLC40A1	Solute carrier family 40 (iron-regulated transporter), member 1	4,10
ESR1	Estrogen receptor 1	4,03
OBP2B	Odorant binding protein 2B	3,86
SCGB2A1	Secretoglobin, family 2A, member 1	3,84
SLC47A1	Solute carrier family 47, member 1	3,66
MANSC1	MANSC domain containing 1	3,64
ENPP3	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3	3,44
GREB1	Growth regulation by estrogen in breast cancer 1	3,37
C2orf88	Chromosome 2 open reading frame 88	3,35
GNG11	Guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 11	3,31
TESC	Tescalcin	3,29
MLPH	Melanophilin	3,28
ANO1	Anoctamin 1, calcium activated chloride channel	3,24
CADPS2	Ca ⁺⁺ -dependent secretion activator 2	3,19
LRIG1	Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1	3,17
BMPR1B	Bone morphogenetic protein receptor, type IB	3,15
STXBP6	Syntaxin binding protein 6 (amisyn)	3,12
FMO5	Flavin containing monooxygenase 5	3,12
PORCN	Porcupine homolog (Drosophila)	3,05
NDP	Norrie disease (pseudoglioma)	3,03
PLCE1	Phospholipase C, epsilon 1	3,01
CGNL1	Cingulin-like 1	2,98
SLC5A1	Solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 1	2,98
SERINC2	Serine incorporator 2	2,88
REPS2	RALBP1 associated Eps domain containing 2	2,87
MT1L	Metallothionein 1L (gene/pseudogene)	2,84
GCNT2	Glucosaminyl (N-acetyl) transferase 2, I-branching enzyme	2,84

PCDHB9	<i>Protocadherin beta 9</i>	0,34
TNS4	<i>Tensin 4</i>	0,33
FLRT3	<i>Fibronectin leucine rich transmembrane protein 3</i>	0,32
PLAT	<i>Plasminogen activator, tissue</i>	0,32
ITGB3	<i>Integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61)</i>	0,32
CDH3	<i>Cadherin 3, type 1, P-cadherin (placental)</i>	0,31
ITGA3	<i>Integrin, alpha 3 (antigenCD49C,alpha 3 subunit of VLA-3 receptor)</i>	0,30
DSG3	<i>Desmoglein 3</i>	0,29
NRP2	<i>Neuropilin 2</i>	0,28
ITGB6	<i>Integrin, beta 6</i>	0,28
KRT5	<i>Keratin 5</i>	0,26
EFEMP1	<i>EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1</i>	0,26
BMP7	<i>Bone morphogenetic protein 7</i>	0,26
FREM2	<i>FRAS1 related extracellular matrix protein 2</i>	0,23
TRIM29	<i>Tripartite motif-containing 29</i>	0,23
GJB2	<i>Gap junction protein, beta 2, 26kDa</i>	0,23
GJB6	<i>Gap junction protein, beta 6, 30kDa</i>	0,22
PTPN13	<i>Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 13</i>	0,20
FABP4	<i>Fatty acid binding protein 4, adipocyte</i>	0,19
MMP1	<i>Matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)</i>	0,18

9.7 Anexo 7: Vias Geradas a Partir dos Genes Discriminantes do “Status Recidiva” (n=62) – Ingenuity Systems INC®

