



**Ângela Favorito Santarém Tonon**

**CLAUDINA- 3 E CLAUDINA- 4, POTENCIAIS  
MARCADORES DE AGRESSIVIDADE NO  
CARCINOMA ENDOMETRIAL TIPO I**

**Orientador  
Paulo Traiman**

**Co-orientadora  
Maria Aparecida Custódio Domingues**

**Doutorado**

FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU  
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"  
UNESP  
2013

Universidade Estadual Paulista  
Júlio de Mesquita Filho  
Faculdade de Medicina de Botucatu

**CLAUDINA- 3 E CLAUDINA- 4, POTENCIAIS MARCADORES  
DE AGRESSIVIDADE NO CARCINOMA ENDOMETRIAL  
TIPO I**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia, Área de Concentração em Ginecologia, da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP para obtenção do Título de Doutor.

Aluna: Ângela Favorito Santarém Tonon

Orientador: Prof. Dr. Paulo Traiman

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Aparecida Custódio Domingues

Botucatu – SP

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TEC. AQUIS. TRATAMENTO. DA INFORM.  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE – CRB 8/5651

Tonon, Ângela Favorito Santarem.

Claudina- 3 e Claudina- 4, potenciais marcadores de agressividade no carcinoma de endométrio Tipo I / Ângela Favorito Santarém Tonon. – Botucatu, 2013

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Paulo Traiman

Coorientador: Maria Aparecida Custódio Domingues

Capes: 40101150

1. Endométrio - Câncer. 2. Metástase. 3. Imunoistoquímica. 4. Marcadores biológicos.

Palavras-chave: Carcinoma de endométrio; Claudina3; Claudina4; Imunoistoquímica; Metástase.

---

<i>Vida</i>	<i>Fraternidade</i>
<i>É o amor existencial.</i>	<i>É o amor que se expande.</i>
<i>Razão</i>	<i>Sacrifício</i>
<i>É o amor que pondera.</i>	<i>É o amor que se esforça.</i>
<i>Estudo</i>	<i>Renúncia</i>
<i>É o amor que analisa.</i>	<i>É o amor que depura.</i>
<i>Ciência</i>	<i>Simpatia</i>
<i>É o amor que investiga.</i>	<i>É o amor que sorri.</i>
<i>Filosofia</i>	<i>Trabalho</i>
<i>É o amor que pensa.</i>	<i>É o amor que constrói.</i>
<i>Religião</i>	<i>Indiferença</i>
<i>É o amor que busca a Deus.</i>	<i>É o amor que se esconde.</i>
<i>Verdade</i>	<i>Desespero</i>
<i>É o amor que eterniza.</i>	<i>É o amor que se desgoverna.</i>
<i>Ideal</i>	<i>Paixão</i>
<i>É o amor que se eleva.</i>	<i>É o amor que se desequilibra.</i>
<i>Fé</i>	<i>Ciúme</i>
<i>É o amor que transcende.</i>	<i>É o amor que se desvaira.</i>
<i>Esperança</i>	<i>Orgulho</i>
<i>É o amor que sonha.</i>	<i>É o amor que enlouquece.</i>
<i>Caridade</i>	<i>Sensualismo</i>
<i>É o amor que auxilia.</i>	<i>É o amor que se envenena .</i>

*Finalmente, o ódio, que julgas ser a antítese do amor, não é senão o próprio amor que adoeceu gravemente.*

*Francisco Cândido Xavier*

---



*Dedicatória*

*A Deus,*

*Por me proteger, me iluminar e guiar minha trajetória. Sem ele nada é possível.*

*Ao meu marido Silvio,*

*Pelo amor, companheirismo e paciência nos momentos de ausência.*

*Aos meus filhos Isabella, João Pedro e Gabriel,*

*Razão de tudo... Perdão pelas horas de ausência em que deixei de ser Mãe.*

*Aos meus pais, Maria do Carmo e Zilbo,*

*pelo constante incentivo a carreira, sempre com orações e palavras de conforto. Meus alicerces.*

---

*Agradecimento Especial*

*Ao Prof. Dr. Paulo Traiman,*

*Mestre e amigo, seu exemplo, dedicação e profissionalismo nortearam meu caminho na ginecologia, sempre ensinando, incentivando e trabalhando em equipe.*

*Foi fundamental nos ensinamentos da arte cirúrgica, transmitindo segurança.*

*A pessoa humilde e sincera, minha eterna gratidão.*

*A Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Maria Aparecida Custódio Domingues,*

*Professora, amiga sincera de todas as horas, sempre presente, atuante e dedicada. Exerce sua profissão com carinho e competência, ensina com paciência e amor. Não vacila em atender algum pedido. Minha afeição e gratidão.*

---



*As pacientes com câncer ginecológico que muito contribuíram para minha evolução profissional e humanista e em particular, o meu agradecimento as mulheres portadoras de câncer de endométrio que foram de suma importância para a realização desta tese de doutorado.*

*“O homem que venceu na vida, foi aquele que  
viveu bem, riu muitas vezes e amou muito;  
Que conquistou o respeito dos homens  
inteligentes e o amor das crianças;  
Que preencheu um lugar e cumpriu a missão;  
Que deixou o mundo melhor do que encontrou,  
seja com uma flor, um poema perfeito ou o  
salvamento de uma alma;  
Que procurou o melhor nos outros e deu o  
melhor de si.”*

*(Autor Desconhecido)*

---



## *Agradecimientos*

*Agradeço a todos que contribuíram para a realização deste trabalho, em especial:*

*A bióloga Fabiola Encinas Rosa pela paciência, amor e dedicação prestados a mim e a este trabalho. Pesquisadora extremamente competente e profissional além de uma excelente amiga. Minha profunda admiração e gratidão.*

*A patologista Solange pela revisão e leitura de todas as laminas de câncer de endométrio, bem como supervisão da confecção das laminas de TMA.*

*A aluna de iniciação científica Ana Claudia pela dedicação em preencher os protocolos da pesquisa.*

*Ao serviço de patologia do Hospital AC Camargo pela rapidez e competência na confecção do TMA.*

*Aos funcionários da imunoistoquímica em especial Marcos pela dedicação no preparo das laminas.*

*A funcionária Lucia da patologia por separar os laudos anatomopatológicos.*

*Ao estatístico Hélio R. C. Nunes pela extrema dedicação e profissionalismo na análise estatística da tese.*

*Aos amigos Jorge Nahás Neto e Armando Delmanto, pelo coleguismo, trabalho em equipe e compreensão durante a realização deste trabalho.*

---

*Aos amigos, colegas e professores do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Botucatu pelo apoio, incentivo e orientação.*

*Aos funcionários do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia por todos os serviços prestados.*

*As minhas secretárias Fabiana e Ana Paula que direta ou indiretamente muito me ajudaram na confecção deste trabalho. Obrigada pela paciência e gentileza.*

*Aos funcionários da Same pelo fornecimento dos prontuários médicos.*

*Aos funcionários da Pós Graduação pela atenção e gentileza no atendimento.*

*As funcionárias da biblioteca em especial a bibliotecária pela revisão das referências bibliográficas e ficha catalográfica.*

*A Abilio Manoel Batista Pinto pelo capricho, dedicação e disponibilidade na diagramação e formatação da tese.*

---

*Trabalho realizado no Departamento de Ginecologia e Obstetrícia e Departamento de Patologia, com auxílio da Fundação para o Desenvolvimento da UNESP (FUNDUNESP) – processo n.º 00350/11.*

---



## *Sumária*

---

Lista de Abreviaturas e Siglas.....	xvi
Resumo.....	19
Summary.....	21
1. Introdução.....	23
Referências Bibliográficas.....	35
2. Objetivos.....	44
2.1. Objetivo Geral.....	45
2.2. Objetivos Específicos.....	45
3. Artigo - Claudina-3 e Claudina-4, potenciais marcadores de agressividade no Carcinoma de Endométrio Tipo I.....	46
Resumo.....	48
Introdução.....	49
Materiais e Métodos.....	53
Análise Estatística.....	59
Resultados.....	60
Discussão.....	70
Referências Bibliográficas.....	74
4. Conclusões.....	80
Anexos.....	82

---



*Lista de Abreviaturas e Siglas*



---

<b>CLDN3 :</b>	<b><i>Claudina 3</i></b>
<b>CLDN4 :</b>	<b><i>Claudina 4</i></b>
<b>CLDNs :</b>	<b><i>Claudinas</i></b>
<b>Ki67:</b>	<b><i>Índice de proliferação celular</i></b>
<b>ACE:</b>	<b><i>Adenocarcinoma endometrial</i></b>
<b>ACEE:</b>	<b><i>Adenocarcinoma endometrial endometrióide</i></b>
<b>ACENE:</b>	<b><i>Adenocarcinoma endometrial não endometrióide</i></b>
<b>NIE:</b>	<b><i>Neoplasia intraepitelial endometrial</i></b>
<b>FIGO:</b>	<b><i>International Federation of Gynecology and Obstetrics</i></b>
<b>mm:</b>	<b><i>milímetro</i></b>
<b>G1:</b>	<b><i>bem diferenciado</i></b>
<b>G2:</b>	<b><i>moderadamente diferenciado</i></b>
<b>G3:</b>	<b><i>indiferenciado</i></b>
<b>DNA:</b>	<b><i>ácido desoxiribonucleotídeo</i></b>
<b>cDNA:</b>	<b><i>ácido desoxiribonucleotídeo complementar</i></b>
<b>MI:</b>	<b><i>instabilidade de microssatélites</i></b>
<b>EpCAM:</b>	<b><i>molécula de adesão das células epiteliais</i></b>
<b>ESR1:</b>	<b><i>receptor de estrógeno alfa</i></b>
<b>ESR2:</b>	<b><i>receptor de estrógeno beta</i></b>
<b>G1, S, G2 e M:</b>	<b><i>fases da mitose</i></b>
<b>G0:</b>	<b><i>fase de repouso</i></b>
<b>SNC:</b>	<b><i>sistema nervoso central</i></b>
<b>CPE:</b>	<b><i>enterotoxina do Clostridium perfringens</i></b>
<b>FMB:</b>	<b><i>Faculdade de Medicina de Botucatu</i></b>
<b>SPBA:</b>	<b><i>Solange Peron Bueno Angela</i></b>
<b>OMS:</b>	<b><i>Organização Mundial da Saúde</i></b>
<b>CEP:</b>	<b><i>Comitê de Ética em Pesquisa</i></b>
<b>IMC:</b>	<b><i>Índice de massa corporal</i></b>
<b>&lt;:</b>	<b><i>menor</i></b>
<b>&gt;:</b>	<b><i>maior</i></b>
<b>≥:</b>	<b><i>maior ou igual</i></b>
<b>≤:</b>	<b><i>menor ou igual</i></b>
<b>Kg/m<sup>2</sup>:</b>	<b><i>kilograma por metro quadrado</i></b>
<b>TH:</b>	<b><i>terapia hormonal</i></b>
<b>cm<sup>3</sup> :</b>	<b><i>centímetro cúbico</i></b>

---

<b>U/ml:</b>	<b><i>unidade por mililitro</i></b>
<b>TMA:</b>	<b><i>Tissue microarray</i></b>
<b>USA:</b>	<b><i>Estados Unidos da América</i></b>
<b>°C:</b>	<b><i>grau centígrado</i></b>
<b>h:</b>	<b><i>hora</i></b>
<b>min:</b>	<b><i>minuto</i></b>
<b>SST:</b>	<b><i>solução salina tamponada</i></b>
<b>pH:</b>	<b><i>potencial de hidrogênio</i></b>
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:</b>	<b><i>peróxido de hidrogênio</i></b>
<b>%:</b>	<b><i>por cento</i></b>
<b>s.:</b>	<b><i>segundos</i></b>
<b>=:</b>	<b><i>igual</i></b>
<b>ER:</b>	<b><i>Receptor de estrógeno</i></b>
<b>PGR:</b>	<b><i>Receptor de progesterona</i></b>

---



*Resumo*

---

O Carcinoma de Endométrio é a neoplasia epitelial maligna que acomete mulheres no pré, pós e peri-menopausa. Segundo diferenças endócrinas, metabólicas, fatores de risco e morfologia é classificado em dois grandes grupos: Tipo I (endometrióide) e Tipo II (não endometrióide). O Tipo I perfaz 90 % dos carcinomas de endométrio e sua patogenia esta ligada a exposição excessiva ao estrógeno. O Tipo II é incomum, com fatores predisponentes menos conhecidos. O sintoma mais relevante do carcinoma de endométrio é o sangramento pós-menopausa. Seu diagnóstico é feito pela comprovação histológica, associada aos exames de imagem e laboratoriais. Seu tratamento é fundamentalmente cirúrgico. O fator prognóstico mais importante é a presença ou ausência de metástase nos linfonodos regionais. Atualmente, buscam-se marcadores biológicos e teciduais que indiquem pior prognóstico. Este trabalho verificou a imunexpressão da claudina-3 (CLDN3) e claudina-4 (CLDN4) nos carcinomas de endométrio Tipo I e Tipo II, relacionando-as com endométrio proliferativo e atrófico, aspectos clínicos, anatomopatológicos, perfil hormonal, índice de proliferação celular e expressão da p53, na tentativa de estabelecer a importância destas proteínas na progressão e agressividade tumoral e o seu valor prognóstico. Foram estudados 79 casos de carcinoma de endométrio e comparados com 74 endométrios normais. Avaliou-se a imunexpressão das CLDNs 3 e 4, receptor estrogênico, receptor de progesterona, índice de proliferação celular (Ki67) e p53, pela técnica de imunistoquímica. Observou-se que o padrão de coloração da membrana para CLDN3 se mostrou difuso nos carcinomas, quando comparado com os endométrios normais que exibiu padrão focal. O número de células marcadas com CLDN3 estava diminuído nos carcinomas Tipo I, porém com intensidade aumentada. Nesta análise foi possível verificar que 25% dos casos com elevada expressão da CLDN4 e do Ki-67 desenvolveram metástase. Enquanto, 33% dos casos com alta intensidade da CLDN4, mas baixa expressão do Ki-67 apresentou evolução metastática. Em conclusão, este estudo demonstrou que a imunexpressão aumentada das claudina-3 e claudina-4 (intensidade alta e padrão difuso de marcação de membrana) envolve a transformação maligna do endométrio normal, e estão relacionadas com prognóstico desfavorável das pacientes com Adenocarcinoma de Endométrio Endometrióide, estágio avançado e metástase à distância. Além disso, a claudina-4 se mostrou um marcador independente de agressividade.

**Palavras chaves:** Claudina-3, claudina-4, carcinoma de endométrio, imunistoquímica, metástase.

---



*Summary*

Carcinoma of the Endometrium is a malignant epithelial tumor which affects pre, peri and post-menopausal women. It is classified into two major groups, according to endocrine, metabolic risk factors and morphological differences: Type I (endometrioid) and Type II (non-endometrioid). Type I accounts for 90% of all endometrial carcinomas and its pathogenesis is linked to excessive estrogen exposure. The Type II is less common, with poorly defined predisposing factors. The most important symptom of endometrial carcinoma is postmenopausal bleeding. Diagnosis is achieved through histological evidence, in association with imaging and laboratorial exams. Treatment is primarily surgical. The most important prognostic factor is the presence or absence of metastases in regional lymph nodes. Bio and tissue markers that indicate worse prognosis are the focus of current research. This study examined the immunoexpression of claudin-3 (CLDN3) and claudin-4 (CLDN4) in endometrial carcinomas Type I and Type II, and their relation to proliferative and atrophic endometrium, clinical and pathological features, hormonal status, proliferation index and p53 expression, in an attempt to establish the importance of these proteins in tumor progression and aggressiveness and their prognostic value. Seventy-nine cases of endometrial carcinoma were studied and compared with 74 normal endometria. The immunoexpression of CLDNs 3 and 4, estrogen receptor, progesterone receptor, cell proliferation index (Ki67) and p53 were all evaluated by immunohistochemistry. Observation verified that the pattern of membrane staining for CLDN3 was diffuse in carcinomas compared with normal endometrium which presented a focal pattern. The number of cells stained with CLDN3 was lower in Type I carcinomas, while staining intensity was greater. Analysis verified that 25% of cases with high expression of CLDN4 and Ki-67 developed metastasis, while 33% of cases with greater CLDN4 staining intensity but low expression of Ki-67 showed metastatic evolution. In conclusion, this study demonstrated that the immunoexpression of claudin-3 and claudin-4 (high intensity and diffuse membrane staining) involves the malignant transformation of normal endometrium, is related to poor prognosis of patients with endometrial endometrioid adenocarcinoma and determines advanced staging and distant metastasis. Furthermore, claudin-4 was shown to be an independent marker of metastasis.

**Keywords:** claudin-3, claudin-4, endometrial carcinoma, immunohistochemistry, metastasis.

---



# *1. Introdução*

---

O Adenocarcinoma de Endométrio (ACE) é a neoplasia epitelial maligna do endométrio, geralmente com diferenciação glandular, com potencial de invadir o miométrio e dar origem a metástases (TAVASSOLI; DEVILEE, 2003). Perfaz 90% das neoplasias malignas do útero e podem ser chamados de Carcinoma do Corpo Uterino (ROSE, 1996). É a sétima neoplasia maligna mais comum entre as mulheres, com aproximadamente 290.000 novos casos/ano no mundo e responsável por 74.000 óbitos/ano. Sua incidência é dez vezes maior em países desenvolvidos (América do Norte e Europa Ocidental) quando comparado com países em desenvolvimento (INCA, 2013). Nos Estados Unidos é a neoplasia maligna ginecológica mais frequente, com aproximadamente 50.000 casos novos/ano com taxa de mortalidade de 1,7 a 2,4/100.000 mulheres (INCA, 2013). No Brasil, é a terceira neoplasia ginecológica mais frequente, logo a seguir do câncer de colo uterino e mama, com uma incidência de 4,0/100.000 mulheres/ano e mortalidade de 1,7/100.000 mulheres/ano (INCA, 2013). A taxa de mortalidade do ACE é de 30%, diferindo do carcinoma de colo uterino, 55%, e carcinoma de ovário, 80 a 85% (SOUTHCOTT, 2001). Na maioria das pacientes, o sangramento pós-menopausa é o principal sintoma, o que facilita seu diagnóstico em estágio inicial, sendo que 68% dos casos são diagnosticados confinados ao útero; 20% com metástases regionais e linfonodos; e 8% com metástases à distância (INCA, 2013). O ACE é considerado um tumor de bom prognóstico, porém tal fato não afasta a existência de casos que evoluam com alta agressividade (GARG; SOSLOW, 2012).

O pico de incidência do ACE é 55 a 65 anos, com mediana de 63 anos de idade, sendo mais prevalente na raça branca. ACE pode ocorrer nos períodos pré, peri ou pós-menopausa. É uma neoplasia maligna heterogênea e, em 1983, Bokhman propôs uma classificação baseada em diferenças endócrinas, metabólicas e fatores de risco. Sendo assim, os ACE foi classicamente dividido em: ACE Tipo I ou Endometrióide (ACEE) e ACE Não Endometrióide ou Tipo II (ACENE)(BRINTON, 2013).

O ACE Tipo I ou Endometrióide perfaz cerca de 90% dos casos de ACE, e sua patogenia esta associada à exposição excessiva ao estrógeno, tanto exógeno quanto endógeno, sem a oposição adequada da progesterona. A terapia estrogênica isolada sistêmica (BRINTON et al.,1992; BARAK et al.,1997; ACOG, 2000), terapia hormonal pós-menopausa com estrógeno e progesterona, o Tamoxifeno (IQBAL et

---



---

al.,1992), os fitoestrogênios (OLLBERDING et al., 2012), anovulação crônica (SOLIMAN et al.,2005) , menarca precoce, menopausa tardia (LAVECCHIA et al.,2005) e tumores secretores de estrógeno (ZANAGNOLO et al.,2004) estão associados a este subtipo. A obesidade, que determina a conversão da androstenediona para estrona no tecido adiposo, via a atividade da aromatase, está fortemente associada ao ACE Tipo I. A nuliparidade, hipertensão arterial, Diabetes Mellitus tipo I, Síndrome de Lynch, hiperexpressão dos oncogenes BRCA I e II também são fatores de risco (SETIAWAN, 2012). Morfologicamente, o ACEE se assemelha ao endométrio normal (glândulas bem diferenciadas) e, o caminho mais provável da carcinogênese é: exposição excessiva ao estrógeno, endométrio de padrão anovulatório e subsequente desenvolvimento de hiperplasia atípica, neoplasia intraepitelial endometrial (NIE) que evolui para adenocarcinoma (SILVERBERG et al., 2003) em 40% dos casos. Os aspectos morfológicos são variados: glândulas que lembrem o do endométrio normal ou diferenciações epiteliais diversas, tais como diferenciação escamosa, diferenciação mucinosa, diferenciação ciliar ou tubária, diferenciação secretória e escamotransicional (CRUM et al., 2011). A *International Federation of Gynecology and Obstetrics* (FIGO) gradua os ACEE em três graus, conforme aspectos morfológicos que tentam traduzir maior agressividade: grau 1, crescimento sólido em menos que 5% da amostragem (excluindo diferenciação escamosa); grau 2, crescimento sólido de 5 a 50% da amostragem; grau 3, crescimento sólido em mais que 50% da amostragem (TAVASSOLI; DEVILLE, 2003). Os ACEE são normalmente confinados ao útero, sendo que ao diagnóstico, menos que 10% das pacientes têm evidencia de doença extrauterina; a taxa de metástase peritoneal é menos que 5%. Este subtipo possui bom prognóstico e acomete mulheres no final da quinta e sexta décadas de vida (GARG, 2012).

O ACE Não Endometrióide ou Tipo II é incomum e os fatores que o predispõe são menos definidos. Estudos indicam uma origem independente de influência hormonal estrogênica, porém associam este subtipo ao tabagismo, multiparidade, mulheres não-brancas, não obesas e exposição a irradiação (CRUN et al., 2011). A associação com carcinoma mamário e uso do Tamoxifen também é referido como fator de risco para este subgrupo (TERGAS, 2012). Ocorre em pacientes na sétima ou oitava década de vida, no período pós-menopausa e não se associa com historia

---

---

prévia de hiperplasia endometrial, mas de atrofia do endométrio (GELLS, 2012) ou ACEE graus 1 e 2. A disseminação extrauterina é observada em 40 a 60% dos casos ao diagnóstico. Os ACE associados a este subtipo são: Adenocarcinoma Seroso, Adenocarcinoma de Células Claras, Adenocarcinoma Misto, Carcinosarcoma, Carcinoma Escamoso, Carcinoma de Células Transicionais, Carcinoma de Pequenas Células (neuroendócrino) e Carcinoma Indiferenciado. As quatro últimas entidades são raras (TAVASSOLI; DEVILEE, 2003) e este subgrupo é representado principalmente pelo Adenocarcinoma Seroso e Adenocarcinoma de Células Claras. Sua origem está associada a danos gênicos do epitélio endometrial superficial e lesões precursoras pouco definidas. O ACENE tem pior prognóstico quando comparado com ACEE. Enquanto no primeiro, a sobrevida livre da doença em três anos é de 46 a 54%, no segundo é de 85% (GARG; SOSLOW, 2012).

A classificação de Bokhman (BOKHMAN, 1983) para ACE é clara e útil para se concluir que os Tipo I e Tipo II se diferem quanto à idade de incidência, fatores de risco e aspectos morfológicos, confirmando a heterogeneidade desta neoplasia. Este fato levanta várias observações importantes. No estudo de PARK e col. (2012), casos de ACEE grau 3 estavam associados a áreas grau 1 ou 2, demonstrando que o primeiro pode ser uma evolução dos graus posteriores. Em outro estudo observa-se que o ACEE grau 3 é semelhante ao ACE Tipo II, quando se analisa aspectos clínicos, perfil imunoistoquímico e prognóstico (ALVAREZ, 2012), e deve ser associado a este grupo quando avalia-se o grau de agressividade da neoplasia. Na prática, esta classificação pode ter variações, uma vez que os patologistas podem se deparar com casos que possuam uma aparência mista, principalmente com aspectos ACEE e Carcinoma Seroso (SILVERBERG, 2003).

O sintoma mais relevante no ACE é o sangramento pós-menopausa. Aproximadamente 91% das pacientes apresentam sangramento pós-menopausa ou irregularidade perimenopausa como principal queixa (GULL et al., 2003). Dor abdominal também é relatada. Estudos indicam que qualquer sangramento anormal deveria ser investigado, inclusive intermenstrual e oligomenorréia (KRISSE ; MENCZER, 1996). O diagnóstico de ACE é realizado pela comprovação histológica, associada aos exames laboratoriais e de imagem. Os exames laboratoriais e de imagem, como a ultrassonografia pélvica, auxiliam a descartar outras patologias que fazem diagnóstico diferencial com ACE e que causam sangramento uterino anormal,

---

---

como leiomiomas e pólipos. Tais exames ajudam ainda a avaliar a espessura endometrial como forma de selecionar as pacientes que irão para uma biópsia de endométrio (ACOG, 2012). Mulheres cuja ultrassonografia pélvica mostra endométrio com espessura menor ou igual a 4.0 mm ficam isentas de uma biópsia de endométrio, exceto aquelas com sangramento uterino (ACOG, 2012). A confirmação diagnóstica do ACE, é feita pela obtenção de material através de biópsia feita por *Pipelle de Cornier* ou da biópsia guiada por histeroscopia. O tratamento do ACE é fundamentalmente cirúrgico através da histerectomia total abdominal e salpingo-ooforectomia bilateral realizada tanto por laparotomia quanto por laparoscopia ou robótica (WRIGHT et al.,2012). A principal via de disseminação do ACE é a linfática, sendo assim, a utilização da linfadenectomia em mulheres com estágio inicial é controversa. Alguns ginecologistas defendem a amostragem seletiva de linfonodos em mulheres de alto risco (com subtipos de alto grau ou invasão tumoral profunda), entretanto outros recomendam linfadenectomia sistemática de rotina em todas as pacientes (WRIGHT et al.,2012).

O estadiamento do ACE depende de informações clínicas e imaginológicas, mas principalmente intraoperatórias e anatomopatológicas. O estadiamento (FIGO, 2009) é descrito abaixo (PECORELLI, 2009):

**Estádio I:** O carcinoma está confinado ao corpo uterino.

- **Ia,** Tumor limitado ao endométrio ou invasão menor que a metade da espessura do miométrio (G1, G2 e G3).
- **Ib,** Invasão igual ou maior que a metade da espessura do miométrio (G1, G2 e G3). Invasão glandular do colo deve ser considerada Estádio I.

**Estádio II:** O carcinoma invade o estroma cervical (G1, G2 e G3), mas ainda está limitado ao útero.

**Estádio III:** Carcinoma com infiltração local ou regional.

- **IIla,** Tumor invadindo serosa e/ou anexos (G1, G2 e G3).
-

- **IIIb**, Envolvimento vaginal e/ou parametrial (G1, G2 e G3).
- **IIIc**, Metástase para linfonodos pélvicos e/ou retroperitoneais (G1, G2 e G3).
- **IIIC1**, Linfonodos pélvicos comprometidos.
- **IIIC2**, Linfonodos retroperitoneais comprometidos.

Lavado peritoneal deve ser reportado, porém sem alterar o estadiamento.

**Estádio IV:** invasão de órgãos adjacentes ou à distância.

- **IVa**, Tumor invadindo bexiga e/ou mucosa intestinal (G1, G2 e G3).
- **IVb**, Metástases à distância, incluindo as intra-abdominais e/ou linfonodos inguinais.

A presença ou ausência de metástase nos linfonodos regionais é o fator prognóstico mais importante. O *American Joint Committee on Cancer* (EDGE, 2010) recomenda que os linfonodos regionais sejam submetidos ao exame anatomopatológico de maneira sistemática. Historicamente, o grau e a profundidade de invasão miometrial são reconhecidos como dados importantes para determinação prognóstica. Esses estariam, por análise multivariada, associados à probabilidade de metástases nodais (EDGE, 2010). No ACENE ou Tipo II a profundidade de invasão do miométrio não se correlaciona com o achado de doença extrauterina ou nodal. Por esta razão este subtipo é classificado como grau 3 (ALVAREZ, 2012).

No ACEE as terapias adjuvantes, como radioterapia, quimioterapia e hormônio-terapia, vão ser indicadas de acordo com o estágio da doença e do grau de diferenciação (WRIGHT et al., 2012).

Os estudos moleculares demonstram que o ACE Tipo I e Tipo II são entidades distintas. As análises de DNA complementar (cDNA) demonstram claramente que possuem perfis gênicos diferentes (ALVAREZ, 2012). O Tipo I apresenta instabilidade de microssatélites (MI) e mutação nos genes *PTEN*, *K-RAS*, *PIK3CA*, *CTNNB1* ( $\beta$ -catenina), enquanto que no Tipo II observam-se alterações no *TP53*, perda da heterozigose em vários cromossomos e outras alterações

---

moleculares (STK15, P16, E-caderin, c-erb-B2) (MATIAS-GUIU; PRAT, 2013). *PTEN* esta localizado no cromossomo 10q23.3 e, no ACEE observa-se mutação somática em 37 a 61% dos casos; esta porcentagem aumenta para 87% quando há MI. Interessante observar que esta mutação é frequente nas hiperplasias atípicas, demonstrando que a mutação do *PTEN* deve ser um evento inicial para o desenvolvimento tumoral (ODA et al., 2005). Alguns autores associam esta mutação com melhor prognóstico, porém existe a associação com maior instabilidade genômica (MATIAS-GUIU; PRAT, 2013). Devido a este achado, estudos (FOSTER et al., 2011) sugerem que estes pacientes deveriam ser tratados com inibidores da poli-polimerase. A mutação do gene *PIK3CA* ocorre em 23 a 39% dos casos e tem sido associado a fatores prognósticos adversos, como alto grau histológico e invasão miometrial (URICK et al., 2011). A mutação do *K-RAS* tem sido observada em 30% dos casos, bem como a inativação do *RASF1A* por hipermetilação, o que levaria a uma ativação de sinais para via de crescimento tumoral (MATIAS-GUIU; PRAT, 2013). A redução da expressão do *SPRY2* por hipermetilação está associada a índices de proliferação celular aumentado. Mutação no gene *FGFR2* leva a interesse como alvo terapêutico, no uso de inibidores da atividade deste gene (VELASCO et al., 2011). A mutação no gene *CTNNB1* parece indicar prognóstico favorável (MATIAS-GUIU; PRAT, 2013). Em 90% dos casos, os ACE Tipo II estão associados com *TP53* mutado e expressão reduzida da E-caderina (ALVAREZ, 2012). Já nos ACEE ou Tipo I, esta associação se faz em somente 10 a 20% dos casos, principalmente no grau 3 (PALLARES, 2004). As alterações mais características do ACE Tipo II são os ganhos e perdas cromossômicas generalizadas que refletem a presença de aneuploidia. Este grupo é caracterizado pelas alterações complexas, como apontam estudos recentes, as moléculas de adesão das células epiteliais (EpCAM), receptores das claudina-3 e claudina-4, amiloide sérico A, ácido fólico ligado as proteínas, mesotelina e fator de crescimento II Insulina-Like e o IMP2 como potenciais biomarcadores no Carcinoma Seroso (MATIAS-GUIU; PRAT, 2013). Interessante a observação nos faz Gounaris e col. (2011) que sugerem a aproximação não só morfológica, mas de aspectos moleculares do Carcinoma de Células Claras do endométrio e do ovário. Ambos mostram mutação no gene *ARID1A* e baixa expressão da proteína BAF250A, o mesmo se observa nas análise com cDNA *array*. Já o Carcinoma Seroso de

---

---

endométrio e ovário se distinguem de maneira contundente. Curiosamente, os estudos moleculares tendem a esclarecer os casos de morfologia mista entre ACEE e ACENE. Estes casos mantêm as alterações moleculares de ACEE, confirmando uma possível progressão do tumor (GARG; SOSLOW, 2012). Aspectos controversos, que a biologia molecular tende a esclarecer, são os casos ACEE grau3, que se aproximam do ACENE pela presença da mutação do *TP53* (LAX et al., 2000).

O gene supressor tumoral *TP53*, localizado no braço curto do cromossomo 17 (17p13), codifica uma proteína de transcrição ativada em varias formas de estresse celular e exerce múltiplas funções antiproliferativas (VOUSDEN; PRIVES., 2009). A perda da função deste gene ou o desequilíbrio da via de sinalização deste é um aspecto comum das neoplasias humanas. Cerca de 80% das mutações neste gene leva ao acúmulo da proteína intranuclear que perdeu sua função e exerce uma função negativa na proteína p53 selvagem reminiscente (PETITJEAN, 2009). Muitas vezes o produto da mutação exerce um efeito oncogênico independente da proteína p53 selvagem (GOH et al., 2011).

No ACENE ou Tipo II, mais especificamente no Carcinoma Seroso, observa-se com frequência *TP53* mutado e o estudo imunoistoquímico é uma técnica adequada para se visualizar a proteína acumulada nos núcleos das células neoplásicas (GARG; SOSLOW, 2012). Esta se faz visualizar, visto que o produto da mutação possui uma meia vida prolongada. A observação de coloração nuclear forte em mais de 75% de células neoplásicas demonstra correlação com a presença da mutação (LAX et al., 2000). Contudo, mutações *nonsense* do *TP53*, podem, ocasionalmente, levar a negatividade da coloração da p53, uma vez que o produto protéico deste tipo de mutação é indetectável pela reação de imunoistoquímica (GARG; SOSLOW, 2012). Até o presente estudo, o significado da expressão da p53 no ACE é controverso. Alguns estudos apontam que a expressão da p53 teria um significado prognóstico negativo, independente de qualquer outro dado clínico (GEISLER et al., 1999; POWELL et al., 1999). No entanto, outros estudos (ATHANASSIADOU, 2007; CANLORBE et al., 2013), que utilizaram de análise multivariada, não confirmaram tal informação. Alguns patologistas relatam que a interpretação da expressão positiva da p53 é incerta, visto que esta já foi detectada em tecidos não tumorais e em neoplasias de baixo grau. Assim, a interpretação da

---

---

p53 no ACE é envolta em controvérsias, porém sabe-se que um pequeno número de ACEE é fortemente positivo para p53 e que nos ACENE, sua positividade se correlaciona com padrão seroso, atipias nucleares e formações papilíferas e que, nem sempre a negatividade da expressão da p53 significa ausência de mutação do gene (SILVERBERG et al., 2011).

O gene *Ki67* está localizado no cromossomo 10q25 que codifica uma proteína, originalmente identificada por Gerdes em 1980 (GERDES et al., 1983). Esta proteína é denominada Ki67 em homenagem ao local de sua descrição, a Universidade de Kiel, na Alemanha. A expressão desta proteína varia de acordo com as diferentes fases do ciclo celular. As células expressam a proteína nas fases G1, S, G2 e M, mas não durante a fase de repouso G0. Os níveis de Ki67 são baixos nas fases G1 e S e atingem seu nível máximo em mitose (YERUSHALMI et al., 2010). No ACE, não há nenhum índice de corte que separe os ACEE do ACENE. Sabe-se que os Carcinomas Serosos tendem a ter índice de proliferação mais alto quando comparados com os ACE. Alguns estudos discutem que maior índice de proliferação celular no ACE seria um fator de mau prognóstico independente de dados clínicos (SALVESEN et al., 1999). Outros autores apontam para a ideia que o alto índice de proliferação celular se correlaciona com pior prognóstico nos ACEE grau 1 e 2 e não nos Carcinomas Serosos (AL KUSHI et al., 2002). Existem grupos que utilizam o Ki67 nos casos de ACE p53 negativo; quando o índice de proliferação for alto, indica o diagnóstico morfológico de Carcinoma Seroso, no contexto clínico e histológico adequado (GARG; SOSLOW, 2012).

Os esteróides hormonais, principalmente o estrogênio, têm um papel importante na patogênese do carcinoma de endométrio. Sabe-se que a exposição ao estrogênio sem a oposição da progesterona aumenta o risco de hiperplasia endometrial e câncer. O estrogênio é um hormônio lipofílico que atravessa livremente a membrana da célula e se une ao receptor de estrógeno em seu núcleo, controlando a expressão de vários genes, incluindo aqueles que codificam receptores de progesterona e fatores de crescimento (GREEN; CHAMBOM, 1988; PARKER et al., 1991)). Os receptores de estrógeno apresentam duas isoformas, alfa (ESR1) e beta (ESR2). Enquanto o ESR1 apresenta 595 aminoácidos e é codificado por gene localizado no cromossomo 6, o ESR2 tem 530 aminoácidos e seu gene encontra-se no cromossomo 14 (DE CREMOUX, 2011).

---

Além das diferenças estruturais e de afinidade, os dois receptores apresentam concentrações variáveis em diferentes tecidos. O ESR1 é expresso predominantemente no aparelho reprodutivo (ovários, mamas e útero), sistema nervoso central e fígado, enquanto o ESR2 é expresso em tecidos como ossos, endotélio, pulmões, SNC, próstata, ovários e tecido urogenital (DIEZ PEREZ, 2006; KUIPER et al.,1997).

O ACEE grau 1 e 2 geralmente expressa receptor de estrógeno e progesterona, ao contrário do Carcinoma Seroso. No entanto, existem estudos que demonstram que os Carcinomas Serosos podem expressar frequentemente receptor estrogênico e, menos frequente, receptor de progesterona (GARG; SOSLOW, 2012).

Os receptores de estrogênio e progesterona geralmente apresentam expressão diminuída no câncer de endométrio comparado com hiperplasia endometrial (GUI et al.,2010). Os receptores de estrógeno e progesterona são também descritos como fatores independentes de bom prognóstico para o câncer de endométrio, tais como estágio inicial da doença, menor probabilidade de invasão miometrial, baixo grau tumoral, e ausência de invasão linfo vascular. No entanto, estes estudos ainda são controversos (SRIJAIPRACHAROEN et al., 2010).

As claudinas (CLDNs) pertencem a uma família de 27 proteínas e compõem as junções estreitas das células epiteliais onde estabelecem a barreira paracelular que controla o fluxo de moléculas no espaço intercelular e, por consequência, regulam a homeostase (NAG; MORIN, 2009). As junções estreitas estão envolvidas na manutenção da polaridade celular, regulação da proliferação, diferenciação e outras funções celulares, devido à sua capacidade de selecionar proteínas sinalizadoras (RUFFER; GERKE, 2004). As CLDNs são moléculas pequenas (20 a 27 Kilodaltons), formadas por quatro domínios transmembrana, com o N- terminal e o C-terminal localizado no citoplasma (NAG & MORIN, 2009). Elas estão expressas numa variedade de tecidos normais, condições hiperplásicas, neoplasias benignas e cânceres de diferenciação epitelial (PAN, 2007; PAN, 2013). O papel das CLDNs ainda não está bem estabelecida, mas sabe-se que são as principais proteínas das junções intercelulares estreitas. São tecidos específicas e, muitos expressam várias CLDNs que interagem entre si (TURKSEN; TROY, 2004). Durante a aquisição do fenótipo neoplásico pelas células epiteliais ocorre a interrupção da adesão intracelular que são mantidas pelas junções



---

aderentes e pelas junções estreitas (RUFFER; GERKE, 2004). Acredita-se que a perda da integridade epitelial seja devido a alterações nos níveis de claudinas e no conseqüente rompimento de comunicação paracelular, contribuindo para o aparecimento de espaços que propiciam a mobilidade celular e no aumento de suprimento nutricional para as células neoplásicas. Assim, o grau elevado de organização, tipicamente encontrado em tecido normal diferenciado, é muitas vezes perdido durante a evolução para tecido neoplásico (OUBAN et al., 2012). O estudo da expressão de vários tipos de CLDNs em cânceres pode ser usado para confirmar a identidade histológica do carcinoma e como marcador de prognóstico (OUBAN; AHMED, 2010). Além disso, verificou-se que CLDN3 e CLDN4 podem funcionar como alvos terapêuticos, uma vez que são receptores análogos para a enterotoxina do *Clostridium perfringens* (CPE), que possui efeitos anti-tumorais (KOMINSKY et al., 2004). CPE se liga à membrana celular e desencadeia a formação de poros, levando à morte celular (WALTHER et al., 2011). As porções extracelulares destas CLDNs também permitem que sirvam diretamente como alvos terapêuticos (KATONAKANO et al., 2010; SAEKI et al., 2009). Porém, ainda é controverso se o aumento ou diminuição das CLDNs, avaliadas por imunistoquímica, levam a um pior ou melhor prognóstico nas neoplasias malignas (RICARDO et al., 2012). Os primeiros estudos relevantes com as CLDNs foram de expressão gênica e definiram um novo subtipo de carcinoma de mama, com baixa expressão de CLDNs, denominado subgrupo molecular CLDN-*low* (HENNESSY et al., 2009; PRAT et al., 2010; TAUBE et al., 2010). Vale ressaltar que, nestes casos, a expressão gênica parece não se correlacionar com os estudos imunistoquímicos. Utilizando a técnica imunistoquímica, Ricardo e col. (2012) demonstraram que expressão elevada das CLDNs 3 e 4 se correlaciona com os tumores de mama triplo negativos (estrógeno, progesterona e Her-2 negativos), e com pior evolução clínica. Nestes casos triplo negativos, as CLDNs podem futuramente servir como alvos terapêuticos. Porém, este estudo relata que a técnica imunistoquímica, mesmo ampliada com CLDN1 e CLDN7, é insuficiente para determinar os carcinomas de mama deste subgrupo molecular CLDN-*low*. Outros cânceres, tais como de ovário (CHOI et al., 2007; HUDSON et al., 2008) tem sido associado a alta expressão de CLDN3 e 4, enquanto, cólon (ERSOZ et al., 2012) esôfago (LEE et al., 2011) e pâncreas (TSUTSUMI et al., 2012) tem sido relatados como contendo CLDNs diminuídas,

---

quando comparadas ao epitélio normal correspondentes. Yéhong Zhu (2006) comprovou que a CLDN 4 é essencial na gênese do Carcinoma Seroso do Ovário, estando presente na superfície de células epiteliais desse tumor. As CLDNs também foram estudadas em efusões serosas, sendo que a CLDN 1 estava mais expressas em Adenocarcinoma de Ovário e as CLDNs 3 e 7 mais específicas para o Adenocarcinoma do que Mesotelioma (KLEINBERG et al., 2007). Sobel e col. (2006) distinguiu dois subtipos de ACE através das CLDNs 1 e 2; a CLDN 1 estava altamente expressas no Tipo II e, a CLDN 2 expressa no Tipo I, confirmando o modelo dualístico de carcinogênese endometrial. Estes estudos indicam que ambas estão altamente expressas em Carcinomas Serosos e de Células Claras e em formas agressivas de ACE com alta recorrência. Santin e col. (2007) estudaram o perfil genético do Carcinoma Seroso Papilífero, comparado ao endométrio normal e identificou 139 genes de alta regulação e 390 de baixa regulação. Dentre os genes de alta regulação estão os receptores das proteínas de adesão celular como CLDNs 3 e 4. Pan e col. (2013) estudaram o papel das CLDNs na tumorigênese endometrial, avaliando-as no endométrio normal (fase proliferativa e secretora), na hiperplasia simples, complexa, atípica e no ACEE e observou baixa expressão no endométrio normal e com hiperplasia típica, o que sugere sua potencial utilidade como marcador diagnóstico e prognóstico.

O estudo, aqui apresentado, é o primeiro a verificar a expressão das CLDNs 3 e 4 nos ACEE e ACENE, relacionando-as com endométrio normal proliferativo e atrófico, bem como aspectos clínicos, anatomopatológicos, perfil hormonal, índice de proliferação celular e expressão da p53, na tentativa de estabelecer a importância destas proteínas na progressão e agressividade tumoral e o seu valor prognóstico.

---



## *Referências Bibliográficas*

---

ACOG: Practice Bulletin n° 128 : Diagnosis of Abnormal uterine bleeding in reproductive – Aged Human. **Obstet Gynecol** , p. 120:197, 2012.

ACOG: Practice Bulletin n° XX: Tamoxifen and Endometrial Cancer. **Committee Opinion 232**; Washington DC, 2000.

ALVAREZ, T. Molecular Profile of Grade 3 Endometrioid Endometrial Carcinoma: Is it a Type I or Type II Endometrial Carcinoma? **American Journal of Surgical Pathology**, v. 36, n. 5, p. 753-761, May 2012.

AL KUSHI, A. et al. Markers of proliferative activity are predictors of patient outcome for low grade endometrioid adenocarcinoma but not papillary serous carcinoma of endometrium. **Modern Pathology**, v.15, n. 4, p. 365–371, 2002.

ATHANASSIADOU, P. et al. The prognostic value of PTEN, p53, and beta-catenin in endometrial carcinoma: a prospective immunocytochemical study. **International Journal of Gynecological Cancer** , v. 17, p. 697–704, 2007.

BRINTON, L. A. et al. Etiologic heterogeneity in endometrial cancer: Evidence from a Gynecologic Oncology Group trial. **Gynecologic Oncology**, v. 129, p. 277-284, 2013.

BOKHMAN, J. V. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. **Gynecologic Oncology**, v. 15, p. 10–7, 1983.

CANLORBE, G. et al. Contribution of immunohistochemical profile in assessing histological grade of endometrial cancer. **Anticancer Research.**, v. 33, n. 5, p. 2191-2198, 2013.

CRUM, C.P. et al. Adenocarcinoma, Carcinosarcoma, and other epithelial tumors of endometrium. In: CRUM, C.P. et al. **Diagnostic Gynecologic and Obstetric Pathology**. 2nd ed. Elsevier Saunders, 2011. Cap. 19, p. 517-581.

---

---

CHOI, Y.L., et al. Expression profile of tight junction protein claudin 3 and claudin 4 in ovarian serous adenocarcinoma with prognostic correlation. **Histology and histopathology**, v. 22, p. 1185–1195, 2007.

EDGE, S. B. et al. AJCC cancer staging manual: the 7th Edition of the *AJCC Cancer Staging Manual and the Future of TNM*. . 7th ed. New York, Springer; 2010.

ERSOZ, S. et al. Prognostic importance of claudin-1 and claudin-4 expression in colon carcinomas. **Pathology, research and practice**, v. 207, n. 5, p. 285–289, May 2011.

FADER A. N. et al. Endometrial cancer and obesity: epidemiology, biomarkers, prevention and survivorship. **Gynecologic Oncology**, v. 114, n. 1 121-127, Jul. 2009.

FOSTER, M. D. et al. Treatment with olaparib in a patient with PTEN-deficient endometrioid endometrial cancer. **Nature reviews. Clinical oncology**. v. 8, n. 5, p. 302-306, 2011.

GARG, K.; SOSLOW, S. A. Strategies for Distinguishing Low-grade Endometrioid Serous Carcinomas of Endometrium. **Advances in anatomic pathology**, v. 19, n. 1, p. 1-10, Jan. 2012.

GEELS, Y. P. et al. Endometrioid endometrial carcinoma with atrophic endometrium and poor prognostic. **Obstetrics and gynecology**., v. 120, n. 5, p. 1124-1131, Nov. 2012.

GEISLER, J. P. et al. p53 expression as a prognostic indicator of 5-year survival in endometrial cancer. **Gynecologic Oncology**, v. 74, p. 468–47, 1999.

GERDES, J. et al. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. **International Journal of Cancer**, v. 31, n. 1, p. 13–20, 1983.

---

- 
- GOUNARIS, I.; CHARNOCK-JONES, S.; BRENTON, J. D. Ovarian clear cell carcinoma—bad endometriosis or bad endometrium? **The Journal of pathology**, v. 225, n. 2, p. 157–160, 2011.
- GOH, A. M., COFFILL, C. R.; Lane, D. P. The role of mutant p53 in human cancer. **The Journal of pathology**, v. 223, n. 2, p. 116–126, 2011.
- GULL, B. et al. Can ultrasson replace dilation and curettage? A longitudinal evaluation of postmenopausal bleeding and transvaginal sonographic measurement of the endometrium as predictors on endometrial cancer. **American Journal Obstetrics & Gynecology**, v. 188, n. 2, p. 401-408, 2003.
- HAYES, M. P.; ELLENSON. L. H. Molecular alterations in uterine serous carcinoma. **Gynecologic Oncology**, v. 116, p. 286 – 289, 2010.
- HENNESSY, B. T. et al Characterization of a naturally occurring breast cancer subset enriched in epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell characteristics. **Cancer research** v. 69, n. 10, p. 4116-4124, May 2009.
- HUDSON, L. G. et al. Phenotypic plasticity of neoplastic ovarian epithelium: unique cadherin profiles in tumor progression. **Clinical & Experimental Metastasis**, v. 25, n. 6, p. 643–655, 2008.
- INCA-Instituto Nacional do Câncer- Ministério da Saúde.Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/estimativa/2012/index.asp>>. Acesso em: 03 jul. 2013.
- IQBAL, J. et al. Edometrial cancer and venous tromboembolism im womem under age 50 who take for prevention of breast cancer: a systematic review. **Cancer Treatment Reviews**, v. 38, n. 4, 318-328, Jun. 2012.
- KATO-NAKANO, M. et al. Characterization and evaluation of the antitumour activity of a dual-targeting monoclonal antibody against claudin-3 and claudin-4. **Anticancer Research**. v. 30, p. 4555-4562, 2010.
-

- 
- KLEINBERG, L. et al. The diagnostic role of claudins in serous effusions. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 127, n. 6, p. 928-937, 2007.
- KOMINSKY, S. L. et al. Clostridium perfringens enterotoxin elicits rapid and specific cytolysis of breast carcinoma cells mediated through tight junction proteins claudin 3 and 4. **American Journal Pathology**, v. 164, p. 1627-1633, 2004.
- LACHANCE J. A. et al. The effect of age on clinical/pathologic features, surgical morbidity, and outcome in patients with endometrial cancer. **Gynecologic Oncology**, v. 101, n. 3, p. 470, 2006.
- LA VECCHIA C. et al. Risk factors endometrial cancer at different ages. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 73, n.3, p. 667-671, 1984.
- LAX, S. F. et al. Frequency of p53, K-ras mutations, and microsatellite instability differs in uterine endometrioid and serous carcinoma: evidence of distinct molecular genetics pathways. **Cancer**, v. 88, n. 4, p. 814 – 824, Feb. 2000.
- LEE, K. W. et al. Twist1 causes the transcriptional repression of claudin-4 with prognostic significance in esophageal cancer. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 423, n.3, p. 454–460, 2012.
- MATIAS-GUIU, X; PRAT, J. Molecular pathology of endometrial carcinoma. **Histopathology**, v. 62, n. 1, p. 111- 123, 2013.
- MINETA, K., et al. Predicted expansion of the claudin multigene family. **FEBS Letters**, v. 585, n. 4, p. 606-612, 2011.
- NAG, L. M; MORIN, P.J. The claudins. **Genome Biology**, v. 10, p. 235.1-235.7, 2009.
- ODA, K. et al. High frequency of coexistent mutations of PIK3CA and PTEN genes in endometrial carcinoma. **Cancer research**, v. 65, n. 23 p. 10669–10673, 2005.
-

---

OLLBERDING, N. J. et al. Legume, soy, tofu, and isoflavone and endometrial cancer risk postmenopausal women in the multiethnic cohort study. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 104, n. 1, p. 67, Jan. 2012.

OLLIKAINEN, M. et al. Molecular analysis of familial endometrial carcinoma: a manifestation of hereditary nonpolyposis colorectal cancer or a separate syndrome? **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 21, p. 4609-4616, Jul. 2005.

OUBAN, A. et al.. Claudin-1 expression in squamous cell carcinomas of different organs: comparative study of cancerous tissues and normal controls. **International journal of surgical pathology**, v. 20, n. 2, p.132-138, Apr. 2012.

OUBAN, A.; AHMED, A. A. Claudins in human cancer: a review. **Histology and Histopathology**. v. 25, n. 1, p. 83-90, 2010.

PALLARES, J.; MARTINEZ-GUITARTE, J. L.; DOLCET, X. Abnormalities in NF- $\kappa$ B family and related proteins in endometrial carcinoma. A tissue microarray study. **Journal Pathology**, v. 13, p. 569–577, 2004.

PAN, X.. Overexpression of claudin-4 may be involved in endometrial tumorigenesis. **Oncology Letters**, v. 5, n. 4, p. 1422-1426, 2013.

PAN,X.Y.. Expression of claudin-3 and claudin-4 in normal,hyperplastic and malignant endometrial tissue. **International Journal of Gynecological Cancer**, v. 17, n. 1 233-241, Jan./Fev. 2007.

PARK, J. Y. Poor prognosis of uterine serous carcinoma compared with grade 3 endometrioid carcinoma in early stage patients. **Virchows Archiv**, v. 462, n. 3 p. 289–296, 2013.

PECORELLI, S. Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, and endometrium. **International journal of gynaecology and obstetrics**, v. 105, n. 2, p. 103–104, 2009.

---



- 
- PETITJEAN, A. et al. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. **Human Mutation**, v. 28, n. 6, p. 622–629, 2007.
- POWELL, B. et al. p53 protein overexpression is a prognostic indicator of poor survival in stage I endometrial carcinoma. **International journal of oncology**, v.14, n. 1, p.175–179, 1999.
- PRAT, A. et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 12, n. 5, p. 1-18, 2010.
- RICARDO, S. et al. Claudin expression in breast cancer: High or low, what to expect? **Histology Histopathology**, v. 27, p. 1283-1295, 2012.
- RÜFFER, C.; GERKE, V. The C-terminal cytoplasmic tail of claudins 1 and 5 but not its PDZ-binding motif is required for apical localization at epithelial and endothelial tight junctions. **European Journal of Cell Biology**, v. 83, n. 4, p. 135-134, 2004.
- SAEKI, R. et al. A novel tumor-targeted therapy using a claudin-4-targeting molecule. **Molecular Pharmacol**, v. 76, p. 918-926, 2009.
- SALVESEN, H. B. et al. Prognostic significance of angiogenesis and Ki-67, p53, and p21 expression: a population-based endometrial carcinoma study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 17, n. 5, p. 1382-1390, 1999.
- SANTIN, A. D. et al. Overexpression of claudin-3 and claudin-4 receptors in uterine serous papillary carcinoma: novel targets for a type-specific therapy using Clostridium perfringens enterotoxin (CPE). **Cancer**, v. 109, n. 7, p. 1312-1322, 2007.
- SETIAWAN, V. W. et al. Age at last birth in relation to risk of endometrial cancer: Pooled Analysis in the Epidemiology of Endometrial Cancer Consortium. **American Journal of Epidemiology**, v. 176, n. 4, p. 269-278, Jul. 2012.
-

---

SILVERBERG, S. G. et al. Epithelial tumours and related lesions. In: TAVASSOLI, F. A.; DEVILEE, P. **Pathology and Genetics Tumours of the Breast and Female Genital Organs: WHO Classification of Tumors**. 3rd ed. Lyon: IARC, 2003. Cap. 4, p. 221-232.

SOBEL, G. et al. Claudin 1 differentiates endometrioid and serous papillary endometrial adenocarcinoma. **Gynecologic Oncology**, v.103, n. 2, p.591-598, 2006.

SOLIMAM, P. T. , et al. Risk factors for young premenopausal women with endometrial cancer. **Obstetrics & Gynecology**, v. 105, p. 575-580, 2005.

SOUTHCOTT, B. Carcinoma of the Endometrium. **Drugs**, v. 61, n. 10, p.1395-1404, 2001.

SZABÓ, I. et al. Claudins as diagnostic and prognostic markers in gynecological cancer. **Histology and Histopathology**, v. 24, n. 12, p. 1607-1615, Dec. 2009.

TAUBE, J. H. Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 35, p. 1544-1545, 2010.

TAVASSOLI, F. A.; DEVILEE, P. **Pathology and Genetics Tumours of the Breast and Female Genital Organs: WHO Classification of Tumors**. 3rd ed. Lyon: IARC, p. 432, 2003.

TERGAS, I. A. et al. Clinico-pathologic comparison of type II endometrial cancers based on Tamoxifen exposure. **Gynecologic Oncology**, v. 127, n. 2, p. 316-320, 2012.

TSUTSUMI, K. et al. Claudin-4 expression predicts survival in pancreatic ductal adenocarcinoma. **Annals of Surgical Oncology**, v. 19 (Suppl 3), p. S491–S499, 2012.

---

---

TURKSEN, K.; TROY, T. C. Barriers built on claudins. **Journal of Cell Science**, v. 117, p. 2435-2447, 2004.

URICK, M. E. et al. PIK3R1 (p85a) is somatically mutated at high frequency in primary endometrial cancer. **Cancer Research**, v. 71, n. 12, , p. 4061–4067, Jun. 2011.

VELASCO, A. et al. Promoter hypermethylation and expression of sprouty 2 in endometrial carcinoma. **Human Pathology**, v. 42, n. 2, p. 185–193, Fev. 2011.

VOUSDEN, K. H.; PRIVES, C. Blinded by the light: the growing complexity of p53. **Cell**, v. 137, n. 3 p. 413–431, 2009.

WALTHER, W. et al. Novel Clostridium perfringens enterotoxin suicide gene therapy for selective treatment of claudin-3- and -4-overexpressing tumors. **Gene therapy**. v. 19, n. 5, p. 494-503, 2011.

WRIGHT JR, T. C. et al. 2006 consensus guidelines for the management of women with abnormal cervical screening test. **Journal of lower genital tract disease**, v. 11, n. 4, p. 201, 2007.

YERUSHALMI, R. et al. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. **The Lancet Oncology**, v. 11, n. 2, p. 174–183, 2010.

ZANAGNOLO, V.; PASINETTI, B, E. Clinical review of 63 cases of sex cord stromal tumors. **European Journal of Gynaecological Oncology**., v. 25, n. 4, p. 431-438, 2004.

ZHU, Y. et al. Differences in expression patterns of the tight junction proteins, claudin 1, 3, 4 and 5, in human ovarian surface epithelium as compared to epithelia in inclusion cysts and epithelial ovarian tumours. **International Journal of Cancer**, v. 118, n. 8, p. 1884-1891, Apr. 2006.

---

## *2. Objetivos*

### **2.1. Objetivo geral**

No Adenocarcinoma de Endométrio, avaliar a imunexpressão das claudinas 3 e 4;

### **2.2. Objetivos Específicos**

- No adenocarcinoma de endométrio endometrióide, avaliar a correlação da imunexpressão das claudinas 3 e 4 com variáveis anatomopatológicas e de prognóstico;
  - No adenocarcinoma de endométrio endometrióide, correlacionar a imunexpressão das claudinas 3 e 4 com outros marcadores como: receptor de estrógeno (ER), receptor de progesterona (PGR), p53 e índice de proliferação celular (Ki-67).
-

### *3. Artigo*

**Claudina-3 e Claudina-4, potenciais marcadores de agressividade no  
Carcinoma de Endométrio Tipo I**

## **Claudina-3 e Claudina-4, potenciais marcadores de agressividade no Carcinoma de Endométrio Tipo I**

Ângela Favorito Santarém Tonon<sup>1</sup>; Maria Aparecida Custódio Domingues<sup>2</sup>; Fabíola Encinas Rosa<sup>2</sup>; Solange Perón Bueno Angela<sup>2</sup>; Paulo Traiman<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Ginecologia e Obstetrícia; <sup>2</sup>Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, Brasil.

Endereço de correspondência:

Prof. Dr. Paulo Traiman

Departamento de Ginecologia e Obstetrícia  
Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista,  
Rubião Junior, Botucatu, São Paulo, Brasil.  
CEP 18618-970 – Fone 14 38116227 – FAX: 14 38821933  
e-mail: ptraiman@fmb.unesp.br

---

---

**Summary**

Carcinoma of the Endometrium is a malignant epithelial tumor which affects pre, peri and post-menopausal women. It is classified into two major groups, according to endocrine, metabolic risk factors and morphological differences: Type I (endometrioid) and Type II (non-endometrioid). Type I accounts for 90% of all endometrial carcinomas and its pathogenesis is linked to excessive estrogen exposure. The Type II is less common, with poorly defined predisposing factors. The most important symptom of endometrial carcinoma is postmenopausal bleeding. Diagnosis is achieved through histological evidence, in association with imaging and laboratorial exams. Treatment is primarily surgical. The most important prognostic factor is the presence or absence of metastases in regional lymph nodes. Bio and tissue markers that indicate worse prognosis are the focus of current research. This study examined the immunoexpression of claudin-3 (CLDN3) and claudin-4 (CLDN4) in endometrial carcinomas Type I and Type II, and their relation to proliferative and atrophic endometrium, clinical and pathological features, hormonal status, proliferation index and p53 expression, in an attempt to establish the importance of these proteins in tumor progression and aggressiveness and their prognostic value. Seventy-nine cases of endometrial carcinoma were studied and compared with 74 normal endometria. The immunoexpression of CLDNs 3 and 4, estrogen receptor, progesterone receptor, cell proliferation index (Ki67) and p53 were all evaluated by immunohistochemistry. Observation verified that the pattern of membrane staining for CLDN3 was diffuse in carcinomas compared with normal endometrium which presented a focal pattern. The number of cells stained with CLDN3 was lower in Type I carcinomas, while staining intensity was greater. Analysis verified that 25% of cases with high expression of CLDN4 and Ki-67 developed metastasis, while 33% of cases with greater CLDN4 staining intensity but low expression of Ki-67 showed metastatic evolution. In conclusion, this study demonstrated that the immunoexpression of claudin-3 and claudin-4 (high intensity and diffuse membrane staining) involves the malignant transformation of normal endometrium, is related to poor prognosis of patients with endometrial endometrioid adenocarcinoma and determines advanced staging and distant metastasis. Furthermore, claudin-4 was shown to be an independent marker of metastasis.

**Keywords:** claudin-3, claudin-4, endometrial carcinoma, immunohistochemistry, metastasis.

---



---

## **Introdução**

O Adenocarcinoma de Endométrio (ACE) é a neoplasia epitelial maligna do endométrio, geralmente com diferenciação glandular, com potencial de invadir o miométrio e dar origem a metástases (TAVASSOLI; DEVILEE, 2003). Perfaz 90% das neoplasias malignas do útero (ROSE, 1996). O ACE é considerado um tumor de bom prognóstico, porém tal fato não afasta a existência de casos que evoluam com alta agressividade (GARG; SOSLOW, 2012). Por ser uma neoplasia maligna heterogênea, em 1983, Bokhman propôs uma classificação baseada em diferenças endócrinas, metabólicas e fatores de risco: ACE Tipo I ou Endometrióide (ACEE) e ACE Não Endometrióide ou Tipo II (ACENE) (BRINTON, 2013). Estudos moleculares demonstraram que o ACE Tipo I e Tipo II são entidades distintas e análises de DNA complementar (cDNA) indicaram claramente que possuem perfis gênicos diferentes (ALVAREZ, 2012). Há estudos, que tentam avaliar a importância dos marcadores de receptor de estrógeno, receptor de progesterona, índice de proliferação celular (Ki-67) e p53 no ACE.

O significado da expressão da p53 no ACE é controverso. Alguns estudos concluíram que a expressão da p53 teria um significado prognóstico negativo, independente de qualquer outro dado clínico (GEISLER et al., 1999; POWELL et al., 1999), enquanto outros estudos que utilizaram análise multivariada não confirmaram tal informação (ATHANASSIADOU, 2007; CANLORBE et al., 2013). Porém sabe-se que um pequeno número de ACEE é fortemente positivo para p53, que nos ACENE, sua positividade se correlaciona com padrão seroso, atipias nucleares e formações papilíferas e que, nem sempre a negatividade da expressão da p53, na reação de imunoistoquímica, significa ausência de mutação do gene (SILVERBERG et al., 2011).

No ACE, os estudos de índice de proliferação celular usando marcador Ki-67, não observaram nenhum índice de corte que separe os ACEE do ACENE. Sabe-se que os Carcinomas Serosos tendem a ter índices de proliferação mais altos comparados com os ACEE. Alguns estudos discutem que maior índice de proliferação celular no ACE seria um fator de mau prognóstico independente de dados clínicos (SALVESEN et al., 1999). Outros autores apontam para a idéia que o

---

---

alto índice de proliferação celular se correlaciona com pior prognóstico nos ACEE grau 1 e 2 e não nos Carcinomas Serosos (AL KUSHI et al., 2002). Ki-67 tem sido utilizado nos casos de ACE p53 negativo; quando o índice de proliferação for alto indica o diagnóstico morfológico de Carcinoma Seroso, no contexto clínico e histológico adequado (GARG; SOSLOW, 2012).

Os esteróides hormonais, principalmente o estrogênio, têm um papel importante na patogênese do carcinoma de endométrio. O ACEE grau 1 e 2 geralmente expressa receptor de estrogênio e progesterona, ao contrário do Carcinoma Seroso. No entanto, existem estudos que demonstram que o Carcinoma Seroso pode expressar receptor estrogênico e, menos frequente, receptor de progesterona (GARG; SOSLOW, 2012). No entanto, estes estudos ainda são controversos.

As claudinas (CLDNs) pertencem a uma família de 27 proteínas e compõem as junções estreitas das células epiteliais onde estabelecem a barreira paracelular que controla o fluxo de moléculas no espaço intercelular e, por consequência, regulam a homeostase (NAG; MORIN, 2009). As junções estreitas estão envolvidas na manutenção da polaridade celular, regulação da proliferação, diferenciação e outras funções celulares, devido à sua capacidade de selecionar proteínas sinalizadoras (RUFFER; GERKE, 2004). As CLDNs são moléculas pequenas (20 a 27 Kilodaltons), formadas por quatro domínios transmembrana, com o N-terminal e o C-terminal localizado no citoplasma (NAG; MORIN, 2009). Elas estão expressas numa variedade de tecidos normais, condições hiperplásicas, neoplasias benignas e cânceres de diferenciação epitelial (PAN, 2013). O papel das CLDNs ainda não está bem estabelecido, mas sabe-se que são as principais proteínas das junções intercelulares estreitas. São tecidos específicas e, muitos expressam várias CLDNs que interagem entre si (TURKSEN; TROY, 2004). Durante a aquisição do fenótipo neoplásico pelas células epiteliais ocorre a interrupção da adesão intracelular que é mantida pelas junções aderentes e pelas junções estreitas (RUFFER; GERKE, 2004). Acredita-se que a perda da integridade epitelial seja devido a alterações nos níveis de CLDNs e no consequente rompimento de comunicação paracelular, contribuindo para o aparecimento de espaços que propiciam a mobilidade celular e o aumento de suprimento nutricional para as células neoplásicas (OUBAN et al., 2012).

---

---

O estudo da expressão de vários tipos de CLDNs em cânceres pode ser usado para confirmar a identidade histológica do carcinoma e como marcador de prognóstico (OUBAN; AHMED, 2010). Além disso, verificou-se que CLDN3 e CLDN4 podem funcionar como alvos terapêuticos, uma vez que são receptores análogos para a enterotoxina do *Clostridium perfringens* (CPE), que possui efeitos anti-tumorais (KOMINSKY et al., 2004). CPE se liga a membrana celular e desencadeia a formação de poros, levando à morte celular (WALTHER et al., 2011). As porções extracelulares destas CLDNs também permitem que sirvam diretamente como alvos terapêuticos (KATO-NAKANO et al., 2010; SAEKI et al., 2009). Porém, ainda falta determinar se o aumento ou diminuição das CLDNs levam a um pior ou melhor prognóstico nas neoplasias malignas (RICARDO et al., 2012). Os primeiros estudos relevantes com as CLDNs foram de expressão gênica e definiram um novo subtipo de carcinoma de mama, com baixa expressão de CLDNs, denominado subgrupo molecular CLDN-*low* (HENNESSY et al., 2009; PRAT et al., 2010; TAUBE et al., 2010). Vale ressaltar que, nestes casos, a expressão gênica parece não se correlacionar com os estudos imunoistoquímicos. Ricardo e col. (2012) demonstraram que expressão elevada das CLDNs 3 e 4 se correlaciona com os tumores de mama triplo negativos (estrógeno, progesterona e Her-2 negativos), e com pior evolução clínica; em tais casos, as CLDNs podem futuramente servir como alvos terapêuticos. Porém, este estudo relata que a técnica imunoistoquímica, mesmo ampliado com CLND1 e CLND7, é insuficiente para determinar os carcinomas de mama deste subgrupo molecular CLDN-*low*. Outros cânceres, tais como de ovário (CHOI et al., 2007; HUDSON et al., 2008) tem sido associado a alta expressão de CLDNs 3 e 4, enquanto colon (ERSOZ et al., 2012), esôfago (LEE et al., 2011) e pâncreas (TSUTSUMI et al., 2012) contêm CLDNs diminuídas comparadas ao epitélio normal correspondente. Yéhong Zhu (2006) comprovou que a CLDN4 é essencial na gênese do Carcinoma Seroso do Ovário, estando presente na superfície das células epiteliais desse tumor. Sobel e col. (2006) distinguiu dois subtipos de ACE através das CLDNs 1 e 2; a CLDN 1 estava altamente expressa no Tipo II e, a CLDN2 expressa no Tipo I, confirmando o modelo dualístico de carcinogênese endometrial. Estes estudos indicam que ambas estão altamente expressas em Carcinoma Seroso e de Células Claras e em formas agressivas de ACE com alta recorrência. Santin e col. (2007) estudou o perfil genético do

---

Carcinoma Seroso Papilífero, comparado ao endométrio normal e identificou 139 genes de alta regulação e 390 de baixa regulação. Entre os genes de alta regulação estão os receptores das proteínas de adesão celular com CLDNs 3 e 4. Pan e col. (2007) estudou o papel das CLDNs na tumorigênese endometrial, avaliando-as no endométrio normal (fase proliferativa e secretora), na hiperplasia simples, complexa, atípica e no ACEE e observou baixa expressão no endométrio normal e com hiperplasia típica, o que sugere sua potencial utilidade como marcador diagnóstico e prognóstico.

O presente estudo é o primeiro a verificar a expressão das CLDNs 3 e 4 nos ACEE e ACENE, relacionando-as com endométrio normal proliferativo e atrófico, bem como aspectos clínicos, anatomopatológicos, perfil hormonal, índice de proliferação celular e expressão da p53, na tentativa de estabelecer a importância destas proteínas na progressão e agressividade tumoral e o seu valor prognóstico.

---

---

## **Materiais e Métodos**

Trata-se de um estudo transversal de caráter analítico.

- Seleção dos pacientes
- Critérios de inclusão

Foram selecionadas 79 pacientes com diagnóstico anatomopatológico de adenocarcinoma de endométrio, tratadas e seguidas no setor de Oncologia Ginecológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), UNESP, bem como respectivas amostras parafinadas provenientes do Departamento de Patologia da FMB-UNESP, diagnosticadas no período de 1992 á 2010. Tais amostras foram revisadas por um ginecopatologista (SPBA), para confirmação diagnóstica, e reclassificada conforme a classificação para Adenocarcinomas de Endométrio da OMS, 2003 (TAVASSOLI; DEVILEE, 2003).

Selecionou-se um grupo de 74 pacientes (grupo controle), com idade e fase reprodutiva, pré ou pós-menopausa, muito próximas ao grupo de estudo, com diagnóstico anatomopatológico de prolapso e leiomioma uterino, proveniente do referido hospital, bem como amostras parafinadas do Departamento de Patologia da FMB-UNESP. As amostras parafinadas foram classificadas por um ginecopatologista (SPBA) em padrão atrófico, proliferativo e secretor.

As pacientes selecionadas foram esclarecidas quanto aos objetivos deste estudo, assinando o consentimento livre e esclarecido, exigência da resolução nº 196/outubro/1996 do Conselho Nacional de Saúde. O estudo foi enviado ao Comitê de Ética em Pesquisa da FMB-UNESP e recebeu parecer favorável (nº 262/2009-CEP).

---

## Coleta de Dados

### *Clínicos*

Dos grupos com ACE e controle foram coletados: anamnese, exame físico geral, exame ginecológico, idade da paciente, condição pré ou pós-menopausa. Do grupo com ACE foram registradas por meio de protocolo, as seguintes características: tempo de menopausa (desde a última menstruação); paridade (número de partos a termo); uso de contracepção hormonal; peso; altura; índice de massa corpórea ( $IMC = (\text{peso}/\text{altura})^2$ , onde  $<18.5 \text{ kg/m}^2$  indica abaixo do peso; 18.5 a  $24.9 \text{ kg/m}^2$  indica peso normal; 25 a  $29.9 \text{ kg/m}^2$  indica acima do peso;  $\geq 30.0 \text{ kg/m}^2$  indica obesidade; antecedentes pessoais, como diabetes e hipertensão; tempo de terapia hormonal (TH) e informações quanto a regularidade dos ciclos menstruais.

### *Ultrassonográficos*

Para obtenção do volume uterino ( $\text{cm}^3$ ), foram analisadas as seguintes medidas determinadas pelo ultrassom transvaginal: medidas de diâmetro transversal, anteroposterior e longitudinal. A espessura endometrial (mm) foi avaliada considerando as camadas basais do endométrio em corte sagital do útero. Considerou-se normal a espessura do endométrio  $\leq 4.0\text{mm}$  (ACOG, 2012).

### *Laboratoriais*

O marcador tumoral CA-125 foi quantificado pelo método quimiluminescência, conforme recomendações do fabricante (valor de referência  $<35,0 \text{ U/ml}$ ). Esta quantificação foi realizada no equipamento *Architect i 2000 SR*.

### *Anatomopatológicos*

Todas as pacientes foram diagnosticadas e estadiadas utilizando o critério FIGO (2009) (PECORELLI, 2009). Foram coletados os seguintes dados: tipo histológico, grau histológico, invasão miometrial, citologia peritoneal, e presença de metástase em linfonodos ilíacos.

---

### Seguimento Clínico

Foram levantadas informações sobre: tipo de tratamento complementar realizado (radioterapia, quimioterapia e hormonioterapia); presença ou não de recidiva; metástase à distância; tempo de seguimento; e tempo de sobrevida.

### Elaboração do *Tissue microarrays (TMA)* e estudo imunoistoquímico

Foi confeccionada uma plataforma de TMA contendo amostras representativas (*cores*) de casos com ACE e endométrio atrófico e proliferativo (controle). A elaboração da plataforma foi realizada conforme descrito por Nagai e col. (2007). Inicialmente, foram identificadas regiões de interesse a partir de lâminas coradas com Hematoxilina-Eosina; nas amostras controle, foram selecionadas regiões de tecido endometrial com ausência de lesões e, no grupo ACE foi demarcada região representativa da neoplasia. Em seguida, foram obtidas amostras circulares (1.0 mm de diâmetro) das regiões escolhidas dos blocos parafinados correspondentes, sendo que cada amostra obtida foi disposta em bloco receptor, por meio do aparelho *Tissue Microarrayer (Beecher Instruments® , Silver Spring, USA)*, assumindo espaçamento de 0.2mm entre dois *cores*. Foi elaborado um mapa contendo a localização exata de cada caso. As lâminas originadas de blocos receptores foram imersas em uma camada de parafina e mantidas a -20°C até 24 h antes das reações de imunoistoquímica.

As lâminas foram desparafinizadas em xilol por 5 min. (3 banhos), hidratadas em álcool etílico absoluto (4 banhos) e lavadas com solução salina tamponada (SST) em pH 7,4 por 5 min. Os cortes foram tratados com peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 3% diluído em SST por 10 min., para bloqueio da peroxidase endógena. Foi utilizado o método de recuperação de epítomos pelo calor (SST de citrato, pH 6,0, por 3 min. em panela pressurizada *Trilogy 920P*) à 117°C. Em seguida, os cortes foram incubados por 16 h, em média, com anticorpo para CLDN 3, CLDN 4, receptor de estrógeno, receptor de progesterona, Ki-67 e p53 (**Tabela 1**). Feita incubação *over-night*, após lavagem em SST, os cortes foram incubados com Biotina (Dako) e Streptavidina (HRP) por 30 min. Para visualização da reação, os cortes foram tratados com a solução *Diaminobenzidina Dakocytomation* por 5 min. Os cortes foram contracorados com Hematoxilina de Harris por 20 s. Todos os passos da

reação imunistoquímica foram realizados à temperatura ambiente, com exceção da incubação na panela pressurizada. Entre cada passo da reação, as lâminas foram lavadas várias vezes com SST, pH 7,4. O controle negativo da reação foi realizado utilizando-se as mesmas lâminas, omitindo-se os anticorpos primários

.

---



**Tabela 1.** Anticorpos primários, secundários e metodologia usada no estudo imunoistoquímico

<b>Anticorpo Primário</b>	<b>Clone</b>	<b>Código</b>	<b>Marca</b>	<b>Diluição</b>	<b>Anticorpo Secundário</b>	<b>Recuperação</b>	<b>Cromógeno</b>
RE	SP1	RM9101	Thermo	1:100	Kit HiDef Polímero Cell Marque 454D	Trilogy 920P em Panela Pressurizada 117° C	Kit DAB Cell Marque 957-D
RP	Y85	323R	Cell Marque	1:200	Kit HiDef Polímero Cell Marque 454D	Trilogy 920P em Panela Pressurizada 117° C	Kit DAB Cell Marque 957-D
KI67	SP6	275R	Cell Marque	1:250	Kit HiDef Polímero Cell Marque 454D	Trilogy 920P em Panela Pressurizada 117° C	Kit DAB Cell Marque 957-D
P53	DO-7	453M	Cell Marque	1:150	Kit HiDef Polímero Cell Marque 454D	Trilogy 920P em Panela Pressurizada 117° C	Kit DAB Cell Marque 957-D
CLDN 3	Policlonal	341700	Invitrogen	1:100	Kit HiDef Polímero Cell Marque 454D	Trilogy 920P em Panela Pressurizada 117° C	Kit DAB Cell Marque 957-D
CLDN 4	3E2C1	329400	Invitrogen	1:50	Kit HiDef Polímero Cell Marque 454D	Trilogy 920P em Panela Pressurizada 117°C	Kit DAB Cell Marque 957-D

### Leitura do TMA

Para os receptores de estrógeno e progesterona, foram avaliadas a imunomarcção nuclear, positiva ou negativa, e a porcentagem de núcleos corados em 100 células/core. Para a p53, utilizou-se um score de leitura avaliando-se extensão e intensidade da imunomarcção nuclear: extensão, 0= negativo, 1= até 1/3 do core, 2= até 2/3 do core, e 3= acima de 2/3; intensidade da imunomarcção, 0= negativo, 1= discreta, 2= moderada, e 3= intensa (SANINO; SHOUSA, 1994). O índice de proliferação celular, avaliado pela imunomarcção nuclear do Ki-67, traduziu a porcentagem de núcleos corados em 100 células/core. Como a média do valor para o grupo controle foi muito baixo (0,6%), assumiu-se um *cutoff* de 25%. Para as CLDNs 3 e 4, foi elaborado um score que observou: o padrão da coloração da membrana, 0= negativo, 1= padrão focal, 2= padrão difuso, e 3= padrão difuso em membrana e citoplasma; a porcentagem das células coradas: 0= negativa a 5%, 1= 6% a 30%, 2= 31% a 50%, 3= 51% a 80%, 4= 81% a 100%; a intensidade de marcação: 0= negativa, 1= discreta, 2= moderada, e 3= intensa (PAN, 2009; SANTIN, 2005).

---

**Análise Estatística**

Pelo teste exato de Fisher foram realizadas as associações: entre carcinoma de endométrio e endométrio normal, com a expressão das CLDNs 3 e 4; entre a expressão destas e as variáveis tumorais, indicadoras de prognóstico; e entre as CLDNs e outros marcadores. A relação entre a expressão das CLDNs e sobrevida foi analisada pelo teste de Log Rank. Associações e diferenças foram consideradas significativas se  $P < 0,05$ . As análises foram feitas com os softwares R v 15.0 e R v2.11.0.

---

---

## Resultados

Observou-se que no grupo de 79 pacientes com ACE, a idade variou entre 36 e 80 anos (mediana de 63 anos); no grupo controle, constituído por 74 pacientes, a classificação do padrão do endométrio normal resultou em 19 casos com padrão atrófico, 50 proliferativo e 5 secretor, com idade variando de 36 a 80 anos (mediana de 60 anos). Nos casos ACE, a maioria das pacientes apresentou idade ao diagnóstico acima de 52 anos, menopausa >48 anos, IMC >25, hipertensão, CA125  $\leq 35$ U/mL, espessura endometrial >4 mm; e ausência de diabetes, hiperplasia e câncer de mama (**Tabela 2**). A divisão em ACEE e ACENE resultou 70 e 9 casos respectivamente. Ao comparar tais casos com dados clínicos e anatomopatológicos (**Tabela 2**), não foi observado diferença significativa. Com relação à idade de menarca e volume uterino, embora não significativo, a maioria dos ACENE (67% dos casos) apresentou idade inferior a 13 anos e valores acima de 83cm<sup>3</sup>, respectivamente, comparado aos ACEE. Entre os 10 casos com estadiamento elevado (2A, 3A e 4), somente um era do tipo não endometrióide, o qual apresentava ausência de expressão das CLDNs 3 e 4. Os seis casos que evoluíram para metástase eram todos do tipo endometrióide. A avaliação de linfonodos foi realizada em 26 pacientes com ACEE e em três casos ACENE; sendo que nenhuma paciente apresentou acometimento (dados não apresentados).

---

**Tabela 2.** Características clínico-patológicas das pacientes com câncer de endométrio agrupado em endometrióide (70 casos) e não endometrióide (9 casos).

Variável	Endometrióide n (%)	Não Endometrióide n (%)	p
<b>Idade (anos)</b>			
<52	11 (16)	0 (0)	0.346
≥52	59 (84)	9 (100)	
<b>Menarca (anos)</b>			
<13	32 (46)	6 (67)	0.480
≥13	35 (50)	3 (33)	
ND	3 (4)	0 (0)	
<b>Menopausa (anos)</b>			
<48	19 (27)	2 (22)	1.000
≥48	46 (66)	7 (78)	
ND	5 (7)	0 (0)	
<b>Tempo de menopausa (anos)</b>			
<14	31 (44)	2 (22)	0.283
≥14	35 (50)	7 (78)	
ND	4 (6)	0 (0)	
<b>IMC (Kg/m<sup>2</sup>)</b>			
< 25	14 (20)	0 (0)	0.195
≥ 25	52 (74)	9 (100)	
ND	4 (6)	0 (0)	
<b>Hipertensão</b>			
Sim	47 (67)	5 (56)	0.461
Não	21 (30)	4 (44)	
ND	2 (3)	0 (0)	
<b>Diabetes</b>			
Sim	21 (30)	4 (44)	0.470
Não	45 (64)	5 (56)	
ND	4 (6)	0 (0)	
<b>Hiperplasia</b>			
Sim	5 (7)	0 (0)	1.000
Não	60 (86)	9 (100)	
ND	5 (7)	0 (0)	
<b>Câncer de Mama</b>			
Sim	4 (6)	1 (11)	0.487
Não	61 (87)	8 (89)	
ND	5 (7)	0 (0)	
<b>CA125 (U/mL)</b>			
≤ 35	51 (73)	5 (56)	0.141
> 35	9 (13)	3 (33)	
ND	10 (14)	1 (11)	
<b>Espessura Endometrial (mm)</b>			
≤ 4	5 (7)	1 (11)	0.466
> 4	52 (74)	5 (56)	
ND	13 (19)	3 (33)	
<b>Volume Uterino (cm<sup>3</sup>)</b>			
< 83	32 (46)	3 (33)	0.478
≥ 83	30 (43)	6 (67)	
ND	8 (11)	0 (0)	
<b>Grau de Diferenciação</b>			
1	42 (60)	ND	ND
2	18 (26)	ND	
3	4 (6)	ND	
ND	6 (9)	ND	
<b>Invasão miometrial</b>			
1 <sup>a</sup>	54 (77)	5 (56)	0.220
1B	16 (23)	4 (44)	
ND			
<b>Estadiamento</b>			
1 <sup>a</sup> ,1B,1C	61 (87)	8 (89)	1.000
2 <sup>a</sup> ,3A,4	9 (13)	1 (11)	
<b>Metástase</b>			
Não	59 (84)	9 (100)	1.000
Sim	6 (9)	0 (0)	
ND	5 (7)	0 (0)	

IMC: Índice de Massa Corpórea; ND: não determinado.

Dos 79 casos selecionados com ACE e 74 casos controle, houve uma redução no número de cores nas plataformas de TMA, devido ao deslocamento ou descolamento dos cortes durante o processo técnico de imunohistoquímica; cada plataforma ficou assim representada: receptor de estrogênio, ACE 71 e controle 51; receptor de progesterona, ACE 71 e controle 50; Ki-67, ACE 74 e controle 55; p53, ACE 74 e controle 61; CLDN3, ACE 71 e controle 45; e CLDN4, ACE 74 e controle 54.

O padrão de marcação das CLDNs 3 e 4 foi avaliado de acordo com três critérios: padrão de membrana (focal ou difuso), extensão e intensidade da marcação, analisando-se ACEE e ACENE em relação aos casos controle (endométrio proliferativo e atrófico, respectivamente) (**Fig.1, Tabela 3**). Não houve diferença significativa com relação à extensão e intensidade da expressão das CLDNs 3 e 4 quando comparou-se ACENE e endométrio atrófico. Porém, quando se analisou o padrão de membrana da CLDN3, foi observada a prevalência significativa do padrão de membrana difuso nos ACENE em comparação com o endométrio atrófico (60% versus 0%, respectivamente;  $P=0,035$ ). Da mesma forma, o padrão difuso de marcação da CLDN3, também foi significativamente associado a amostras de câncer do tipo ACEE em comparação com o endométrio proliferativo (45% versus 3%, respectivamente;  $P<0.0001$ ). Ainda considerando os ACEE, a extensão de marcação da CLDN3 foi significativamente maior nas amostras proliferativas comparadas as tumorais (85% versus 43%, respectivamente;  $P<0.001$ ), enquanto a intensidade foi significativamente maior nos carcinomas comparados as amostras proliferativas (44% versus 18%, respectivamente;  $P=0.013$ ). O padrão difuso de marcação da membrana para CLDN4 foi significativamente detectada em ACEE (26% dos casos), enquanto todas as amostras controle apresentaram somente expressão focal de membrana ( $P=0.011$ ). Uma maior extensão da CLDN4 foi significativamente observada nas amostras controle em comparação com ACEE (43% versus 15%, respectivamente;  $P=0.002$ ). Uma tendência a maior intensidade da CLDN4 nos ACEE foi verificada em comparação ao endométrio proliferativo (17% versus 3%, respectivamente;  $P=0.052$ ).

Ao comparar a marcação das CLDNs 3 e 4 entre carcinomas não endometrióides e endometrióides, nenhuma correlação significativa foi observada (**Tabela 3**). Dos ACEE, 34% apresentaram intensidade elevada da marcação da

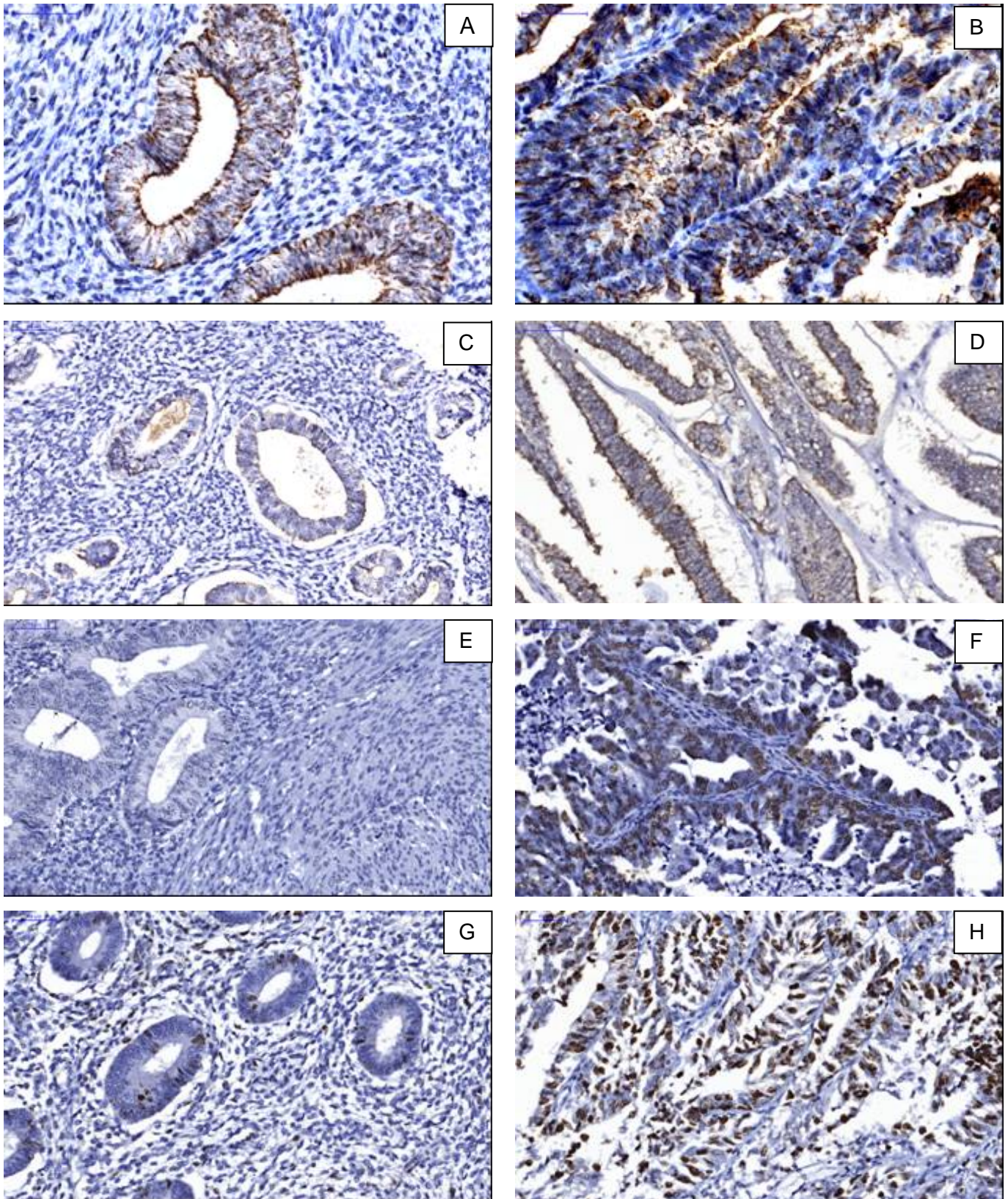
CLDN4, enquanto 100% das amostras ACENE apresentaram expressão negativa ( $P=0.050$ ), indicando uma tendência importante na intensidade da marcação da CLDN4 para ACEE.

**Tabela 3.** Expressão das Claudinas 3 e 4 no endométrio atrófico em comparação com carcinoma não endometrióide; e no endométrio proliferativo em comparação com carcinoma endometrióide.

Marcador	Variável	Normal Atrófico (%)	Carcinoma Não Endometrióide (%)	$P^*$	Normal Proliferativo (%)	Carcinoma Endometrióide (%)	$P^*$
<b>Claudina 3</b>	<b>Membrana**</b>						
	Focal	8 (100)	2 (40)	<b>0.035</b>	29 (97)	23 (55)	<b>&lt;0.0001</b>
	Difusa	0 (0)	3 (60)		1 (3)	19 (45)	
	Negativa	1	3		3	21	
	ND	10	1		17	7	
	<b>Extensão</b>						
	0,1,2	2 (22)	5 (63)	0.153	5 (15)	36 (57)	<b>&lt; 0.001</b>
	3,4	7 (78)	3 (38)		28 (85)	27 (43)	
	ND	10	1		17	7	
	<b>Intensidade</b>						
	0,1,2	2 (22)	3 (38)	0.620	27 (82)	35 (56)	<b>0.013</b>
	3	7 (78)	5 (62)		6 (18)	28 (44)	
ND	10	1	17		7		
<b>Claudina 4</b>	<b>Membrana**</b>						
	Focal	6 (86)	0 (0)	ND	23 (100)	20 (74)	<b>0.011</b>
	Difusa	1 (14)	0 (0)		0 (0)	7 (26)	
	Negativa	7	9		12	38	
	ND	5	0		15	5	
	<b>Extensão</b>						
	0,1,2	10 (71)	9 (100)	0.127	20 (57)	55 (85)	<b>0.002</b>
	3,4	4 (29)	0 (0)		15 (43)	10 (15)	
	ND	5	0		15	5	
	<b>Intensidade</b>						
	0,1,2	11 (79)	9 (100)	0.253	34 (97)	54 (83)	0.052
	3	3 (21)	0 (0)		1 (3)	11 (17)	
ND	5	0	15		5		

ND: não determinado; \*Teste Exato de Fisher; \*\*As análises estatísticas de Padrão de Membrana foram realizadas considerando somente os valores de expressão Focal e Difusa. Em negrito,  $P<0.05$ .





**Fig.1:** A) Endométrio Proliferativo, marcação da CLDN3, focal na membrana, extensão 4 e intensidade 2. B) ACEE, marcação da CLDN3, difusa na membrana, extensão 1 e intensidade 4. C) Endométrio Proliferativo, marcação da CLDN4, focal na membrana, extensão 4 e intensidade 1. D) ACEE, marcação da CLDN4, difusa na membrana, extensão 1 e intensidade 4. E) Endométrio Proliferativo, marcação para p53, negativo. F) ACEE, marcação para p53, positivo. G) Endométrio Proliferativo, índice de proliferação celular (Ki-67) baixo. H) ACEE, índice de proliferação celular (Ki-67) alto. IMH, 400X.



Tendo em vista que a maior representatividade da amostragem foi constituída pelos ACEE, a marcação das CLDNs 3 e 4 foi comparada as características anatomopatológicas e de prognóstico (**Tabela 4**). A marcação da CLDN3 elevada (padrão difuso, baixa extensão e elevada intensidade) foi significativamente associada aos estádios IIA, IIIA e IV ( $P=0.0008$ ). Enquanto a alta intensidade CLDN4 foi significativamente associada à ocorrência de metástase ( $P=0.048$ ).

---

**Tabela 4.** Expressão das Claudinas 3 e 4 em comparação com variáveis anatomo-patológicas e de prognóstico em amostras de câncer de endométrio do tipo endometrióide.

Variável	Membrana		P	Extensão		P	Intensidade		P
	Focal n (%)	Difusa n (%)		0,1,2 n (%)	3,4 n (%)		0,1,2 n (%)	3 n (%)	
<b>CLAUDINA 3</b>									
<b>Grau de Diferenciação</b>									
1	12 (63)	15 (83)	0.269	18 (55)	19 (79)	0.090	18 (56)	19 (76)	0.165
2, 3	7 (37)	3 (17)		15 (45)	5 (21)		14 (44)	6 (24)	
<b>Invasão miometrial</b>									
1 <sup>a</sup>	17 (74)	16 (84)	0.477	28 (78)	21 (78)	1.000	28 (80)	21 (75)	0.763
1B	6 (26)	3 (16)		8 (22)	6 (22)		7 (20)	7 (25)	
<b>Estadiamento</b>									
1A,1B,1C	20 (87)	14 (74)	0.433	34 (94)	21 (78)	0.065	35 (100)	20 (71)	<b>0,0008</b>
2A,3A,4	3 (13)	5 (26)		2 (6)	6 (22)		0 (0)	8 (29)	
ND									
<b>Metástase</b>									
Não	20 (95)	16 (84)	0.331	31 (91)	23 (88)	1.000	31 (94)	23 (85)	0.394
Sim	1 (5)	3 (16)		3 (9)	3 (12)		2 (6)	4 (15)	
<b>CLAUDINA 4</b>									
<b>Grau de Diferenciação</b>									
1	13 (81)	6 (86)	1.000	32 (64)	7 (78)	0.704	31 (63)	8 (80)	0.469
2,3	3 (19)	1 (14)		18 (36)	2 (22)		18 (37)	2 (20)	
<b>Invasão miometrial</b>									
1A	14 (70)	7 (100)	0.155	43 (78)	8 (80)	1.000	40 (74)	11 (100)	0.102
1B	6 (30)	0 (0)		12 (22)	2 (20)		14 (26)	0 (0)	
<b>Estadiamento</b>									
1A,1B,1C	16 (80)	6 (86)	1.000	50 (91)	8 (80)	0.292	48 (89)	10 (91)	1.000
2A,3A,4	4 (20)	1 (14)		5 (9)	2 (20)		6 (11)	1 (9)	
<b>Metástase</b>									
Não	17 (85)	5 (83)	1.000	48 (92)	8 (80)	0.246	49 (94)	7 (70)	<b>0,048</b>
Sim	3 (15)	1 (17)		4 (8)	2 (20)		3 (6)	3 (30)	

Além das CLDNs 3 e 4, este estudo avaliou imunoexpressão dos marcadores: estrógeno (ER), progesterona (PGR), índice de proliferação celular (Ki-67) e p53. Ao comparar a expressão dos mesmos com a sobrevida global (**Tabela 5**), não houve correlação significativa com as CLDNs 3 e 4, nem com os receptores hormonais, ER e PGR. A sobrevida diminuída foi significativamente associada ao índice Ki-67 (>36%;  $P=0.001$ ) e da imunoexpressão da p53, tanto em nível de extensão, como de intensidade ( $P<0.001$  e  $P<0.001$ , respectivamente).

**Tabela 5.** Sobrevida global em função da expressão proteica dos marcadores.

Marcador	N	Óbitos	Sobrevida média (meses)	Erro -padrão	P
<b>ER</b>					
0 a 5%	34	7	96	7	
6 a 20%	12	1	101	7	
39 a 50%	6	1	89	21	0.751
60 a 70%	4	0	---	---	
90 a 100%	5	1	88	17	
<b>PGR</b>					
0%	23	6	80	9	
7 a 25%	10	1	114	1	
35 a 50%	9	0	---	---	0.305
60 a 80%	7	1	99	17	
85 a 100%	11	2	78	6	
<b>Ki67</b>					
0 a 5%	42	4	110	4	
6 a 20%	9	4	61	13	
36 a 50%	3	2	30	10	<b>0.001</b>
60 a 70%	5	0	---	---	
90 a 100%	2	0	---	---	
<b>Claudina-3 - Extensão</b>					
0,1,2	34	6	100	6	0.986
3,4	26	4	98	8	0.872
<b>Claudina-3 - Membrana</b>					
Negativo	20	3	103	8	
Focal	21	4	92	9	
Difusa	18	3	97	9	
Difusa com citoplasma	1	0	---	---	
<b>Claudina-3 - Intensidade</b>					
0,1,2	33	5	104	6	0.407
3	27	5	93	8	
<b>Claudina-4 - Extensão</b>					
0,1,2	52	8	102	5	0.860
3,4	10	2	91	10	
<b>Claudina-4 - Membrana</b>					
Negativo	36	5	106		
Focal	20	4	98		0.650
Difusa	5	1	48		
Difusa com citoplasma	1	0	---		
<b>Claudina-4 - Intensidade</b>					
0,1,2	52	8	103	5	0.745
3	10	2	92	10	
<b>p53 - Extensão</b>					
0,2	58	6	108	4	
3	5	4	43	17	<b>&lt; 0.001</b>
<b>p53 - Intensidade</b>					
0,2	57	6	108	4	<b>&lt; 0.001</b>
3	6	4	52	16	

N=número de pacientes. Em negrito, P<0.05.

Ao comparar a expressão dos marcadores ER, PGR, p53 e índice de proliferação celular com variáveis anatomopatológicas e de prognóstico (**Tabela 6**), o índice de proliferação celular alto (Ki-67 >25%) foi significativamente associado ao estágio elevado ( $P=0,004$ ). Enquanto o índice de proliferação elevado e alta imunoexpressão da p53 (extensão e intensidade) estava significativamente correlacionada com a sobrevida diminuída ( $P<0.001$  e  $P<0.001$ , respectivamente).

A presença de metástase foi significativamente associada ao índice de proliferação celular elevado (Ki-67 > 25%) e marcação da p53 (extensão e intensidade) ( $P=0.005$ ,  $P=0.010$  e  $P=0.016$ , respectivamente; **Tabela 6**). A mesma correlação foi observada para a CLDN 4 ( $P=0.048$ ) (**Tabela 4**).

**Tabela 6.** Valores de  $P$  originados na comparação entre expressão das proteínas ER, PGR, Ki-67 e p53 e variáveis anatomopatológicas e de prognóstico em amostras de câncer de endométrio do tipo endometrióide.

Marcador	Grau de Diferenciação	Tipo de invasão	Estadiamento	Metástase	Sobrevida
ER	0,364	0,642	0,823	0,173	0,731
PGR	0,247	0,487	0,968	0,788	0,305
Ki-67	0,162	0,223	<b>0,043</b>	<b>0,004</b>	<b>0,001</b>
p53 - Extensão	0,081	0,582	0,110	<b>0,005</b>	<b>&lt;0,001</b>
p53 - Intensidade	0,200	0,322	0,155	<b>0,009</b>	<b>&lt;0,001</b>

Em negrito,  $P<0.05$ .

A partir desses resultados, foi estimado o efeito de interação por combinações de dois marcadores, com relação ao desenvolvimento de metástase (**Tabela 7**). Observou-se que existe uma correlação significativa ao desenvolvimento de doença metastática: a intensidade da marcação da CLDN4 e o Ki-67, bem como com a p53; e entre o Ki-67 e a p53. Comparando os intervalos de confiança, há evidências de que a interação estimada, com a maior precisão, foi à interação entre CDLN4 e o Ki-67 elevado. Sendo assim, a associação entre intensidade da CLDN4, Ki-67 elevado e a ocorrência de metástase foi analisada detalhadamente (**Tabela 8**). Esta análise verificou que 25% dos casos com elevada expressão da CLDN4 (intensidade) e Ki-67 alto desenvolveram metástase; enquanto, 33% dos casos com alta intensidade

da CLDN4, mas baixa expressão do Ki-67, também apresentou evolução metastática.

**Tabela 7.** Interação entre a expressão dos marcadores claudina-4, Ki-67 e p53 por modelo de regressão logística.

Interações	$\beta$	EP	P	OR	IC95%
Ki-67 x CL4 (intensidade)	0,66	0,31	<b>0,038</b>	1,93	(1,03 – 3,62)
Ki-67 x p53 (extensão)	3,62	1,31	<b>0,006</b>	37,56	(2,83 – 494,43)
Ki-67 x p53 (intensidade)	3,60	1,29	<b>0,005</b>	37,46	(2,80 – 494,53)
p53 (extensão) x CL4 (intensidade)	*	*	*	*	*
p53 (Intensidade) x CL4 (intensidade)	3,29	1,33	<b>0,013</b>	27,00	(1,99 – 365,88)

$\beta$ : ; EP: ; OR: Odds Ratio; IC: Intervalo de Confiança. \*Impossibilidade de cálculo. Em negrito,  $P < 0.05$ .

**Tabela 8.** Ocorrência de metástase em função das expressões de Ki-67 e Claudina 4.

Expressão do Ki-67	Intensidade da Claudina 4	Metástase+/Total de Casos (%)
De 20% a 100%	3	1/4 (25%)
	0, 1 ou 2	0/3 (0%)
0 a 20%	3	2/6 (33%)
	0, 1 ou 2	3/47 (6%)

---

## Discussão

O ACE é uma neoplasia maligna que se destaca por sua heterogeneidade de causas, padrão morfológico, alterações moleculares e evolução clínica. Prova disso se faz na divisão em Tipo I e Tipo II, que nem sempre responde informações necessárias, visto que, apesar de considerar o Tipo I uma neoplasia menos agressiva, não consegue caracterizar os casos que evoluem para metástase e recidiva precoce (BOKHMAN, 1983; ALVAREZ, 2012).

Neste estudo, o padrão de imunexpressão das CLDN3 e CLDN4 (OUBAN, 2012) foi caracterizado nos casos de ACEE e ACENE, comparado com grupo controle, e correlacionado com marcadores previamente descritos na literatura e que se mostraram controversos, até a atualidade, na determinação de agressividade desta neoplasia (AL KUSHI, 2002; ATHANASSIADOU, 2007; GEISLER, 2009). Uma revisão detalhada da literatura indica que este é o primeiro relato de uma correlação significativa entre o aumento da intensidade da CLDN4 e a presença de metástase à distância no ACE Tipo I ( $P=0,033$ ). Este achado parece definir um subgrupo de ACEE, cuja estratégia terapêutica pode ser determinante. Nos carcinomas, o passo inicial da disseminação metastática é a separação das células epiteliais, desfazendo a barreira feita pelas junções estreitas em que as CLDNs são os principais componentes (KONECNY, 2008). Lin e col. (2013) correlacionaram o aumento da CLDN4 com a baixa regulação da E-caderina, clássica molécula de adesão, e migração de células neoplásicas que ultrapassariam a barreira epitélio-mesênquima, facilitando o processo de metástase.

Outra observação do estudo atual, foi a importância do padrão de distribuição das proteínas CLDNs 3 e 4 na membrana celular: nas amostras de endométrio normal houve a predominância do padrão focal, enquanto que nos casos de ACEE predominou o padrão difuso (CLDN3 45% e CLDN4 26%). Estes dados complementam os de Pan e col. (2007), que ao avaliar amostras de câncer endometrial para as mesmas CLDNs, observaram uma distribuição ao longo da membrana celular e ausência de marcação intracelular. Nosso estudo foi além, ao demonstrar que, por serem componentes das junções estreitas, as CLDNs estudadas se distribuem de maneira focal no tecido normal e, muda seu padrão de

---

---

distribuição no ACE (difuso na membrana) (Figura 1). Isto demonstra que o padrão de distribuição das CLDNs na membrana celular pode representar um importante aspecto morfológico tanto para o diagnóstico, como para o mecanismo da carcinogênese.

Associado a este achado, observou-se que o grupo de câncer endometrióide apresentou intensidade elevada e extensão diminuída das CLDNs 3 e 4 em comparação com endométrio normal proliferativo. Estes resultados estão em concordância com a literatura recente. Pan e col. (2007) observou o aumento significativo da intensidade das CLDNs 3 e 4 conforme progressão de endométrio normal para neoplásico; enquanto Sobel e col. (2006) detectaram uma extensão menor em carcinomas endometrióides comparado com tecido normal proliferativo. Juntos, estes achados sugerem que na progressão do tecido normal para carcinoma, o padrão de expressão das CLDNs 3 e 4 torna-se difuso na membrana; aumenta a intensidade da marcação no tecido e diminui a sua extensão. Estudos com técnicas moleculares demonstram que as CLDNs 3 e 4 apresentam aumento da expressão em diferentes tecidos neoplásicos, embasando os achados deste estudo imunoistoquímico (SOBEL et al, 2006; D'SOUZA et al, 2005), entretanto, o exato papel dessas CLDNs ainda não foi totalmente esclarecido (KONECNY, 2008). Na tentativa de explicar este comportamento molecular, D'Souza e col. (2005) utilizaram uma linhagem celular de câncer de ovário contendo mutação (T192D) no gene da CLDN3. Sabe-se que a CLDN3 é fosforilada no resíduo de treonina 192 via PKA, uma quinase frequentemente ativa em câncer ovariano, e que esta fosforilação leva ao aumento de expressão da CLDN3. A presença desta mutação leva a uma mimetização da forma fosforilada da CLDN3. Os autores relataram que o aumento da expressão da CLDN mutada em comparação com a selvagem (sem mutação) levou a uma interferência na formação das junções e a um aumento na permeabilidade celular, mas não elucidaram o exato mecanismo que leva a diminuição das junções. Somente Lin e col. (2013), tendem a explicar este mecanismo ao propor a interferência das CLDN3 e CLDN4 na diminuição da E-caderina e aumento da N-caderina. Outra teoria supõe que a expressão da CLDN mutada leva a um padrão de expressão muito mais difuso nas junções intercelulares comparado a CLDN selvagem, sugerindo que a fosforilação possa diminuir a habilidade das CLDNs em participar na formação das junções (D'SOUZA et al,

---

---

2005). Por análise de microscopia eletrônica, Pan e col. (2007) observaram a ruptura das junções estreitas em tecidos que apresentaram maior expressão das CLDNs 3 e 4, demonstrando forte correlação entre a degeneração dessas junções e a elevada expressão das CLDNs, de forma a contribuir para a transformação maligna do endométrio normal.

Quando estudamos a intensidade da CLDN3 como marcador prognóstico, encontramos significativamente aumentada nas pacientes com ACEE em estádios mais avançados ( $P=0,008$ ). Pan e col. (2007) demonstraram apenas uma tendência ao aumento dos níveis da CLDN3 com estágio mais elevado e alto grau histológico nos ACE.

Observando agora a CLDN4 como marcador prognóstico, verificamos uma correlação significativa entre o aumento da intensidade da CLDN4 e a presença de metástase à distância ( $P=0,033$ ), um achado ainda inédito, visto que Pan e col. (2007) encontraram, no ACEE, correlação significativa apenas com invasão miometrial. Konecny e col. (2008) confirmaram altas expressões das CLDNs 3 e 4 no ACENE em 137 pacientes e observaram altas expressões dessas proteínas em doença mais avançada, alto grau nuclear e curta sobrevida. Embora o mecanismo de ação das CLDNs 3 e 4 não esteja totalmente esclarecido, tem sido sugerido a importância das mesmas no tratamento do câncer de endométrio (PAN et al., 2013). Kominsky e col, (2004) ao estudar as CLDNs 3 e 4 como receptores epiteliais da enterotoxina do *Clostridium perfringens* (CPE) observaram que estas são capazes de mediar a ligação à enterotoxina com consequente citólise. Quando CPEs se associam as CLDNs 3 e 4 podem levar a lise de células alvo, especificamente aquelas com alta expressão dessas proteínas. Este mecanismo acontece devido ao aumento na permeabilidade da membrana através da formação de poros, resultando em um desequilíbrio osmótico e consequente morte celular (McCLANE, 1996; WALTHER et al., 2011). Portanto, a terapia mediada por CPE pode se tornar potencialmente efetiva no tratamento de carcinomas de endométrio com alta expressão das CLDNs 3 e 4, principalmente nas pacientes que não se beneficiam de tratamento convencional, como por exemplo, pacientes obesas, hipertensas e com muitas comorbidades, as quais estaria contraindicado o tratamento cirúrgico padrão (SANTIN et al., 2005; PAN et al., 2007). Além disso, foi demonstrado por Pan e col. (2013) que camundongos com neoplasias endometriais tratados com o

---



---

quimioterápico Cisplatina apresentaram diminuição na expressão da CLDN4 associada à redução no tamanho do tumor. O mesmo não aconteceu para os camundongos tratados com Paclitaxel. A correlação entre a expressão e a mudança no tamanho do tumor devido à quimioterapia sugere o papel da CLDN4 como um marcador para a atividade de agentes quimioterápicos em câncer de endométrio.

Ao estudarmos a correlação das CLDNs 3 e 4 com índice de proliferação celular (Ki-67), p53, receptores de estrógeno, receptores de progesterona, traçamos um perfil de pacientes de alto risco de metástase e pior prognóstico. Nossos resultados mostraram índice de proliferação celular alto (Ki-67>25%) e aumento da imunoexpressão da p53 associados com curta sobrevida ( $P=0,001$  e  $P=0,004$ ) e presença de metástase ( $P=0,005$  e  $P=0,016$ ). Ao correlacionarmos estes resultados com a intensidade da CLDN4, visto que esta mostrou associação com metástase, encontramos uma correlação significativa de maior precisão entre CLDN4, Ki-67 e metástase, de tal forma que: 25% dos casos com elevada expressão da CLDN4 (intensidade) e Ki-67 alto desenvolveram metástase; enquanto, 33% dos casos com alta intensidade da CLDN4, mas baixa expressão do Ki-67, também apresentou evolução metastática. Esta observação aponta a alta intensidade da CLDN4 como marcador independente de agressividade. Em nossa revisão da literatura, não encontramos estudos que tenham relatado tais achados. Assim, podemos sugerir que, pacientes com ACEE e intensidade alta de marcação da CLDN4, devem ser acompanhadas com mais critério.

Em conclusão, este estudo demonstrou que a imunoexpressão aumentada das claudina-3 e claudina-4 (intensidade alta e padrão difuso de marcação de membrana) envolve a transformação maligna do endométrio normal, e estão relacionadas com prognóstico desfavorável das pacientes com Adenocarcinoma de Endométrio Endometrióide, determinando estágio avançado e metástase à distância. Além disso, a claudina-4 se mostrou um marcador independente de agressividade. Dessa forma, no Adenocarcinoma de Endométrio Endometrióide, sugerimos a existência de um subgrupo mais agressivo claudina-4 positivo que requer acompanhamento clínico mais criterioso e aponta para uma possibilidade de terapia adjuvante específica.

---

---

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ACOG: Practice Bulletin nº 128 : Diagnosis of Abnormal uterine bleeding in reproductive – Aged Human. **Obstet Gynecol** , p. 120:197, 2012.

ACOG: Practice Bulletin nº XX: Tamoxifen and Endometrial Cancer. **Committee Opinion 232**; Washington DC, 2000.

ALVAREZ, T. Molecular Profile of Grade 3 Endometrioid Endometrial Carcinoma: Is it a Type I or Type II Endometrial Carcinoma? **American Journal of Surgical Pathology**, v. 36, n. 5, p. 753-761, May 2012.

AL KUSHI, A. et al. Markers of proliferative activity are predictors of patient outcome for low grade endometrioid adenocarcinoma but not papillary serous carcinoma of endometrium. **Modern Pathology**, v.15, n. 4, p. 365–371, 2002.

ATHANASSIADOU, P. et al. The prognostic value of PTEN, p53, and beta-catenin in endometrial carcinoma: a prospective immunocytochemical study. **International Journal of Gynecological Cancer** , v. 17, p. 697–704, 2007.

BRINTON, L. A. et al. Etiologic heterogeneity in endometrial cancer: Evidence from a Gynecologic Oncology Group trial. **Gynecologic Oncology**, v. 129, p. 277-284, 2013.

BOKHMAN, J. V. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. **Gynecologic Oncology**, v. 15, p. 10–7, 1983.

CANLORBE, G. et al. Contribution of immunohistochemical profile in assessing histological grade of endometrial cancer. **Anticancer Research.**, v. 33, n. 5, p. 2191-2198, 2013.

CHOI, Y.L., et al. Expression profile of tight junction protein claudin 3 and claudin 4 in ovarian serous adenocarcinoma with prognostic correlation. **Histology and histopathology**, v. 22, p. 1185–1195, 2007.

---

---

D'SOUZA, T. et al. Phosphorylation of claudin-3 at threonine 192 by cAMP-dependent protein kinase regulates tight junction barrier function in ovarian cancer cells. **J Biol Chem**, v. 280, p. 26233-26240, 2005.

ERSOZ, S. et al. Prognostic importance of claudin-1 and claudin-4 expression in colon carcinomas. **Pathology, research and practice**, v. 207, n. 5, p. 285–289, May 2011.

GARG, K.; SOSLOW, S. A. Strategies for Distinguishing Low-grade Endometrioid Serous Carcinomas of Endometrium. **Advances in anatomic pathology**, v. 19, n. 1, p. 1-10, Jan. 2012.

GEISLER, J. P. et al. p53 expression as a prognostic indicator of 5-year survival in endometrial cancer. **Gynecologic Oncology**, v. 74, p. 468–477, 1999.

HENNESSY, B. T. et al. Characterization of a naturally occurring breast cancer subset enriched in epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell characteristics. **Cancer research** v. 69, n. 10, p. 4116-4124, May 2009.

HUDSON, L. G. et al. Phenotypic plasticity of neoplastic ovarian epithelium: unique cadherin profiles in tumor progression. **Clinical & Experimental Metastasis**, v. 25, n. 6, p. 643–655, 2008.

KATO-NAKANO, M. et al. Characterization and evaluation of the antitumor activity of a dual-targeting monoclonal antibody against claudin-3 and claudin-4. **Anticancer Research**. v. 30, p. 4555-4562, 2010.

KOMINSKY, S. L. et al. *Clostridium perfringens* enterotoxin elicits rapid and specific cytolysis of breast carcinoma cells mediated through tight junction proteins claudin 3 and 4. **American Journal Pathology**, v. 164, p. 1627-1633, 2004.

KONECNY, G.E. et al. Claudin-3 and claudin-4 expression in serous papillary, clear cell, and endometrioid endometrial cancer. **Gynecol Oncol.**, vol. 109, n. 2, p. 263-269, 2008.

---

---

LEE, K. W. et al. Twist1 causes the transcriptional repression of claudin-4 with prognostic significance in esophageal cancer. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 423, n.3, p. 454–460, 2012.

LIN, X. et al. Regulation of the epithelial-mesenchymal-transition by claudin-3 and claudin-4. **PLOS One**, v.8, n.6, p. 1-13, 2013.

McCLANE, B.A. An overview of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Toxicon*, v.34, p. 1335-1343, 1996.

NAG, L. M; MORIN, P.J. The claudins. **Genome Biology**, v. 10, p. 235.1-235.7, 2009.

NAGAI, M. A. et al. Down regulation PHDLA1 gene expression is associated with breast cancer progression. **Breast Can Res Treat**, v. 106, n.1, p.49-56, 2007.

OUBAN, A. et al.. Claudin-1 expression in squamous cell carcinomas of different organs: comparative study of cancerous tissues and normal controls. **International journal of surgical pathology**, v. 20, n. 2, p.132-138, Apr. 2012.

OUBAN, A.; AHMED, A. A. Claudins in human cancer: a review. **Histology and Histopathology**. v. 25, n. 1, p. 83-90, 2010.

PAN, X.. Overexpression of claudin-4 may be involved in endometrial tumorigenesis. **Oncology Letters**, v. 5, n. 4, p. 1422-1426, 2013.

PAN, X. Y. Expression of claudin-3 and claudin-4 in normal, hyperplastic and malignant endometrial tissue. **International Journal of Gynecological Cancer**, v. 17, n. 1 233-241, Jan./Fev. 2007.

PAN, X. Y. et al. Altered expression of claudin-3 and claudin-4 in ectopic endometrium of women with endometriosis. **Fertil and Steril**, v.9, n. 5, p. 1692-1698, 2009.

---

---

PARK, J. Y. Poor prognosis of uterine serous carcinoma compared with grade 3 endometrioid carcinoma in early stage patients. **Virchows Archiv**, v. 462, n. 3 p. 289–296, 2013.

PECORELLI, S. Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, and endometrium. **International journal of gynaecology and obstetrics**, v. 105, n. 2, p. 103–104, 2009.

POWELL, B. et al. p53 protein overexpression s a prognostic indicator of poor survival in stage I endometrial carcinoma. **International journal of oncology**, v.14, n. 1, p.175–179, 1999.

PRAT, A. et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 12, n. 5, p. 1-18, 2010.

ROSE, P. G. Endometrial Carcinoma. **New Engl Med**, v. 335, n. 9, p. 640-649, 1996.

RICARDO, S. et al. Claudin expression in breast cancer: High or low, what to expect? **Histology Histopathology**, v. 27, p. 1283-1295, 2012.

RÜFFER, C.; GERKE, V. The C-terminal cytoplasmic tail of claudins 1 and 5 but not its PDZ-binding motif is required for apical localization at epithelial and endothelial tight junctions. **European Journal of Cell Biology**, v. 83, n. 4, p. 135-134, 2004.

SANINO, P.; SHOUSHA, S. Demonstration of oestrogen receptors in paraffin wax sections of breast carcinoma using the monoclonal antibody 1D5 and microwave oven processing. **J Clin Pathol**, v.47, p. 90-92, 1994.

SAEKI, R. et al. A novel tumor-targeted therapy using a claudin-4-targeting molecule. **Molecular Pharmacol**, v. 76, p. 918-926, 2009.

SALVESEN, H. B. et al. Prognostic significance of angiogenesis and Ki-67, p53, and p21 expression: a population-based endometrial carcinoma study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 17, n. 5, p. 1382-1390, 1999.

---

---

SANTIN, A. D. et al. Overexpression of claudin-3 and claudin-4 receptors in uterine serous papillary carcinoma: novel targets for a type-specific therapy using Clostridium perfringens enterotoxin (CPE). **Cancer**, v. 109, n. 7, p. 1312-1322, 2007.

SANTIN, A. D. et al. Gene expression fingerprint of uterine serous papillary carcinoma: identification of novel molecular markers for uterine serous cancer diagnosis and therapy. **British Journ of Cancer**, v. 92, p.1561-1573, 2005.

SILVERBERG, S. G. et al. Epithelial tumours and related lesions. In: TAVASSOLI, F. A.; DEVILEE, P. **Pathology and Genetics Tumours of the Breast and Female Genital Organs: WHO Classification of Tumors**. 3rd ed. Lyon: IARC, 2003. Cap. 4, p. 221-232.

SOBEL, G. et al. Claudin 1 differentiates endometrioid and serous papillary endometrial adenocarcinoma. **Gynecologic Oncology**, v.103, n. 2, p.591-598, 2006.

TAUBE, J. H. Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.**, v. 107, n. 35, p. 1544-1545, 2010.

TAVASSOLI, F. A.; DEVILEE, P. **Pathology and Genetics Tumours of the Breast and Female Genital Organs: WHO Classification of Tumors**. 3rd ed. Lyon: IARC, p. 432, 2003.

TSUTSUMI, K. et al. Claudin-4 expression predicts survival in pancreatic ductal adenocarcinoma. **Annals of Surgical Oncology**, v. 19 (Suppl 3), p. S491–S499, 2012.

TURKSEN, K.; TROY, T. C. Barriers built on claudins. **Journal of Cell Science**, v. 117, p. 2435-2447, 2004.

---

WALTHER, W. et al. Novel Clostridium perfringens enterotoxin suicide gene therapy for selective treatment of claudin-3- and -4-overexpressing tumors. **Gene therapy**. v. 19, n. 5, p. 494-503, 2011.

ZHU, Y. et al. Differences in expression patterns of the tight junction proteins, claudin 1, 3, 4 and 5, in human ovarian surface epithelium as compared to epithelia in inclusion cysts and epithelial ovarian tumours. **International Journal of Cancer**, v. 118, n. 8, p. 1884-1891, Apr. 2006.

---

## *4. Conclusões*



- A imunexpressão da claudina-3 e claudina-4 no Adenocarcinoma de Endométrio apresentou-se difusa na membrana, aumento da intensidade e diminuição da extensão quando comparado ao endométrio normal;
  - No adenocarcinoma endometrióide houve correlação da intensidade aumentada da claudina-3 com estágio avançado da doença;
  - No adenocarcinoma endometrióide houve correlação da intensidade aumentada da claudina-4 com metástase à distância;
  - No adenocarcinoma endometrióide houve correlação da intensidade aumentada da claudina-4 com o índice de proliferação celular elevado (Ki67);
  - No adenocarcinoma endometrióide houve correlação da intensidade aumentada da claudina-4 com a marcação positiva da p53;
  - No adenocarcinoma endometrióide a claudina-4 se mostrou um marcador independente na avaliação de agressividade, constatada pela correlação de maior precisão em metástase desta com Ki-67;
  - No adenocarcinoma endometrióide a expressão aumentada da claudina-3 e claudina-4 não mostrou correlação significativa com a sobrevida.
-



*Anexas*

**Anexo 1. Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa**

**Universidade Estadual Paulista  
Faculdade de Medicina de Botucatu**



Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.  
CEP: 18.618-970  
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143  
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br  
e-mail coordenadoria: tsarden@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde  
em 30 de abril de 1997

Botucatu, 06 de julho de 2.009

OF. 262/2009-CEP

Ilustríssimo Senhor  
Prof. Dr. Paulo Traiman  
Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da  
Faculdade de Medicina de Botucatu.

Prezado Prof. Traiman,

De ordem do Senhor Coordenador deste CEP, informo que o Projeto: (Protocolo CEP 3261-2009) "Estudo anatomoclínico da expressão das Claudinas 3 e 4 no adenocarcinoma de endométrio e sua correlação com receptores de estrogênio, progesterona, P53 e Ki-67", a ser conduzido pela Dr<sup>a</sup> Ângela Favorito Santarém Tonon, orientada por Vossa Senhoria recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião do CEP de 06/07/09.

Situação do Projeto: APROVADO. Ao final da execução deste Projeto, apresentar ao CEP "Relatório Final de Atividades".

Atenciosamente,

Alberto Santos Capelluppi  
Secretário do CEP.

**Anexo 2. Protocolo da pesquisa**

Numero: Prontuário:  
Idade (anos): Paridade (gest. De termo)  
Menarca (anos):  
Ciclos menstruais:  
Tempo de contracepção hormonal (anos):  
Idade menopausa (anos): Tempo de menopausa (anos):  
Tipo de TPH:  
Tempo de TPH:

Peso: Altura: IMC:  
Hipertensão: Diabetes:  
Hiperplasia:  
Ca de Mama:  
Ca 125:  
US: Eco endometrial: Volume uterino:  
Tipo Histológico:  
Invasão do miométrio:  
Citologia peritonial:  
Linfonodos ilíacos:  
Estadiamento cirúrgico:  
Tempo de sobrevida:  
Recidiva (anos):  
Mestastáse à distância: