

AGNALDO LOPES DA SILVA FILHO

**EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS p53, Ki-67 E CD31 NO
TUMOR E NAS MARGENS VAGINAIS APÓS
HISTERECTOMIA RADICAL EM PACIENTES COM
CARCINOMA INVASOR DO COLO UTERINO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia – área de
Ginecologia, Faculdade de Medicina de Botucatu –
UNESP, para obtenção do Título de Doutor

Orientador: Professor Paulo Traiman
Co-orientador: Professor José Renan da Cunha Melo

BOTUCATU - SP

2004

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Silva Filho, Agnaldo Lopes da.

Expressão das proteínas p53, Ki-67 e CD31 no tumor e nas margens
vaginais após histerectomia radical em pacientes com carcinoma invasor do
colo uterino / Agnaldo Lopes da Silva Filho. – 2004.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina
de Botucatu, 2004.

Orientador: Paulo Traiman

Co-orientador: José Renan da Cunha Melo

Assunto CAPES: 40101150

1. Colo uterino - Câncer

CDD 616.99466

Palavras-chave: Câncer do colo uterino; Tratamento cirúrgico; p53; Ki-67;
CD31; MIB-1

DEDICATÓRIAS

edico esta tese...

Aos meus pais, Agnaldo e Maria Thereza, pela dedicação,
amor e incentivo ao longo de minha vida

À minha esposa Rívia, pelo amor, carinho e compreensão

Às minhas irmãs, Cláudia, Cristina, Letícia e Patrícia, pela
amizade e carinho sempre presentes

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Sou profundamente grato ao Professor Paulo
Traiman, que me ofereceu essa oportunidade
de trabalhar sob a sua orientação

Ao Professor José Renan da Cunha Melo, pelos
ensinamentos que ampliaram meus horizontes
na pesquisa científica

AGRADECIMENTOS

Um agradecimento especial ao Professor Sérgio Augusto Triginelli, que me transmitiu os fundamentos da Cirurgia Pélvica.

Aos colegas Maurício Bechara Noviello, Admário Silva Santos Filho, Eduardo Batista Cândido e Lucas Barbosa da Silva, pelo apoio, amizade e possibilidade de uma convivência diária bem-humorada e descontraída.

Ao Professor Aroldo Fernando Camargos, grande responsável pela troca das salas de politraumatizados pelos caminhos da ginecologia.

Ao Professor Fernando Marcos dos Reis, pela disponibilidade, paciência e auxílio na análise estatística dos resultados.

Aos Professores do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Laurival Antônio De Luca, Gilberto Uemura, Jorge Nahás Neto, Anaglória Pontes e Eliana Aguiar Petri Nahás, que me receberam com cortesia e amizade.

Aos Professores do Departamento de Patologia da UFMG, Dairton Miranda e Moisés Salgado Pedrosa, pela avaliação das peças cirúrgicas e preparo das amostras teciduais.

Aos Professores e médicos do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Carlos Eduardo Bacchi, Eliana Souto de Abreu e Ricardo Macarenco, meu agradecimento pelo estudo imunohistoquímico. Tal colaboração foi essencial para realização desta tese.

A Cristiane Abe, secretária de Pós-Graduação em Ginecologia e Obstetrícia, pela sua disponibilidade e ajuda.

Este estudo recebeu apoio do CNPq, FAPESP e CAPES

“Se você procurar bem, você acaba encontrando.

Não a explicação (duvidosa) da vida,

Mas a poesia (inexplicável) da vida.”

Carlos Drummond da Andrade

ÍNDICE

Siglas
Glossário
Resumo

1. Introdução	1
1.1. Proteína p53	2
1.2. Proliferação celular	6
1.3. Angiogênese	7
1.4. Carcinoma invasor do colo uterino	9
2. Objetivos	13
2.1. Objetivo geral	13
2.2. Objetivos específicos	13
3. Casuística e Métodos	16
3.1. Casuística	16
3.1.1. Critérios de inclusão	16
3.1.2. Critérios de exclusão	17
3.2. Métodos	18
3.2.1. Técnica cirúrgica	18
3.2.2. Coleta de amostras teciduais	18
3.2.3. Avaliação anatomopatológica	21
3.2.4. Avaliação das proteínas p53, Ki-67 e CD31	23
3.3. Análise estatística	35
4. Resultados	37
4.1. Características da amostra	37
4.2. Avaliação das proteínas p53, Ki-67 e CD31 no colo uterino e tumor	39
4.3. Avaliação das proteínas p53, Ki-67 e CD31 nas margens vaginais	49
5. Discussão	57
5.1. Metodologia	57
5.2. Expressão das proteínas p53, Ki-67 e CDD-31 no tumor como fatores prognósticos	60
5.3. Expressão das proteínas p53, Ki-67 e CDD-31 nas margens vaginais como marcadores de doença residual	63
5.4. Considerações finais	66
6. Conclusões	69
7. Referências bibliográficas	72
8. Anexos	88
I. Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa da UFMG (COEP)	88
II. Consentimento livre e esclarecido	89
III. Estadiamento do carcinoma de colo uterino (FIGO 1994)	92
IV. Descrição cirúrgica da histerectomia radical	93
9. Summary	95

SIGLAS

CCE	Carcinoma de células escamosas
CDKs	Quinases dependentes de ciclina
cm	Centímetro
COEP	Comitê de Ética e Pesquisa
Complexo ABC	Técnica Avidina-biotina-peroxidase
DAB	3,3' diaminobenzidina
DNA	Ácido desoxirribonucléico
FIGO	Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
GADD-45	<i>Growth Arrest DNA Damage</i>
H₂O₂	Água oxigenada
HE	Hematoxilina e eosina
HPV	Papiloma vírus humano
IgG	Imunoglobulina G
IHQ	Imunohistoquímica
kd	Kilodalton
MDM-2	Gene <i>mouse double minute 2</i>
min	Minuto
µm	Micrômetro
MVA	Margem vaginal anterior
MVP	Margem vaginal posterior
NIC	Neoplasia intra-epitelial cervical
NIVA	Neoplasia intra-epitelial vaginal
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
SST	Solução salina tamponada
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

GLOSSÁRIO

Apoptose Morte celular programada

bax Proto ou oncogene, que codifica proteína de 19 kd

bcl-2 Poto ou oncogene, que codifica proteína de 26 kd

BNH9 Anticorpo monoclonal utilizado na avaliação da angiogênese. Reage com células endoteliais e com os antígenos de grupo sanguíneo H e Y

CD31 Também conhecido como molécula de adesão endotelial-plaquetária 1 (PECAM-1). É uma glicoproteína de 130 kd, expressa pelo endotélio, megacariócitos, plaquetas, e por outros elementos hematopoiéticos

CD34 Glicoproteína de membrana de 110 kd, localizada em células endoteliais

c-myc Protoncogene ou oncogene, que codifica proteína de 62 kd

E6 Região 6 *early* (precocce) do genoma do Papiloma vírus humano

E7 Região 7 *early* (precocce) do genoma do Papiloma vírus humano

Fator VIII Fator de von Willebrand, utilizado como marcador de células endoteliais na avaliação da angiogênese

Ki-67 Proteína não histônica utilizada como marcador de proliferação celular, presente em todos os estágios do ciclo celular, exceto na fase G0

MIB-1 Anticorpo monoclonal de camundongo, que reage com o antígeno nuclear Ki-67

Microarray Experimento bioquímico, automatizado, que produz grandes quantidades de dados sobre expressão gênica

p16 Gene inibidor de CDK, que codifica proteína de 16 kd

p53 Gene supressor de tumor, que codifica proteína de 53 kd

Rb Gene supressor de tumor, que codifica proteína de 110 kd

RESUMO

RESUMO

Introdução: O processo de carcinogênese implica a aquisição de alelos mutantes de genes supressores de tumor, aumento na proliferação celular e necessidade de angiogênese. Este estudo analisa a expressão das proteínas p53, Ki-67 e CD31 no tumor e nas margens vaginais após histerectomia radical em pacientes com carcinoma invasor do colo uterino.

Métodos: Foram estudadas amostras de tumor ou de colo uterino normal e de margem vaginal anterior e posterior obtidas de 30 pacientes submetidas à histerectomia radical para carcinoma de células escamosas (CCE) do colo uterino estágio IB (FIGO) e 30 pacientes submetidas à histerectomia vaginal para tratamento de miomas uterinos (grupo controle). O material foi fixado em formol, incluído em parafina e processado para marcação imunohistoquímica para as proteínas p53, Ki-67 e CD31.

Resultados: A idade das pacientes variou de 27 a 73 anos ($48,7 \pm 10,4$ anos). A expressão das proteínas p53, Ki-67 e CD31 foi maior no tumor que no colo uterino normal. As margens vaginais de histerectomia radical, de pacientes com CCE invasor do colo uterino, histologicamente negativas, apresentam uma maior expressão dessas proteínas em comparação às margens vaginais de pacientes com colo uterino normal. A expressão tumoral da proteína CD31 se correlacionou com a presença de invasão linfocelular, tamanho tumoral e metástases para os linfonodos

pélvicos, mas não com o grau de diferenciação e acometimento parametrial. Não foi observada uma associação da expressão das proteínas p53 e Ki-67 no tumor com os achados anatomopatológicos estudados. A expressão desses marcadores nas regiões proximal e distal das margens vaginais, após histerectomia radical, não mostrou diferença significativa.

Conclusões: A expressão das proteínas p53, Ki-67 e CD31 é maior no tumor e nas margens vaginais de pacientes com CCE invasor do colo uterino em comparação com o colo uterino normal e margens vaginais das pacientes do grupo controle. A expressão da proteína CD31 no tumor correlaciona-se com a presença de invasão linfocascular, tamanho tumoral e metástases para os linfonodos pélvicos.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A multiplicação celular é um processo cuidadosamente regulado nas células normais⁽¹⁾. Em algumas situações esse controle falha e as células começam a crescer e dividir, sem responder à regulação, constituindo um clone de células com a capacidade de se expandir indefinidamente, formando os tumores⁽²⁾.

O desenvolvimento do câncer em humanos envolve uma complexa sucessão de eventos regulada por padrões genéticos e bioquímicos preestabelecidos^(1,2). As alterações genéticas em uma célula cancerosa não são herdadas por meio de gametas, mas constituem mudanças no ácido desoxirribonucléico (DNA) das células somáticas. Assim, alteração do DNA está no centro da indução do câncer⁽²⁾. As células neoplásicas demonstram algumas características biológicas, como evasão da apoptose, resistência aos fatores inibidores de crescimento, emissão de seus próprios sinais mitogênicos, perda da diferenciação, aquisição de neovascularização e, no caso de tumores mais avançados, capacidade de invasão e metastatização⁽²⁻⁵⁾. Uma outra característica importante é a instabilidade genética proporcionando um aumento nas mutações⁽⁶⁾.

O processo de carcinogênese implica, dentre outros fatores, a aquisição de alelos mutantes de genes supressores de tumor,

aumento na proliferação celular e necessidade de angiogênese para o crescimento tumoral⁽⁵⁾. Em decorrência dessas alterações, funções celulares que, normalmente, estariam sob controle, passam a ser exercidas de maneira desordenada, resultando na expressão exagerada de algumas proteínas responsáveis pela proliferação celular^(1,2,5). Entre essas proteínas encontram-se a p53, cuja função é controlar o ciclo celular, a proteína Ki-67, utilizada como marcador de proliferação celular; e a CD31, que permite a avaliação da angiogênese. Como os tumores têm efeitos devastadores sobre o funcionamento orgânico e sobre a vida dos hospedeiros, muita pesquisa tem sido direcionada às alterações fisiológicas e genéticas que transformam uma célula naturalmente regulada em outra que não responde aos mecanismos regulatórios.

1.1. Proteína p53

Os genes supressores de tumor são genes que codificam proteínas capazes de regular o crescimento celular⁽⁷⁾. Apresentam como característica a perda de função na ocorrência de deleção de um dos alelos, o que é denominado de perda de heterozigose⁽⁷⁾.

O gene p53, inicialmente descrito em 1979, foi o primeiro gene supressor de tumor identificado⁽⁸⁾. Em virtude de sua importância na carcinogênese humana, é considerado o "guardião do genoma"⁽⁹⁾. Esse gene codifica uma fosfoproteína nuclear de 53 kilodaltons (kd), chamada

p53, a qual desempenha um papel importante no controle do ciclo celular, no reparo do DNA e na indução da apoptose.

A perda de função do gene p53 é o evento genético mais freqüentemente descrito em cânceres humanos^(8,9). As mutações do gene p53 ocorrem em cerca de metade das neoplasias malignas⁽¹⁰⁾. A inativação da proteína p53 ocorre por mutações no gene, por interação da proteína p53 com proteínas virais e por interação da proteína p53 com outras proteínas reguladoras do ciclo celular, como a MDM-2⁽⁸⁾. Essa perda de função leva ao aumento da proliferação, à instabilidade genômica e à falha de importantes mecanismos de controle do ciclo celular⁽⁹⁾.

No caso de lesão no DNA por agentes físicos, tais como radiação ultravioleta, raios gama, produtos químicos mutagênicos ou infecções virais, o gene p53 é ativado, levando à transcrição da proteína p53. O acúmulo dessa proteína no núcleo da célula inibe o ciclo mitótico no início da fase G1 e ativa a transcrição de genes de reparo do DNA, impedindo, dessa forma, a propagação do erro genético para as células filhas. Caso não se efetue o reparo do DNA de forma satisfatória, a proteína p53 induz a apoptose^(2,10,11).

No início do ciclo mitótico, o gene p53 ativa o gene p21, induzindo a síntese da proteína p21, cuja função é inibir a ação das quinases dependentes de ciclina (CDKs), fazendo com que as células parem na fase G1 do ciclo celular, até que se complete o reparo do DNA.

Para tanto, a proteína p53 ativa o gene *Growth Arrest DNA Damage* (GADD-45), que atua corrigindo a lesão no DNA. Quando o reparo do DNA é finalizado, a proteína p53 é degradada pela ação da proteína MDM-2, produto do gene *mouse double minute 2* (mdm-2). Não ocorrendo restauração do DNA, o gene p53 sinaliza para outros genes reguladores, como bax, bcl-2 e c-myc, e induz a apoptose, eliminando, assim, a célula com a informação genética avariada. O gene p53 promove, também, um ponto de verificação de S para G2, que depende da integridade do domínio C-terminal do gene^(10,12-15).

Esse sistema de funcionamento do gene p53 está geralmente inativado, tornando-se ativo apenas quando as células sofrem alguma agressão⁽⁸⁾. Dessa forma, a proteína p53 é encontrada em quantidades mínimas nas células em condições normais⁽¹⁰⁾. A proteína p53 na forma selvagem tem meia-vida curta, de seis a vinte minutos, sendo dificilmente detectada por imunohistoquímica (IHQ)⁽¹⁶⁾. As mutações no gene p53 resultam em uma expressão proteica de meia-vida prolongada e acúmulo da proteína mutante, em níveis detectáveis pela IHQ⁽¹⁶⁾.

As oncoproteínas E6 e E7 do Papiloma Vírus Humano (HPV) de alto risco desregulam a proliferação celular⁽⁴⁾. A oncoproteína E6 é capaz de ligar-se à proteína p53, através da proteína E6AP, formando o complexo p53-E6AP-E6, que é rapidamente inativado por intermédio da via proteolítica dependente da ubiquitina. Em

consequência, não ocorre parada do ciclo para o reparo do DNA e o ciclo celular prossegue com o genoma do HPV integrado ao do hospedeiro^(4,10) (Figura 1-1). Apesar de controverso na literatura, parece haver uma associação do gene p53, assim como da proteína p53, com a neoplasia intra-epitelial cervical (NIC) e o carcinoma invasor do colo uterino⁽¹⁷⁾.

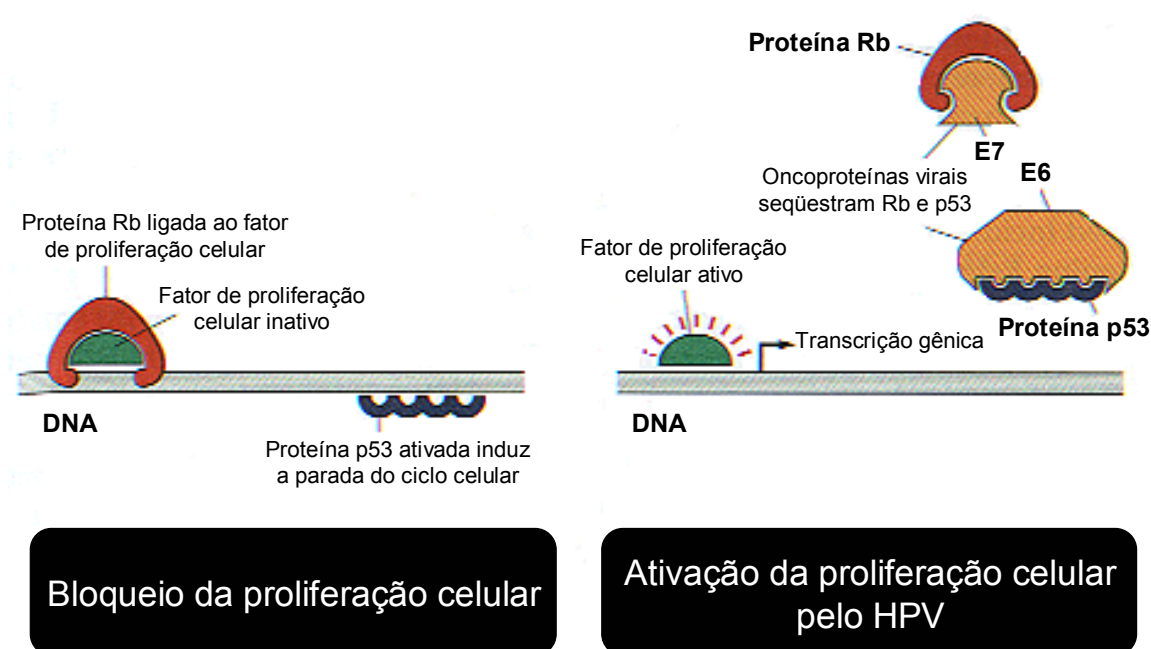


Figura 1-1 - Representação esquemática da ativação da proliferação celular pelas oncoproteínas virais E6 e E7. A oncoproteína E7 se liga à proteína celular supressora de tumor Rb (retinoblastoma) e a inativa. A oncoproteína E6 se liga ao p53, promovendo a sua degradação e comprometendo a interrupção do ciclo celular na presença de um dano no DNA

Adaptado: Alberts B, et al.⁽¹⁰⁾, 2002. p.1347

1.2. Proliferação celular

O controle da divisão celular é um evento crítico para o funcionamento normal das células⁽²⁾. Os processos reguladores da carcinogênese interferem diretamente ou indiretamente na proliferação celular^(1,5).

O ciclo celular inicia-se com a ligação de fatores de crescimento a receptores de membrana, os quais ativam proteínas transdutoras de sinais. Uma vez que esses sinais chegam ao núcleo, são ativados fatores de regulação nuclear, que iniciam a transcrição do DNA e conseqüente divisão celular. O ciclo celular desenvolve-se em quatro etapas, denominadas de fases G1 (*gap* ou lacuna), S (síntese), G2 e M (mitose).

Na fase G1, com aproximadamente oito horas, a célula acumula no citoplasma os materiais necessários para o desdobramento do DNA. Em seguida, há uma pausa denominada ponto R ou primeira parada, na qual haverá uma verificação do DNA antes da progressão do ciclo. Se houver alguma anormalidade na informação genética, ela deverá ser reparada durante esta parada. Caso contrário, a célula não poderá prosseguir seu ciclo. Na fase S, com duração aproximada de oito horas, ocorre a replicação do DNA. Na etapa seguinte, fase G2, que dura quatro horas, há o armazenamento dos materiais necessários para a mitose. Por último, ocorre a fase M, com duração de uma e meia a duas horas, em

que há a duplicação da célula. Nos tecidos cujas células se reproduzem muito raramente, como a fibra muscular, ou que nunca se dividem, como os neurônios do tecido nervoso, o ciclo celular é interrompido em G1 em um ponto específico denominado G0^(2,10,11).

As células em proliferação expressam em seus núcleos uma proteína não-histônica de meia-vida curta, chamada Ki-67. Essa proteína está presente em todos os estágios do ciclo celular, exceto na fase G0⁽¹⁶⁾.

O MIB-1 é um anticorpo monoclonal de camundongo que reage com o antígeno nuclear Ki-67. Vários tumores têm sido estudados com esse marcador, sendo evidenciada uma correlação positiva dele com o grau de diferenciação histológica e a sobrevida dos pacientes⁽¹⁸⁻²³⁾. A infecção por HPV 16 e 18 está associada a um aumento na proliferação celular tanto em pacientes com NIC quanto no carcinoma invasor do colo uterino⁽²⁴⁾.

1.3. Angiogênese

Angiogênese é a formação de novos vasos sanguíneos a partir da proliferação de uma rede vascular pré-existente⁽²⁵⁾. As células dos mamíferos necessitam de oxigênio e nutrientes para sobreviverem. Por esse motivo, localizam-se a uma distância de 100 a 200 µm dos

vasos sanguíneos, que constitui o limite para difusão do oxigênio. O crescimento acima desse limite implica a necessidade de recrutamento de novos vasos sanguíneos⁽²⁶⁻²⁸⁾. Os tumores sólidos requerem angiogênese para o seu crescimento, invasão e disseminação metastática⁽²⁹⁾. Esse processo é causado por um desequilíbrio no balanço entre fatores promotores e inibidores da angiogênese^(26,30).

A angiogênese desempenha um importante papel na progressão tumoral e sobrevida das pacientes com câncer ginecológico, sendo descrita como um indicador prognóstico²⁵. Sua detecção é feita por IHQ com um marcador de células endoteliais, como o fator VIII, CD31 e CD34⁽²⁹⁾. A expressão das proteínas E6 e E7, em células escamosas de camundongos transgênicos, foram implicadas em uma resposta angiogênica precoce e na indução da expressão do *vascular endothelial growth factor* (VEGF) em tecidos tumorais^(31,32). As células do carcinoma do colo uterino que expressam o genoma do HPV 16 apresentam uma maior resposta angiogênica, propiciando o crescimento tumoral e invasão dos tecidos vizinhos⁽³³⁾. A densidade microvascular está significativamente aumentada na NIC e no carcinoma invasor do colo uterino quando comparada ao epitélio normal⁽³⁴⁻³⁷⁾.

1.4. Carcinoma invasor do colo uterino

O carcinoma de colo uterino representa um grande problema de saúde pública mundial, com incidência anual de 471.000 casos e 233.000 mortes⁽³⁸⁾. A maior parte dos casos ocorre nos países em desenvolvimento devido à precariedade dos programas de rastreamento⁽³⁹⁾. Ao contrário do que ocorre nos países mais desenvolvidos, a taxa de mortalidade por câncer de colo uterino continua moderadamente alta no Brasil e aumentou 33,1% no período de 1979 a 2000⁽⁴⁰⁾. O Ministério da Saúde estima que, em 2003, no Brasil, ocorreram 16.480 casos novos e 4.110 óbitos por esse motivo⁽⁴⁰⁾.

O HPV exerce um papel central na carcinogênese do colo uterino, relacionando-se tanto à NIC quanto ao carcinoma invasor⁽⁴¹⁾. Outros fatores relacionam-se com o vírus, de forma a potencializar sua ação na célula hospedeira e a facilitar o desenvolvimento dos processos de imortalização e carcinogênese^(42,43).

O tratamento proposto para o carcinoma invasor do colo uterino, nos estádios IB e IIA pela Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO), pode ser cirúrgico, pela histerectomia radical com linfadenectomia pélvica, pela radioterapia primária ou quimioirradiação⁽³⁹⁾. Essas opções terapêuticas apresentam taxas similares de sobrevida em cinco anos, variando de 87 a 92%⁽⁴⁴⁾. Uma das vantagens do tratamento

cirúrgico é o exame histopatológico da peça cirúrgica, importante na indicação de terapia adjuvante e no estabelecimento do prognóstico⁽³⁹⁾.

A histerectomia radical consiste na remoção do útero e do tecido peritumoral, constituído pelo paramétrio, paracolpos e margens vaginais. Essa é a base do tratamento cirúrgico para o câncer do colo uterino nos estádios IA2 a IIA⁽⁴⁵⁾. Existem poucos relatos sobre a extensão da ressecção de vagina necessária para que o controle local da doença seja eficaz. Além disso, não há, até o momento, nenhum método efetivo de avaliação desse limite de ressecção vaginal.

No período de 1907 a 1935, a cirurgia de Wertheim, associada à remoção de toda a vagina, apresentava uma mortalidade per-operatória de 14,3% e uma sobrevida livre de doença em cinco anos de 39%⁽⁴⁶⁾. O termo histerectomia radical é genérico e inadequado para descrever a extensão do procedimento realizado⁽⁴⁷⁾. Piver *et al.* (1974) descreveram cinco classes de histerectomias que se diferem no local das ligaduras nas artérias uterinas e vesicais superiores, na dissecação ureteral, e na extensão da ressecção parametrial e vaginal⁽⁴⁷⁾. A ressecção vaginal é variável, podendo ser retirado apenas o seu terço superior (Piver II), metade superior (Piver III) ou 3/4 superiores (Piver IV).

O prognóstico da paciente com câncer de colo uterino depende de vários fatores, dentre eles, a idade, o estadiamento, o volume tumoral, o tipo histológico, a invasão do corpo uterino, a profundidade da

invasão estromal, o grau de diferenciação, a invasão linfovascular e a presença de metástases linfonodais^(2,39,44). Pacientes com margens vaginais de histerectomia radical livres de tumor inferiores a 0,5 cm apresentam um pior prognóstico, maior taxa de recorrência tumoral e menor sobrevida em cinco anos⁽⁴⁸⁾.

A recorrência do carcinoma invasor do colo uterino após o tratamento cirúrgico é de 10 a 20%. Cerca de 35% das recorrências localizam-se na região central da pelve e 58% delas apresentam acometimento vaginal⁽⁴⁹⁻⁵³⁾. A importância da infiltração vaginal pelo tumor na ocorrência das recidivas e no prognóstico das pacientes com carcinoma invasor do colo uterino é controversa^(48,54,55).

Um melhor conhecimento do comportamento desse carcinoma pode ter importantes implicações clínicas. A identificação de marcadores prognósticos no tumor e de doença residual nas margens vaginais propiciaria um tratamento mais adequado e um melhor seguimento das pacientes. Por atuarem em importantes etapas da carcinogênese, é possível que as proteínas p53, Ki-67 e CD31 possam ser utilizadas como marcadores biológicos no câncer de colo. Esse estudo visa analisar a expressão proteica de p53, Ki-67 e CD31 no tumor e nas margens vaginais após histerectomia radical em pacientes com carcinoma de células escamosas (CCE) invasor do colo uterino.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a expressão das proteínas p53, Ki-67 e CD31 no tumor e nas margens vaginais após histerectomia radical em pacientes com CCE invasor do colo uterino.

2.2. Objetivos específicos

- Comparar a expressão das proteínas p53, Ki-67 e CD31 no CCE invasor do colo uterino, de pacientes submetidas à histerectomia radical, e no colo uterino normal, de pacientes operadas por mioma uterino.
- Avaliar a associação da expressão das proteínas p53, Ki-67 e CD31 no tumor com o grau de diferenciação, com a presença de invasão linfovascular, com o tamanho tumoral, com o acometimento parametrial e com a presença de metástases em linfonodos pélvicos nas pacientes com CCE invasor do colo uterino.
- Comparar a expressão das proteínas p53, Ki-67 e CD31 nas margens vaginais, após histerectomia radical de pacientes com CCE invasor do colo uterino, e nas margens vaginais de pacientes com colo uterino normal, submetidas à histerectomia vaginal.

- Comparar a expressão das proteínas p53, Ki-67 e CD31 na região proximal com a distal das margens vaginais, após histerectomia radical em pacientes com CCE invasor do colo uterino.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. Casuística

O estudo foi realizado prospectivamente em 60 mulheres atendidas no ambulatório Carlos Chagas, do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), no período de novembro/2001 a setembro/2002. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa (COEP) do Hospital das Clínicas da UFMG (parecer número 135/02 – Anexo I).

As pacientes foram divididas em dois grupos:

- Grupo 1 (controle): 30 pacientes submetidas à histerectomia vaginal, para tratamento de mioma uterino (grupo controle).
- Grupo 2 (casos): 30 pacientes submetidas à histerectomia radical, para tratamento de CCE invasor do colo uterino.

3.1.1. Critérios de inclusão

Grupo 1

- Pacientes com miomas uterinos, com indicação de histerectomia vaginal, avaliadas previamente por colposcopia e citologia oncológica, sem evidências de NIC ou neoplasia invasora do colo uterino.

- Ausência de sinais sugestivos de processos infecciosos agudos no colo uterino.
- Termo de consentimento livre e esclarecido da paciente, de acordo com a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (Anexo II).

Grupo 2

- Pacientes com diagnóstico de CCE estágio IB (FIGO) do colo uterino, com indicação de histerectomia radical.
- Termo de consentimento livre e esclarecido da paciente, de acordo com a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (Anexo II).

3.1.2. Critérios de exclusão

Grupo 1

- Exame anátomo-patológico da peça cirúrgica de histerectomia vaginal, mostrando evidências de lesões pré-malignas ou malignas no útero (colo e corpo uterino).
- Não concordância da paciente em participar do estudo.

Grupo 2

- Pacientes submetidas à radioterapia e/ou quimioterapia previamente à cirurgia.
- Achados operatórios que contra-indiquem a realização da histerectomia radical, tais como: metástases em linfonodos para-aórticos, invasão parametrial, de reto ou bexiga.

- Não concordância da paciente em participar do estudo.

O estadiamento do câncer de colo foi realizado de acordo com as recomendações da FIGO, por meio de exame pélvico bimanual no pré-operatório imediato logo após a anestesia^(56,57) (Anexo III).

3.2. Métodos

3.2.1. Técnica Cirúrgica

As pacientes com câncer de colo uterino foram submetidas à laparotomia mediana, inventário da cavidade peritoneal, linfadenectomia pélvica e histerectomia radical, conforme a técnica de Piver III⁽⁴⁷⁾ (Anexo IV). As pacientes com miomas uterinos foram submetidas à histerectomia vaginal pela técnica de Heaney modificada⁽⁵⁸⁾.

3.2.2. Coleta das amostras teciduais

Grupo 1

- Colo uterino: fragmento com 1,0 x 1,0 cm de colo uterino, na junção escamo-colunar da peça cirúrgica de histerectomia vaginal.
- Vagina: dois fragmentos longitudinais de vagina com 2,0 cm de comprimento x 0,5 cm de largura, até a transição cérvico-vaginal, durante a histerectomia vaginal, após a retirada do útero. Um dos fragmentos era da parede vaginal anterior (12 horas em relação ao colo) (Figura 3-1 A) e outro da parede vaginal posterior (6 horas em

relação ao colo). Síntese do local da biópsia, seguida de síntese da cúpula vaginal. A porção vaginal mais distal ao colo uterino era marcada por meio de um ponto cirúrgico.

Grupo 2

- Tumor: fragmento com 1,0 x 1,0 cm do tumor, preferencialmente na sua periferia, da peça cirúrgica de histerectomia radical.
- Vagina: dois fragmentos longitudinais de vagina com 2,0 cm de comprimento x 1 cm de largura, até a transição cérvico-vaginal, da peça cirúrgica de histerectomia radical. Um dos fragmentos era da margem vaginal anterior (MVA) (12 horas em relação ao colo) e outro da margem vaginal posterior (MVP) (6 horas em relação ao colo) (Figura 3-1 B). A porção vaginal mais distal ao colo uterino era marcada por meio de um ponto cirúrgico.

As amostras teciduais foram fixadas imediatamente com formaldeído a 10%. A porção mais distal ao colo do fragmento vaginal, anteriormente identificada por intermédio de um ponto cirúrgico, foi marcada com tinta nanquim. O material foi identificado numericamente de acordo com o protocolo. O patologista desconhecia se as amostras vaginais eram de casos ou controles, o que constituía, portanto, um estudo cego.

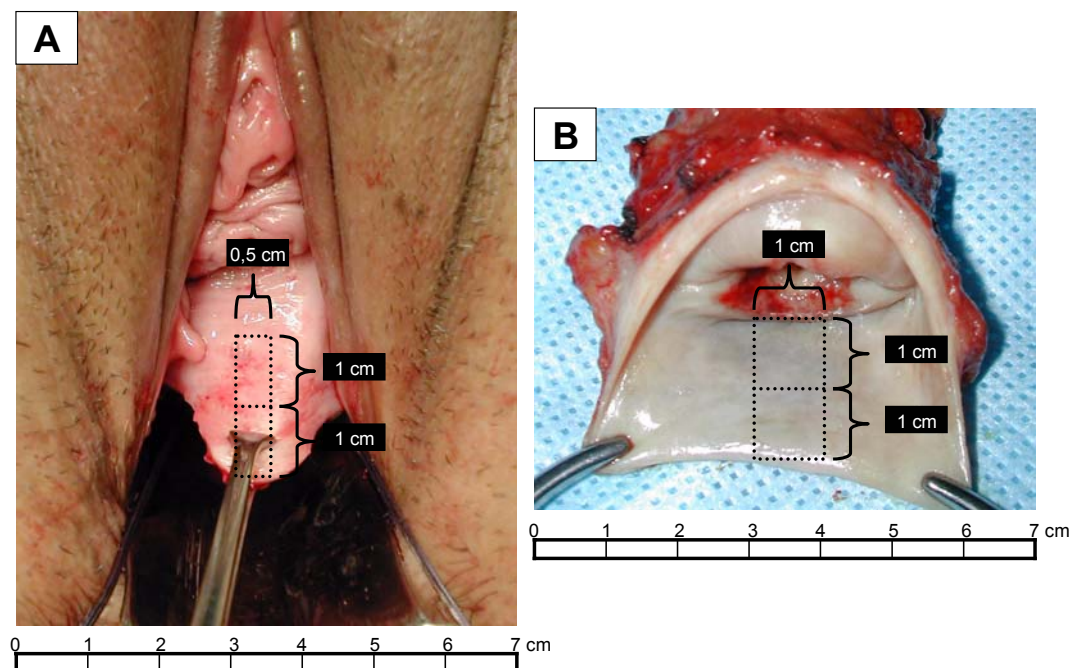


Figura 3-1 - A - Tempo cirúrgico de histerectomia vaginal em paciente com mioma uterino, mostrando, em tracejado, o local de coleta da amostra de tecido na parede vaginal anterior

B - Peça cirúrgica de histerectomia radical para tratamento do carcinoma invasor do colo uterino, mostrando, em tracejado, o local de coleta da amostra de tecido na margem vaginal posterior

As amostras fixadas em formaldeído foram desidratadas em etanol em concentrações crescentes, variando de 70% a 99% (60 min cada); depois imersas em xilol (2 x 60 min) e em parafina 60° (idem); e incluídas em blocos de parafina.

3.2.3. Avaliação anatomopatológica

O estudo histológico foi realizado pela técnica de hematoxilina e eosina (HE), procedendo-se à classificação do tumor de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS)⁽⁵⁹⁾. Nas amostras de tumor, foram analisados o grau de diferenciação tumoral e a presença de invasão linfovascular. Nas amostras vaginais foi avaliada a presença de carcinoma invasor ou neoplasia intra-epitelial vaginal (NIVA). O tamanho do tumor foi estimado na peça cirúrgica de histerectomia radical, assim como o acometimento parametrial e a presença de metástases para os linfonodos pélvicos (Figura 3-2).

Tais variáveis foram analisadas de acordo com os seguintes critérios:

- Tamanho tumoral: foi avaliado por meio de medição com régua milimetrada. Considerou-se a medida da maior dimensão, com valor expresso em centímetros.
- Invasão linfovascular: caracterizada pela presença de células tumorais compactas, associadas ou não a linfócitos, no espaço luminal recoberto por células endoteliais achatadas (invasão linfática)

e/ou a presença de células tumorais associadas a hemácias no lúmen de vasos sanguíneos (invasão vascular).

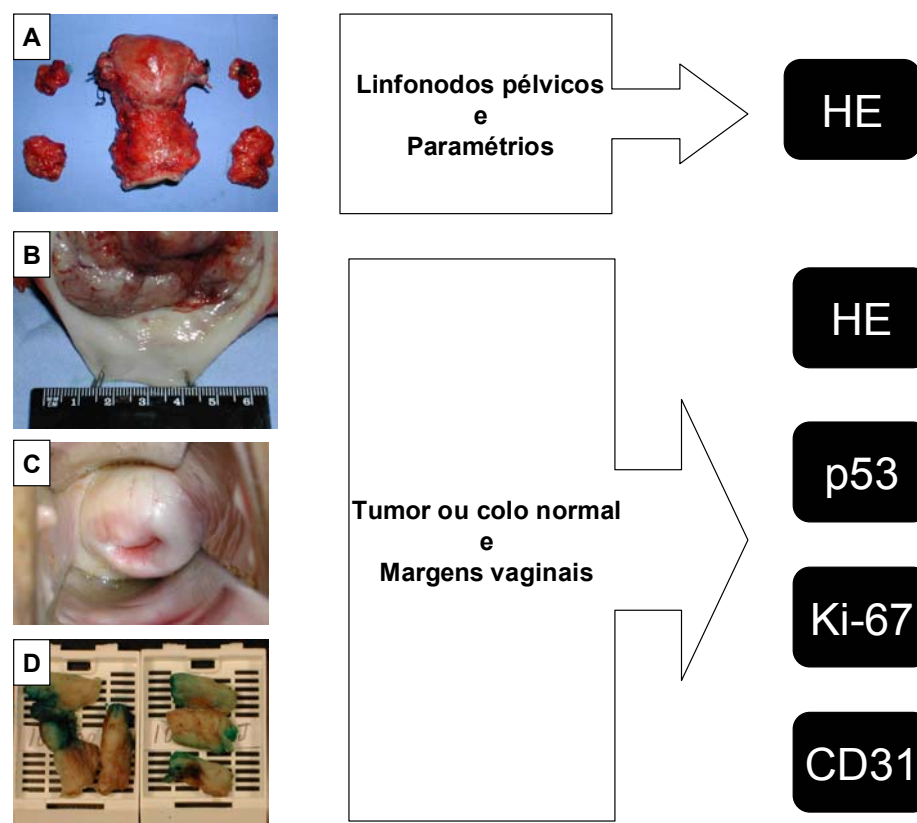


Figura 3-2 - Representação esquemática das amostras teciduais avaliadas. Os linfonodos pélvicos e paramétrios foram estudados pela técnica de hematoxilina e eosina (HE). O tumor (pacientes com carcinoma invasor do colo uterino) ou colo normal (grupo controle) e as margens vaginais foram estudadas pela HE e por imunohistoquímica para avaliação das proteínas p53, Ki-67 e CD31

Nota: HE: Hematoxilina e eosina. A - Peça cirúrgica de histerectomia radical evidenciando o útero e os linfonodos pélvicos. B - Peça cirúrgica de histerectomia radical evidenciando o tumor. C - Colo uterino normal em paciente com mioma uterino sendo submetida à histerectomia vaginal. D - Amostras de margens vaginais com marcação da porção distal ao colo com tinta nanquim, após fixação em formaldeído, fragmentada em cassetes previamente à parafinação e emblocamento

- Grau de diferenciação: a determinação do grau de diferenciação histológica foi baseado no Sistema de Broders(60,61). De acordo com a quantidade de queratina celular, grau de atipia celular e atividade mitótica, o tumor foi classificado em: bem diferenciado (G1), moderadamente diferenciado (G2) ou mal diferenciado (G3).
- Acometimento parametrial: foi avaliado nas lâminas do exame histopatológico, coradas pela HE. Definido pela extensão direta do tumor primário para o paramétrio.
- Metástase linfonodal: avaliado nas lâminas do exame histopatológico, coradas pela HE. Definido pela presença de células do tumor primário nos linfonodos pélvicos.

3.2.4. Avaliação das proteínas p53, Ki-67 e CD31

A expressão da proteína p53, o índice de proliferação celular (Ki-67) e a angiogênese (CD31) foram avaliados em cortes histológicos pela técnica de IHQ nas amostras de tumor ou colo uterino e nas margens vaginais (Figura 3-2). Os anticorpos monoclonais empregados foram o anti-p53 contra a proteína p53, o MIB-1 contra antígeno nuclear presente em fase de proliferação, e o anti-CD31 contra células endoteliais.

3.2.4.1. Técnica da Avidina-Biotina-Peroxidase

A técnica da Avidina-Biotina-Peroxidase é também conhecida por Complexo Avidina-Biotina (ABC) e é fundamentada na grande afinidade da avidina (uma glicoproteína de alto peso molecular) com a biotina (uma vitamina que pode ser conjugada a enzimas, anticorpos e substâncias fluorescentes) (Figura 3-3). O tecido é incubado com um anticorpo primário (mono ou policlonal) específico para a proteína em estudo. Em seguida, aplica-se um anticorpo secundário (que tem o anticorpo primário como alvo) previamente ligado a uma molécula de biotina. A avidina atua como amplificador de efeito, pois cada molécula de avidina que se acopla à biotina do anticorpo secundário liga-se simultaneamente a três outras moléculas de biotina conjugadas à peroxidase. A peroxidase atua sobre um corante especial e os sítios antigênicos ficam corados de forma estável, geralmente em tonalidade castanha.

Cortes histológicos seriados de cada caso, com espessura de 4 a 5 μm , foram obtidos em número suficiente para os anticorpos utilizados. Os cortes histológicos foram depositados sobre lâminas cobertas com adesivo poli-L-lisina (Sigma Chemical Company, St Louis, Missouri, EUA), e aquecidas a 60°C, por pelo menos 12 horas.

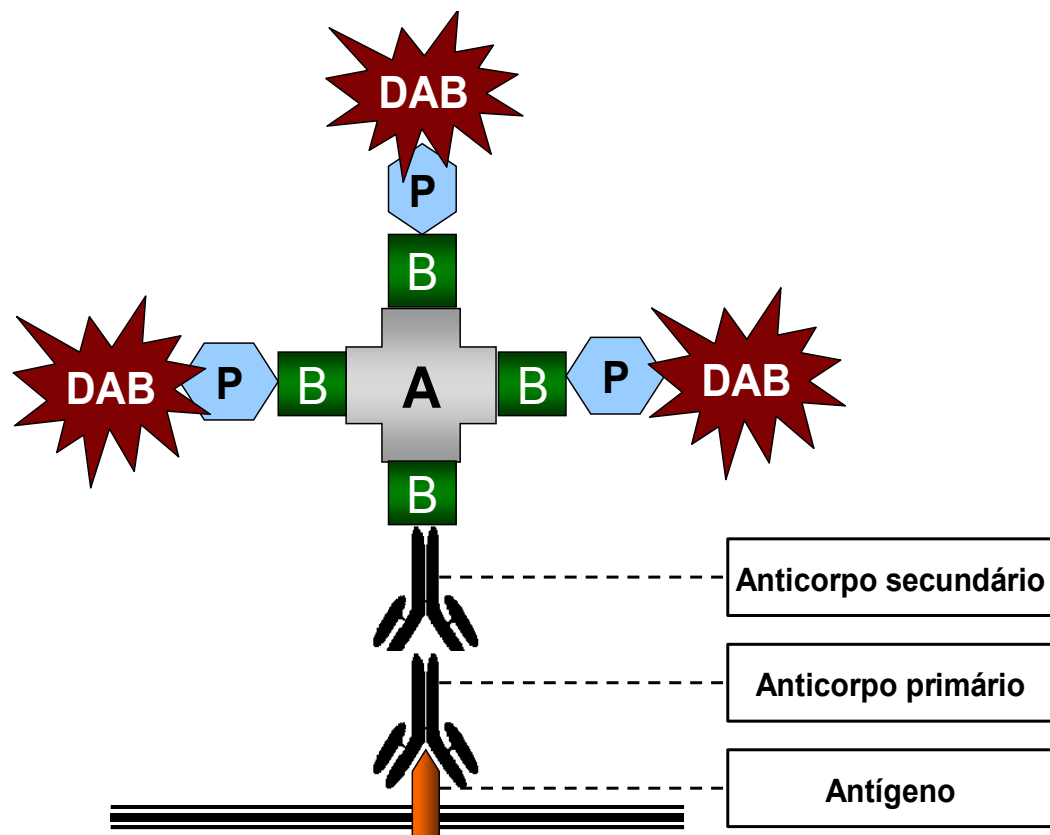


Figura 3-3 - Representação esquemática do princípio da imunohistoquímica pelo método da avidina-biotina-peroxidase. Observa-se o efeito amplificador da avidina (A) que se liga à biotina (B) do anticorpo secundário e a outras três moléculas de biotina. A peroxidase (P) reage com a 3,3'-diaminobenzidina (DAB) corando os sítios antigênicos

Nota: A: Avidina; B: Biotina; P: Peroxidase; DAB: 3,3'-diaminobenzidina.

A seguir foi empregado o sistema avidina-biotina-peroxidase (ABC), descrito por Hsu *et al.* (1981)⁽⁶²⁾, com pequenas modificações, conforme apresentado na figura 3-4 e descrito a seguir:

Imediatamente antes da reação da técnica de IHQ, os cortes foram desparafinizados, hidratados, submetidos a H₂O₂ (nº Catálogo H1009, Sigma Chemical Comp., St. Louis, Missouri, EUA) a 3%, por 5 minutos e lavados em solução salina tamponada (SST), pH 7,4. A recuperação antigênica foi realizada segundo método preconizado por Gown *et al.* (1993)⁽⁶³⁾, sendo os cortes incubados com solução tampão de citrato, pH 6,4, em forno de microondas caseiro (Sharp, modelo RB-4A56 BA, Manaus) por 15 minutos. Posteriormente, os cortes foram submetidos aos anticorpos monoclonais primários, anti-p53, MIB-1 e anti-CD31, *overnight*, à temperatura aproximada de 4°C. Após lavagem em SST, as lâminas foram incubadas por 60 minutos com anticorpo secundário biotilado. O anticorpo secundário utilizado foi anti-IgG de camundongo, produzido em cavalo (Nº Catálogo BA 2000, VECTOR Corp., Burlingame, Califórnia, EUA). Seguiu-se aplicação de complexo ABC Elite® (Nº Catálogo PK 6100, VECTOR Corp., Burlingame, Califórnia, EUA) sobre os cortes, por 45 minutos. O complexo ABC foi preparado segundo orientação do fabricante, constando de solução com 5ml de SST, e 2 gotas de A (avidina) e 2 gotas de B (biotina). Para identificação da reação, as lâminas foram tratadas com solução de 3,3' diaminobenzidina (DAB) (Nº Catálogo D5637, Sigma Chemical Comp., St. Louis, Missouri, EUA),

na concentração de 1mg/ml, em trizma (Nº Catálogo T1503, Sigma Chemical Comp., St. Louis, Missouri, EUA), e em solução de H₂O₂ a 0,1%.

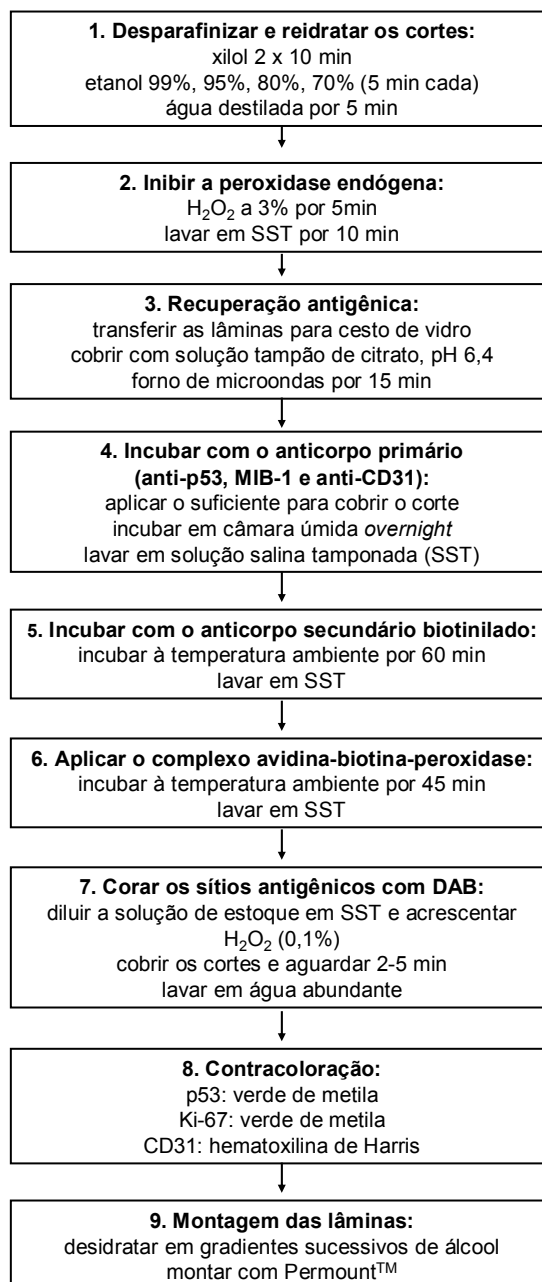


Figura 3-4 - Fluxograma do protocolo básico de imunohistoquímica pelo método da avidina-biotina-peroxidase (ABC) para detecção da expressão das proteínas p53, Ki-67 e CD31

Nota: SST: solução salina tamponada; DAB: 3,3' diaminobenzidina

Os cortes tratados com anti-CD31 foram, então, contracolorados com hematoxilina de Harris (Nº Catálogo H9627, Sigma Chemical Comp., St. Louis, Missouri, EUA), a 80%, por 5 minutos, desidratadas em gradientes sucessivos de álcool, com montagem final com Permount™ (Nº Catálogo SO-P-15, Fisher Scientific, Fair Law, New Jersey, EUA) e lamínula. Para os anticorpos com positividade nuclear (MIB-1 e anti-p53) a contracoloração foi feita com verde de metila.

3.2.4.2. Anticorpos utilizados

- Anti-p53: para a pesquisa da proteína p53, foi utilizado o anticorpo anti-p53 (clone DO7, nº Catálogo M7001, DaKo Corp., Carpinteria, Califórnia, EUA) na diluição 1:400. O anticorpo secundário indicado é o anti-IgG de camundongo (VECTOR Corp.), 1:300. A contracoloração foi realizada com verde de metila, permitindo uma melhor visualização da positividade nuclear.
- MIB-1: para a pesquisa da proteína Ki-67, foi utilizado o anticorpo MIB-1 (clone MIB-1, nº Catálogo M7240, DAKO Corp.) na diluição 1:100. O anticorpo secundário indicado é o anti-IgG de camundongo (VECTOR Corp.), 1:300. A contracoloração foi realizada com verde de metila, para melhor visualização da positividade nuclear.
- Anti-CD31: para a pesquisa da proteína CD31, foi utilizado o anticorpo anti-CD31 (clone JC/70A, Nº Catálogo M0823, DAKO Corp.), na

diluição 1:40. O anticorpo secundário é anti-IgG de camundongo (VECTOR Corp.), 1:300. Como a positividade é membranar/citoplasmática, a contracoloração pode ser feita com Hematoxilina de Harris, que fornece melhor nitidez morfológica de fundo.

3.2.4.3. Interpretação das reações de imunohistoquímica

As reações foram avaliadas no mesmo microscópio óptico, com 200x de aumento, na mesma intensidade de luz. Para aumentar a objetividade, a leitura das lâminas foi feita sem o conhecimento prévio, por parte do examinador, se a amostra tecidual era proveniente de um caso ou controle.

As avaliações foram realizadas no colo uterino ou tumor e nas margens vaginais, as quais foram estudadas em duas porções distintas: proximal (0 a 1 cm em relação ao colo) e distal (1 a 2 cm em relação ao colo) (Figura 3-1). As amostras vaginais em que a avaliação histológica pela HE evidenciava a presença de carcinoma invasor ou NIVA foram excluídas do estudo.

Para todos os marcadores pesquisados, foi feita análise semiquantitativa, sendo os resultados da expressão proteica registrada como negativa ou positiva. Quando resultou positiva, a expressão proteica foi classificada de grau 1 a 4, sendo:

- Grau 1: expressão da proteína em menos de 10% das células;
- Grau 2: expressão da proteína em 11 a 25% das células;
- Grau 3: expressão da proteína em 26 a 50% das células;
- Grau 4: expressão da proteína em estudo em mais de 50% das células.

Essa quantificação foi realizada pelo estudo de um mínimo de 1000 células epiteliais, examinadas em cerca de 10 campos com 200 vezes de aumento. Na avaliação das proteínas p53 e Ki-67, apenas a coloração nuclear das células tumorais foi considerada para quantificação. Para a proteína CD31, foi considerada a sua expressão no citoplasma e na membrana das células endoteliais (Figuras 3-5; 3-6 e 3-7).

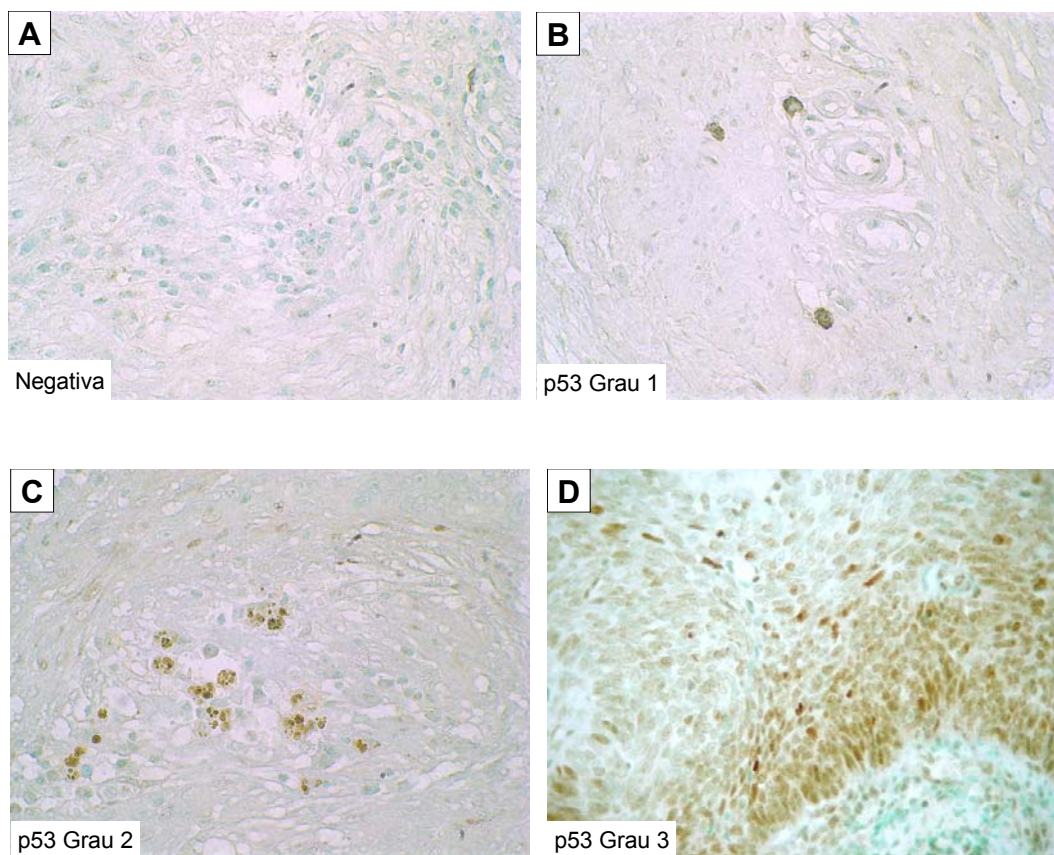


Figura 3-5 - Fotomicrografias de carcinoma invasor do colo uterino corado por imunohistoquímica para a proteína p53 (600x de aumento). Contracoloração com verde de metila. A coloração castanha nos núcleos indica a presença da proteína p53

Nota: Avaliação de um mínimo de 1000 células epiteliais, apenas a coloração nuclear foi considerada na quantificação da proteína p53. A – Expressão negativa de proteína p53. B - Grau 1: expressão da proteína p53 em menos de 10% das células. C - Grau 2: expressão da proteína p53 em 11 a 25% das células. D - Grau 3: expressão da proteína p53 em 26 a 50% das células

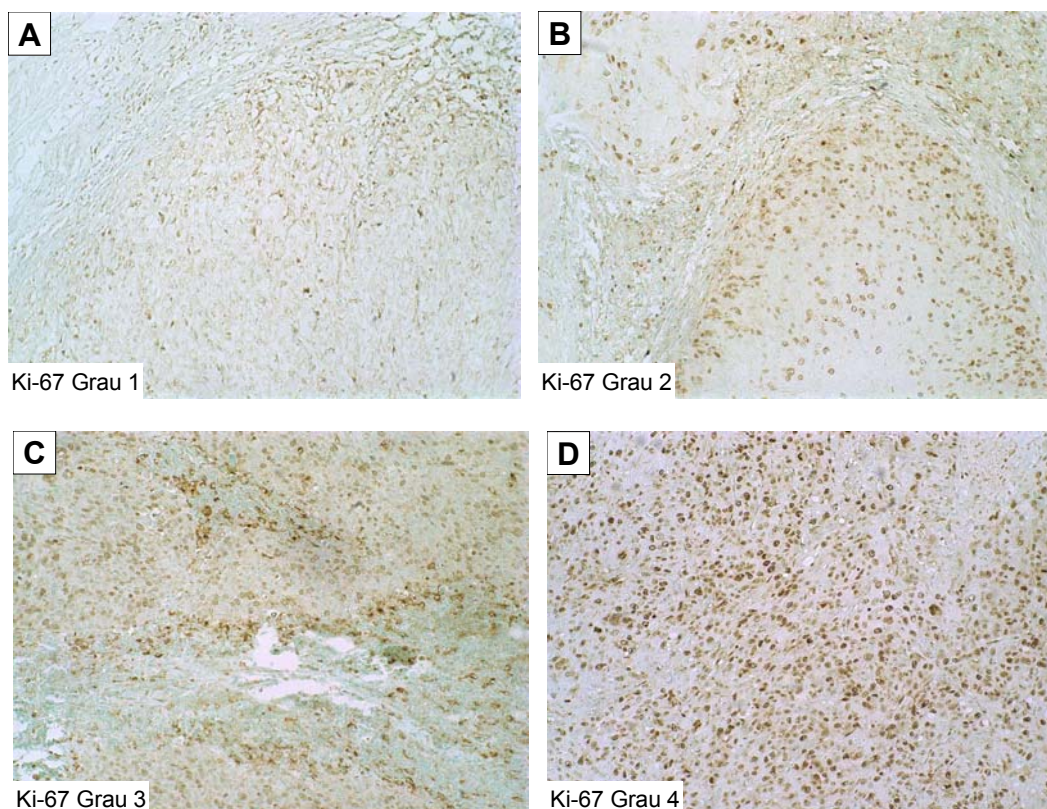


Figura 3-6 - Fotomicrografias de carcinoma invasor do colo uterino corado por imunohistoquímica para a proteína Ki-67 (200x de aumento). Contracoloração com verde de metila. A coloração castanha nos núcleos indica a presença da proteína Ki-67

Nota: Avaliação de um mínimo de 1000 células epiteliais, apenas a coloração nuclear foi considerada na quantificação da proteína Ki-67. A - Grau 1: expressão da proteína Ki-67 em menos de 10% das células. B - Grau 2: expressão da proteína Ki-67 em 11 a 25% das células. C - Grau 3: expressão da proteína Ki-67 em 26 a 50% das células. D - Grau 4: expressão da proteína Ki-67 em mais de 50% das células

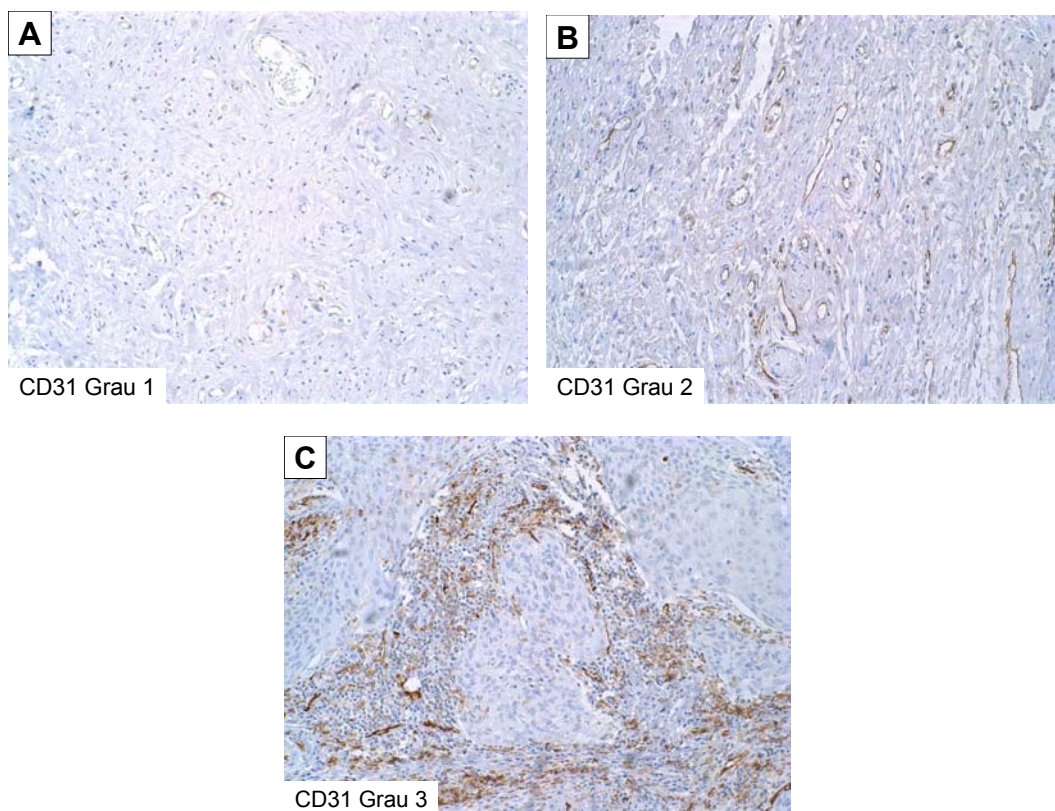


Figura 3-7 - Fotomicrografias de carcinoma invasor do colo uterino corado por imunohistoquímica para a proteína CD31 (200x de aumento). Contracoloração feita com Hematoxilina de Harris. A coloração castanha no citoplasma e membrana das células endoteliais indica a presença da proteína CD31

Nota: Avaliação de um mínimo de 1000 células epiteliais, a expressão no citoplasma e na membrana das células endoteliais foi considerada para quantificação da proteína CD31. A - Grau 1: expressão da proteína CD31 em menos de 10% das células. B - Grau 2: expressão da proteína CD31 em 11 a 25% das células. C - Grau 3: expressão da proteína CD31 em 26 a 50% das células

3.3. Análise estatística

As fichas preenchidas foram revisadas, tendo as suas informações codificadas e digitadas em banco de dados no programa SPSS para Windows versão 10.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA), que desenvolveu os cálculos posteriores. A idade e a paridade foram descritas por meio de suas médias, valores mínimos, máximos e desvio padrão. As diferenças entre as médias foram feitas pelo teste *t* de Student. Utilizou-se o teste de Wilcoxon para a comparação entre a expressão das proteínas p53, Ki-67 e CD31 na região proximal e a distal das margens vaginais de histerectomia radical em pacientes com carcinoma invasor do colo uterino (comparação entre duas amostras pareadas). As demais comparações foram feitas pelo teste do Qui-quadrado (comparação entre grupos independentes). As diferenças ou correlações com valor de $p < 0,05$ foram consideradas significativas.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Características gerais da amostra

O estudo incluiu pacientes com idades variando entre 27 e 73 anos (média $\pm$ desvio padrão = $48,7 \pm 10,4$ anos) e paridade média de $4,7 \pm 3,2$ (variação: 0 a 14 partos). Como ilustra a figura 4-1, não houve diferença significativa entre as pacientes com carcinoma invasor do colo uterino e o grupo controle quanto à idade e paridade.

No grupo de pacientes com CCE de colo uterino, o estadiamento clínico (FIGO) foi IB1 em 22 casos (73,3%) e IB2 em 8 casos (26,7%). O tamanho tumoral médio foi de $3,6 \pm 1,6$ cm (variando de 1 a 6,8 cm). O tumor era bem diferenciado (G1) em 3 (10%); moderadamente diferenciado (G2) em 21 (70%) e mal diferenciado (G3) em 6 (20%) pacientes. A presença de invasão linfovascular foi observada em 8 pacientes (26,7%). O número médio de linfonodos pélvicos dissecados foi $17,9 \pm 5,1$ (variação: 10 a 28 linfonodos). Acometimento parametrial foi evidenciado em 12 pacientes (40%). A presença de metástases em linfonodos pélvicos foi observada em 12 pacientes (40%), com um número médio de linfonodos acometidos ao exame histológico de $1,3 \pm 2,3$ (variação: 0 a 9 linfonodos).

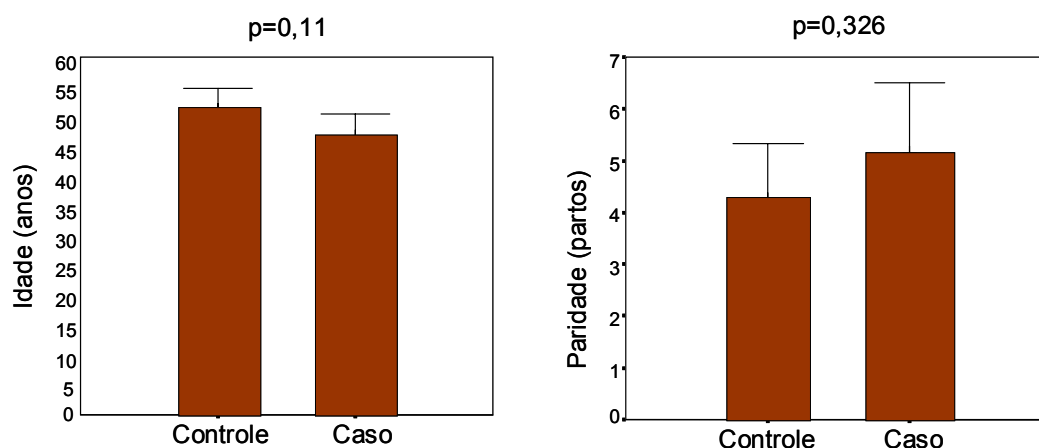


Figura 4-1 - Idade e paridade médias das pacientes com mioma uterino, submetidas à histerectomia vaginal (grupo controle), e das pacientes com carcinoma invasor do colo uterino, submetidas à histerectomia radical

Nota: As barras representam a média $\pm$ erro padrão da média. A diferença entre as médias foi feito pelo teste *t* de Student

No processo de avaliação das margens vaginais, foi evidenciada a presença de CCE invasor ou NIVA em 5 pacientes na MVA proximal, 2 pacientes na MVA distal, 3 pacientes na MVP proximal e 2 pacientes na MVP distal. Essas amostras vaginais não foram consideradas para avaliação IHQ.

4.2. Avaliação das proteínas p53, Ki-67 e CD31 no colo uterino e tumor

Como ilustra a figura 4-2, a expressão das proteínas p53, Ki-67 e CD31 foi significativamente superior no tumor em relação ao colo normal ($p < 0,001$). A expressão tumoral da proteína p53 foi negativa em 96,7% dos colos uterinos normais (controles) e em apenas 6,7% dos tumores (casos). Foi evidenciada uma expressão do Ki-67 graus 2, 3 ou 4 em 6,7% dos colos uterinos normais (grupo controle) e em 93,3% dos tumores (casos). A expressão da proteína CD31 foi verificada nos graus 2 ou 3 em 10% dos colos uterinos normais (controles) e em 70% dos tumores (casos).

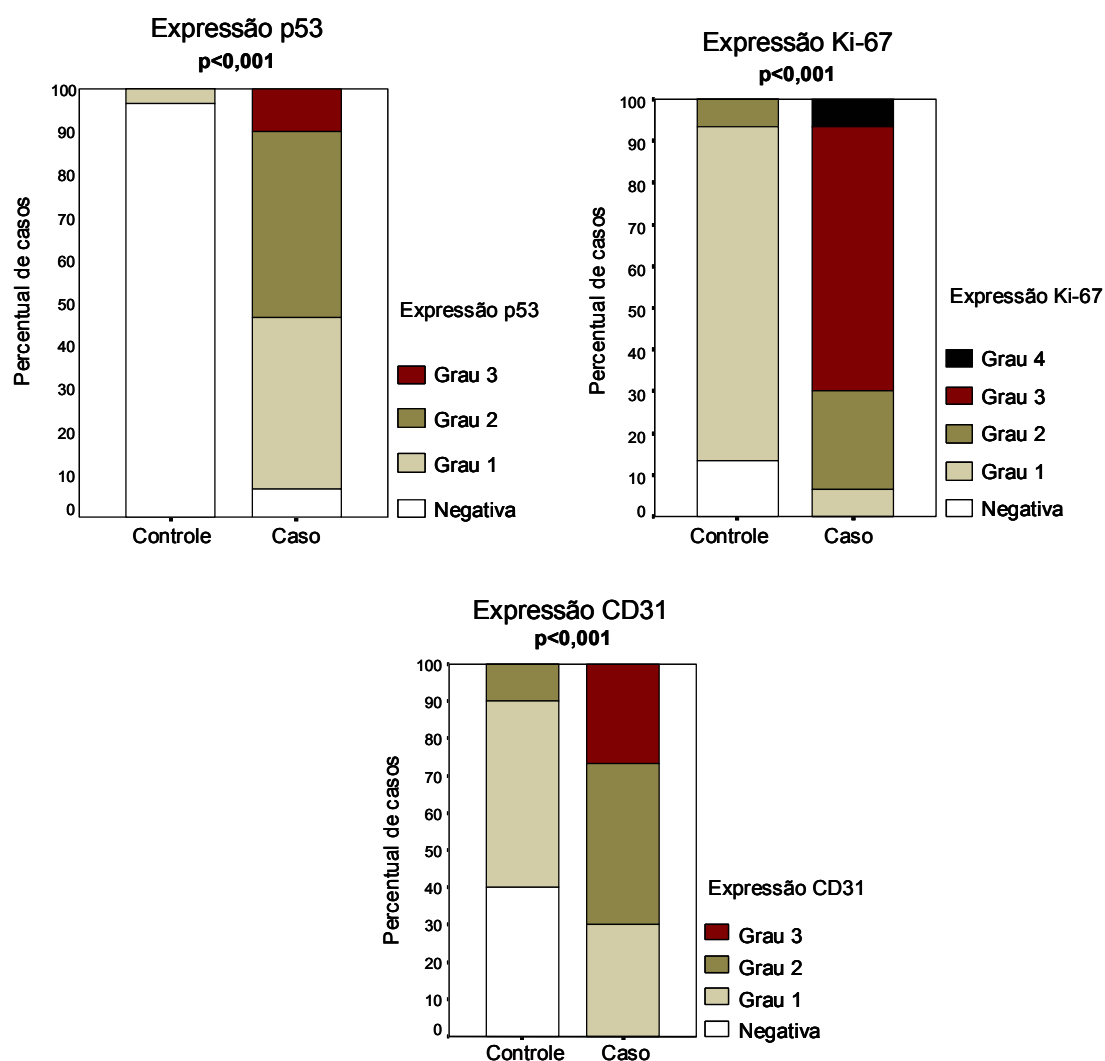


Figura 4-2 - Expressão das proteínas p53, Ki-67 e CD31 no colo uterino de pacientes do grupo controle e no tumor de pacientes com carcinoma invasor do colo uterino

Nota: Os valores de p foram calculados pelo teste do Qui-quadrado. Grau 1: expressão da proteína em menos de 10% das células; Grau 2: de 11 a 25% das células; Grau 3: de 26 a 50% das células; Grau 4: mais de 50% das células (avaliação de um mínimo de 1000 células epiteliais, apenas a coloração nuclear foi considerada na quantificação da proteína p53 e Ki-67, a expressão no citoplasma e na membrana das células endoteliais foi considerada para quantificação da proteína CD31).

A expressão das proteínas p53 e Ki-67 no tumor não se associou com o grau de diferenciação, invasão linfovascular e tamanho tumoral nas pacientes com câncer de colo (Figuras 4-3 e 4-4). A expressão da proteína CD31 no tumor associou-se, significativamente, com a presença de invasão linfovascular e com o tamanho tumoral ($p=0,032$ e $p=0,03$; respectivamente). Uma expressão da proteína CD31 graus 2 e 3 foi detectada em 100% dos tumores com presença de invasão linfovascular e em apenas 59,1% daqueles sem esse achado histopatológico. Tumores com tamanho igual ou superior a 4 cm apresentaram expressão de CD31 graus 2 e 3 em 80,2% dos casos, enquanto aqueles com dimensões inferiores apresentaram tal expressão em 57,1% dos casos. O grau de diferenciação não se correlacionou com a expressão tumoral da proteína CD31 nas pacientes com carcinoma invasor do colo uterino ($p=0,352$) (Figura 4-5).

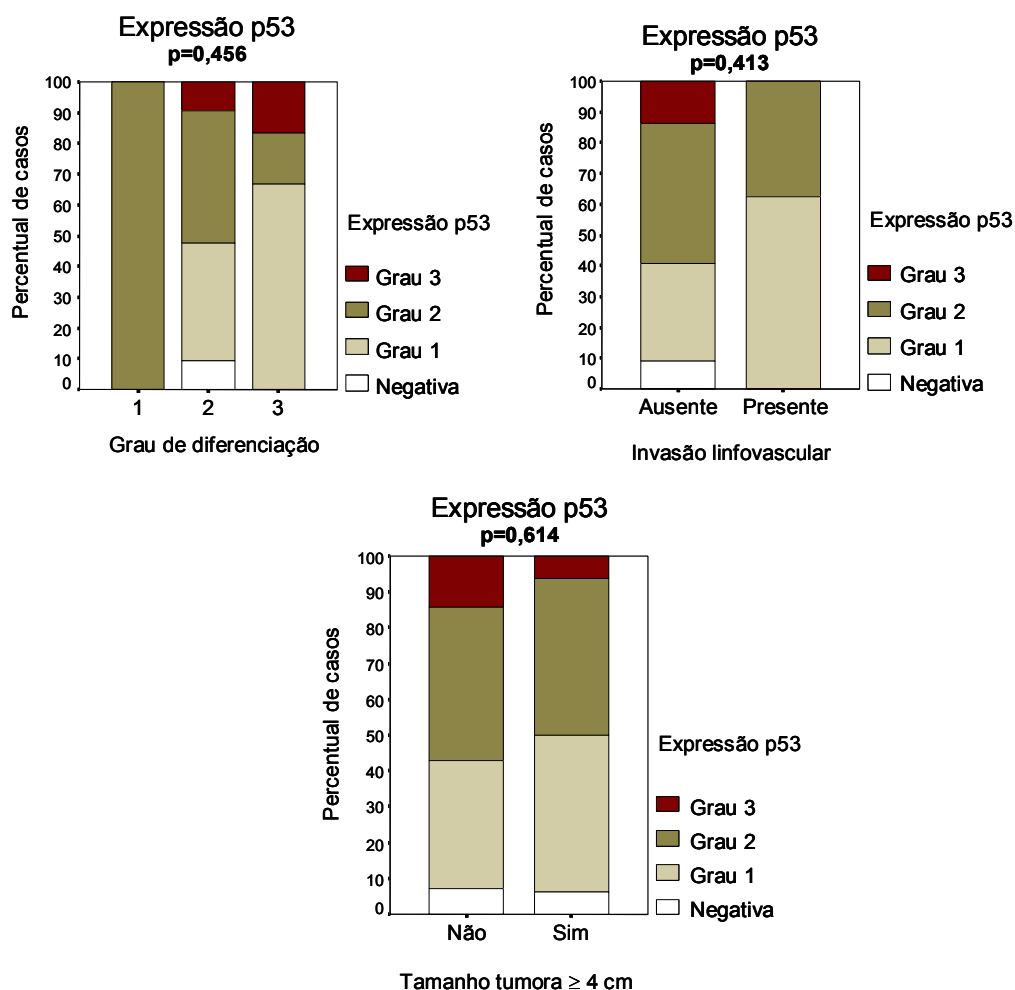


Figura 4-3 - Associação da expressão da proteína p53 no tumor com o grau de diferenciação, com a presença de invasão linfovacular e com o tamanho tumoral nas pacientes com carcinoma invasor do colo uterino

Nota: Os valores de p foram calculados pelo teste do Qui-quadrado. O tumor foi classificado em: bem diferenciado (G1), moderadamente diferenciado (G2) ou mal diferenciado (G3). A expressão da proteína p53 foi: Grau 1 (expressão da proteína em menos de 10% das células), Grau 2 (de 11 a 25% das células) e Grau 3 (de 26 a 50% das células). Foram avaliadas um mínimo de 1000 células epiteliais, apenas a coloração nuclear foi considerada na quantificação da proteína p53

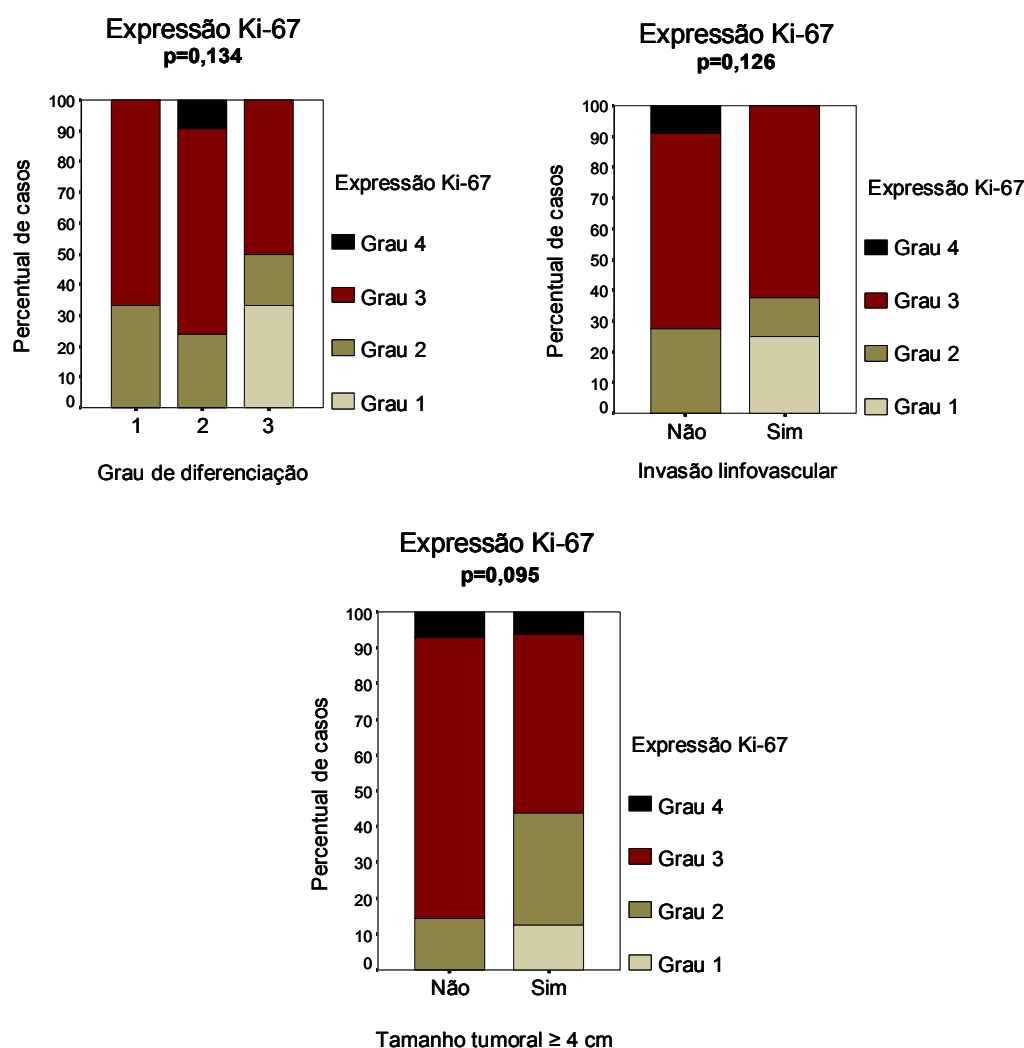


Figura 4-4 - Associação da expressão da proteína Ki-67 no tumor com o grau de diferenciação, com a presença de invasão linfovascular e com o tamanho tumoral nas pacientes com carcinoma invasor do colo uterino

Nota: Os valores de p foram calculados pelo teste do Qui-quadrado. O tumor foi classificado em: bem diferenciado (G1), moderadamente diferenciado (G2) ou mal diferenciado (G3). A expressão da proteína Ki-67 foi: Grau 1 (expressão da proteína em menos de 10% das células), Grau 2 (de 11 a 25% das células), Grau 3 (de 26 a 50% das células) e Grau 4 (mais de 50% das células). Foram avaliadas um mínimo de 1000 células epiteliais, apenas a coloração nuclear foi considerada na quantificação da proteína Ki-67

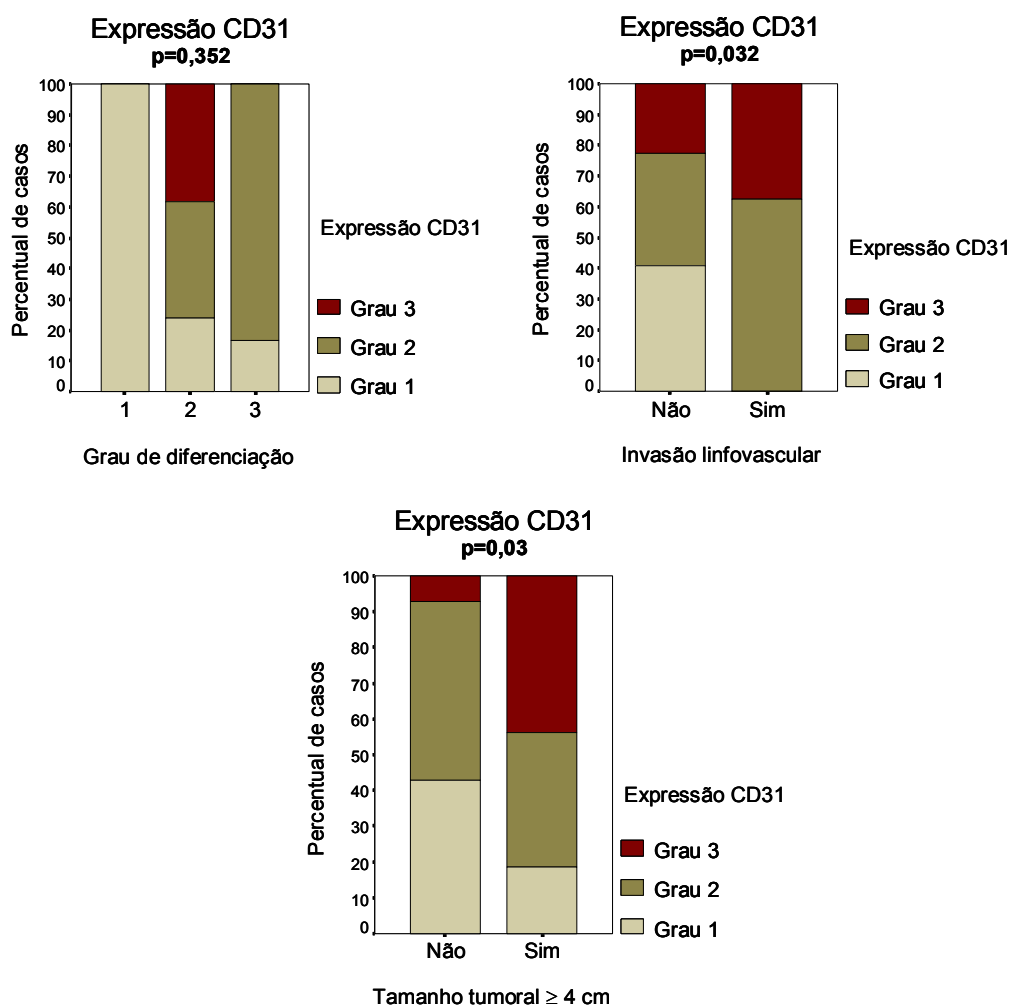


Figura 4-5 - Associação da expressão da proteína CD31 no tumor com o grau de diferenciação, com a presença de invasão linfovacular e com o tamanho tumoral nas pacientes com carcinoma invasor do colo uterino

Nota: Os valores de p foram calculados pelo teste do Qui-quadrado. O tumor foi classificado em: bem diferenciado (G1), moderadamente diferenciado (G2) ou mal diferenciado (G3). A expressão da proteína CD31 foi: Grau 1 (expressão da proteína em menos de 10% das células), Grau 2 (de 11 a 25% das células) e Grau 3 (de 26 a 50% das células). Foram avaliadas um mínimo 1000 células epiteliais, a expressão no citoplasma e na membrana das células endoteliais foi considerada para quantificação da proteína CD31

Não foi observada uma associação da expressão das proteínas p53 e Ki-67 no tumor com a presença de acometimento parametrial e metástase para os linfonodos pélvicos em pacientes com CCE invasor do colo uterino (Figuras 4-6 e 4-7). A presença de metástase linfonodal correlacionou-se com uma maior expressão da proteína CD31 no tumor ($p=0,032$). Pacientes com metástases linfonodais apresentaram expressão de CD31 graus 2 e 3 em 91,7% dos casos, enquanto aqueles sem metástases linfonodais apresentaram tal expressão em 55,6% dos casos. A expressão da proteína CD31 no tumor não se associou ao acometimento parametrial nas pacientes com carcinoma invasor do colo uterino ($p=0,242$) (Figura 4-8).

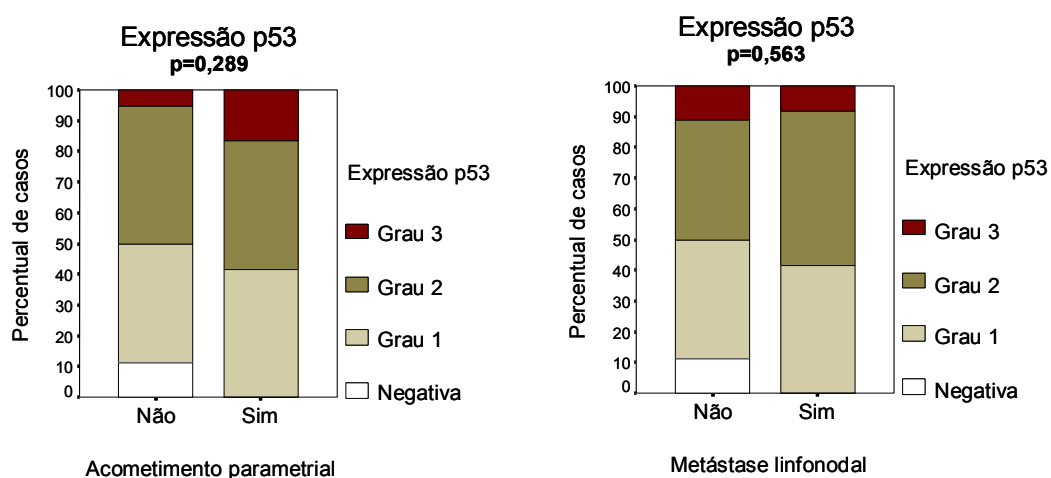


Figura 4-6 - Associação da expressão da proteína p53 no tumor com acometimento parametrial e com a presença de metástase para linfonodos pélvicos nas pacientes com carcinoma invasor do colo uterino

Nota: Os valores de p foram calculados pelo teste do Qui-quadrado. Grau 1: expressão da proteína em menos de 10% das células; Grau 2: de 11 a 25% das células; Grau 3: de 26 a 50% das células (avaliação de um mínimo de 1000 células epiteliais, apenas a coloração nuclear foi considerada na quantificação da proteína p53)

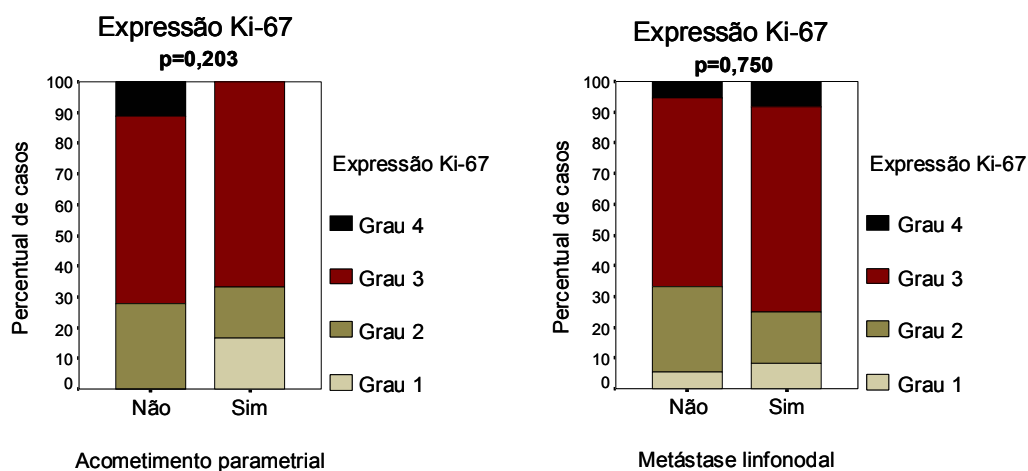


Figura 4-7 - Associação da expressão da proteína Ki-67 no tumor com acometimento parametrial e com a presença de metástase para linfonodos pélvicos nas pacientes com carcinoma invasor do colo uterino

Nota: Os valores de p foram calculados pelo teste do Qui-quadrado. Grau 1: expressão da proteína em menos de 10% das células; Grau 2: de 11 a 25% das células; Grau 3: de 26 a 50% das células; Grau 4: mais de 50% das células (avaliação de um mínimo de 1000 células epiteliais, apenas a coloração nuclear foi considerada na quantificação da proteína Ki-67)

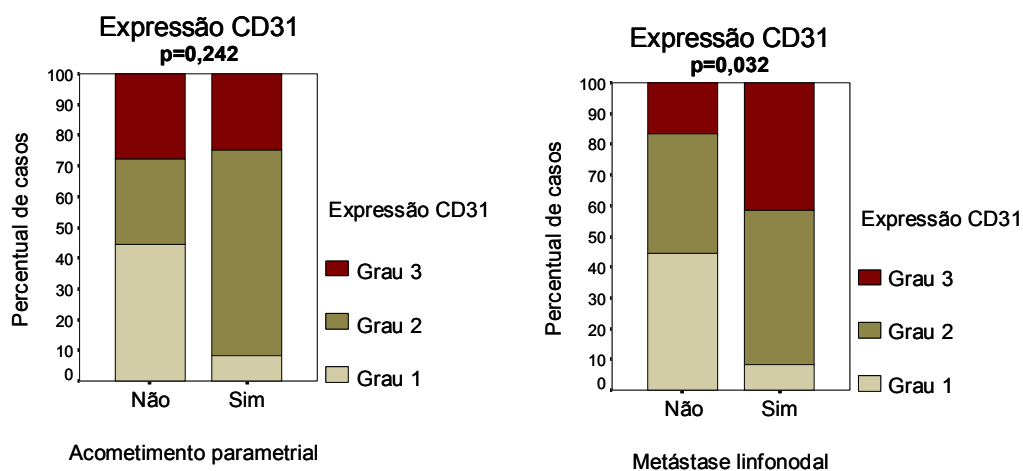


Figura 4-8 - Associação da expressão da proteína CD31 no tumor com acometimento parametrial e com a presença de metástase para linfonodos pélvicos nas pacientes com carcinoma invasor do colo uterino

Nota: Os valores de p foram calculados pelo teste do Qui-quadrado. Grau 1: expressão da proteína em menos de 10% das células; Grau 2: de 11 a 25% das células; Grau 3: de 26 a 50% das células (avaliação de um mínimo 1000 células epiteliais, a expressão no citoplasma e na membrana das células endoteliais foi considerada para quantificação da proteína CD31)

4.3. Avaliação do p53, MIB-1 e CD31 nas margens vaginais

Houve uma maior expressão das proteínas p53, Ki-67 e CD31 nas margens vaginais de pacientes com carcinoma invasor do colo uterino em comparação às margens vaginais de pacientes com colo normal (Figuras 4-9; 4-10 e 4-11). Essa associação foi significativa para a proteína p53 na MVA proximal ($p=0,045$); para o Ki-67 na MVA proximal ($p<0,001$), MVA distal ($p<0,001$), MVP proximal ($p=0,009$) e MVP distal ($p<0,001$); e para o CD31 na MVA proximal ($p=0,003$) e MVA distal ($p=0,018$).

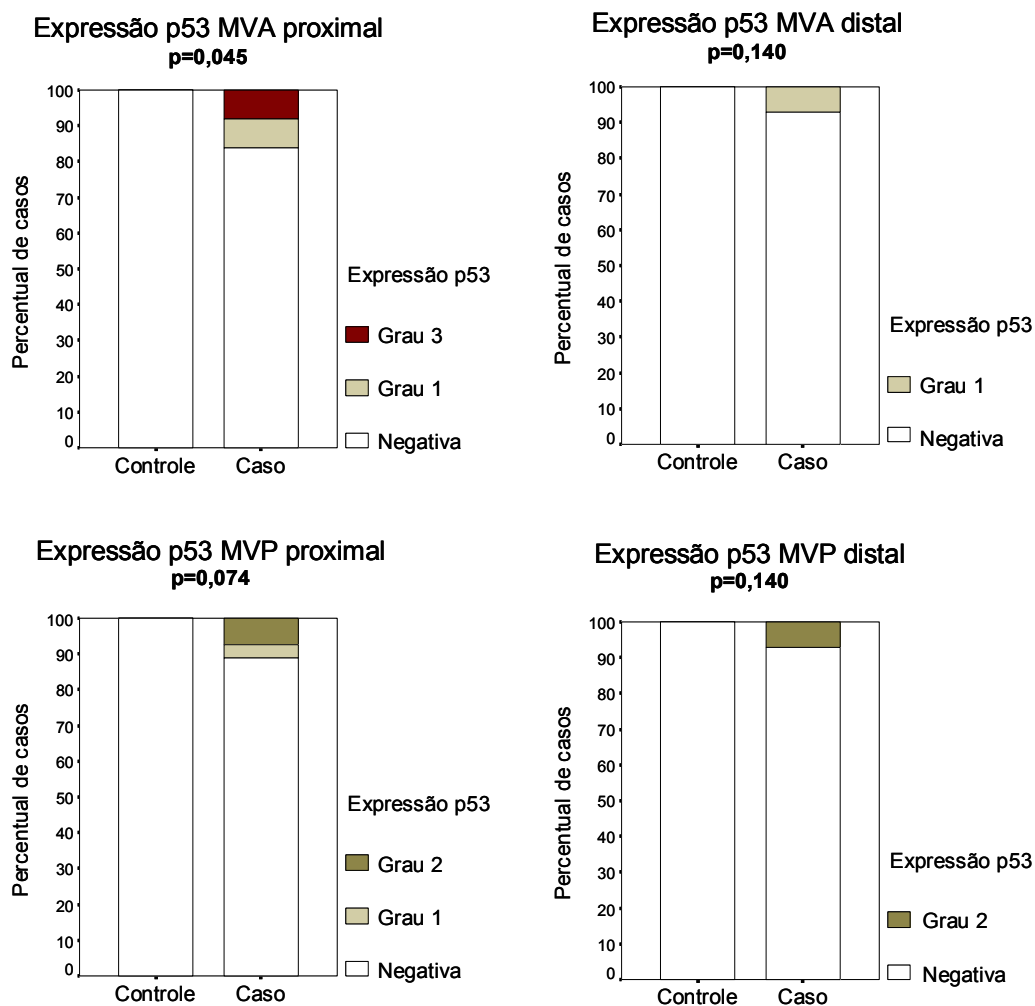


Figura 4-9 - Expressão da proteína p53 nas margens vaginais no grupo controle e no grupo de pacientes com carcinoma invasor do colo uterino

Nota: Os valores de p foram calculados pelo teste do Qui-quadrado. MVA: Margem vaginal anterior; MVP: Margem vaginal posterior. Grau 1: expressão da proteína em menos de 10% das células; Grau 2: de 11 a 25% das células; Grau 3: de 26 a 50% das células (avaliação de um mínimo de 1000 células epiteliais, apenas a coloração nuclear foi considerada na quantificação da proteína p53)

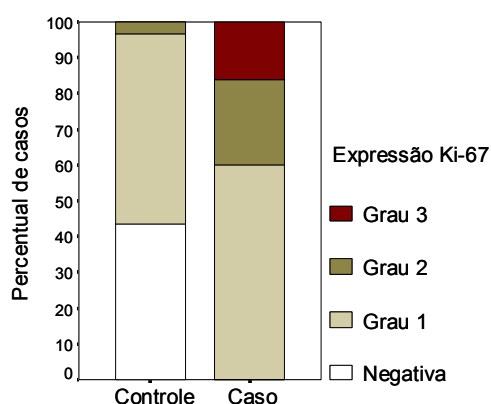
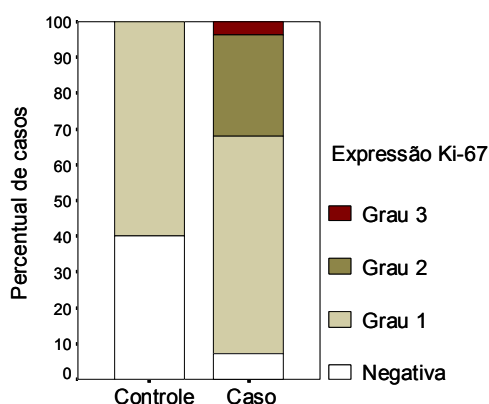
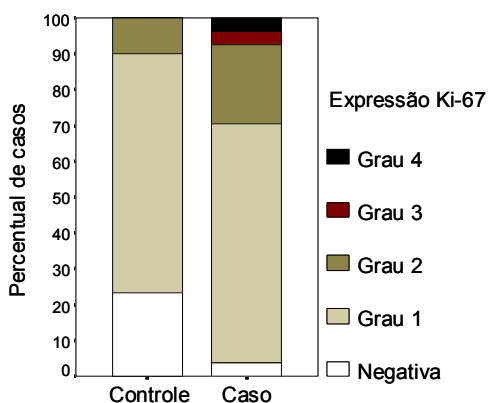
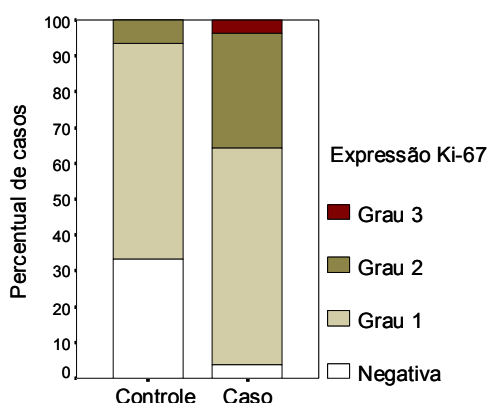
Expressão Ki- 67 MVA proximal
 $p<0,001$ Expressão Ki -67 MVA proximal
 $p<0,001$ Expressão Ki-67 MVP proximal
 $p=0,009$ Expressão Ki-67 MVP proximal
 $p<0,001$ 

Figura 4-10 - Expressão da proteína Ki-67 nas margens vaginais no grupo controle e no grupo de pacientes com carcinoma invasor do colo uterino

Nota: Os valores de p foram calculados pelo teste do Qui-quadrado. MVA: Margem vaginal anterior; MVP: Margem vaginal posterior. Grau 1: expressão da proteína em menos de 10% das células; Grau 2: de 11 a 25% das células; Grau 3: de 26 a 50% das células; Grau 4: mais de 50% das células (avaliação de um mínimo de 1000 células epiteliais, apenas a coloração nuclear foi considerada na quantificação da proteína Ki-67)

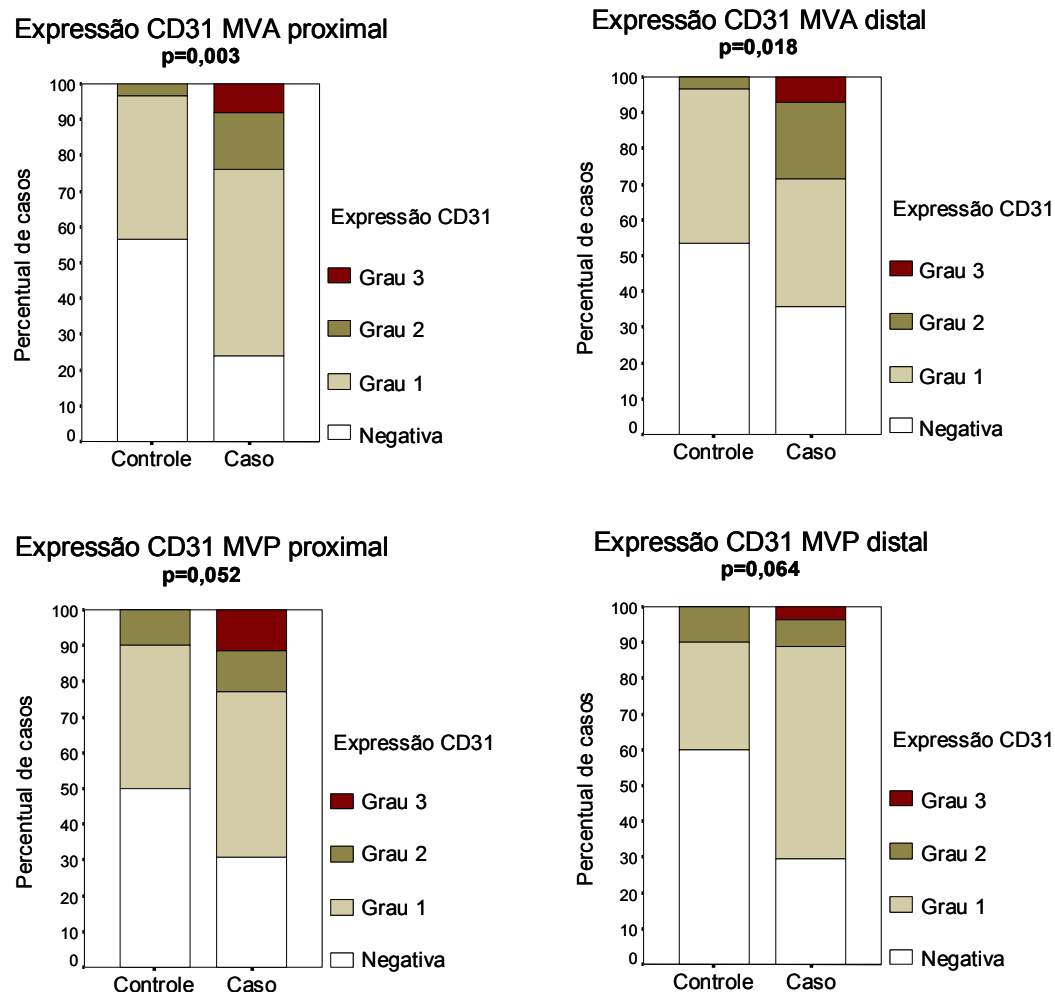


Figura 4-11 - Expressão da proteína CD31 nas margens vaginais no grupo controle e no grupo de pacientes com carcinoma invasor do colo uterino

Nota: Os valores de p foram calculados pelo teste do Qui-quadrado. MVA: Margem vaginal anterior; MVP: Margem vaginal posterior. Grau 1: expressão da proteína em menos de 10% das células; Grau 2: de 11 a 25% das células; Grau 3: de 26 a 50% das células (avaliação de um mínimo de 1000 células epiteliais, a expressão no citoplasma e na membrana das células endoteliais foi considerada para quantificação da proteína CD31)

A comparação da expressão desses marcadores entre a região proximal e a distal das margens vaginais anterior e posterior de histerectomia radical em pacientes com carcinoma invasor do colo uterino não mostrou diferenças significativas (Figura 4-12, 4-13 e 4-14).

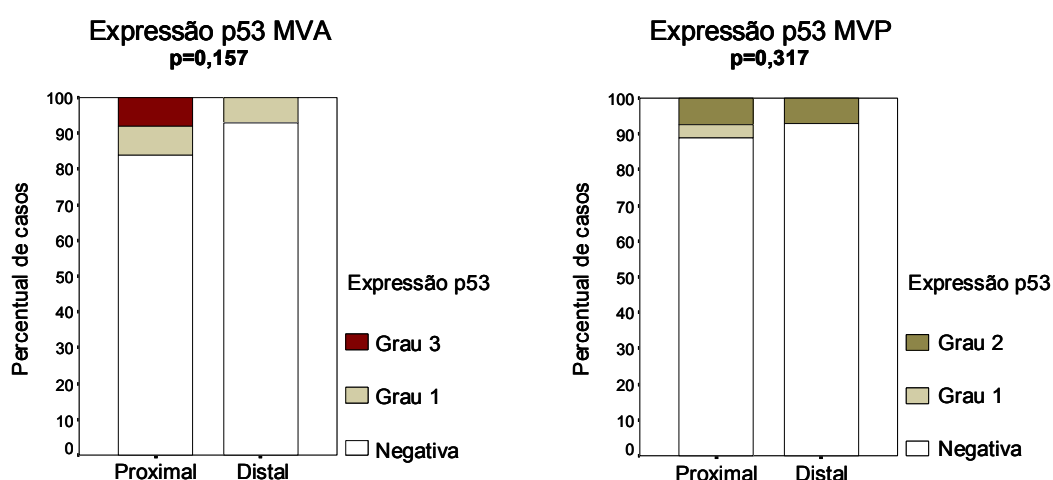


Figura 4-12 - Expressão da proteína p53 na região proximal e distal da margem vaginal anterior e posterior de histerectomia radical nas pacientes com carcinoma invasor do colo uterino

Nota: Os valores de p foram calculados pelo teste de Wilcoxon. MVA: Margem vaginal anterior; MVP: Margem vaginal posterior. Grau 1: expressão da proteína em menos de 10% das células; Grau 2: de 11 a 25% das células; Grau 3: de 26 a 50% das células (avaliação de um mínimo de 1000 células epiteliais, apenas a coloração nuclear foi considerada na quantificação da proteína p53)

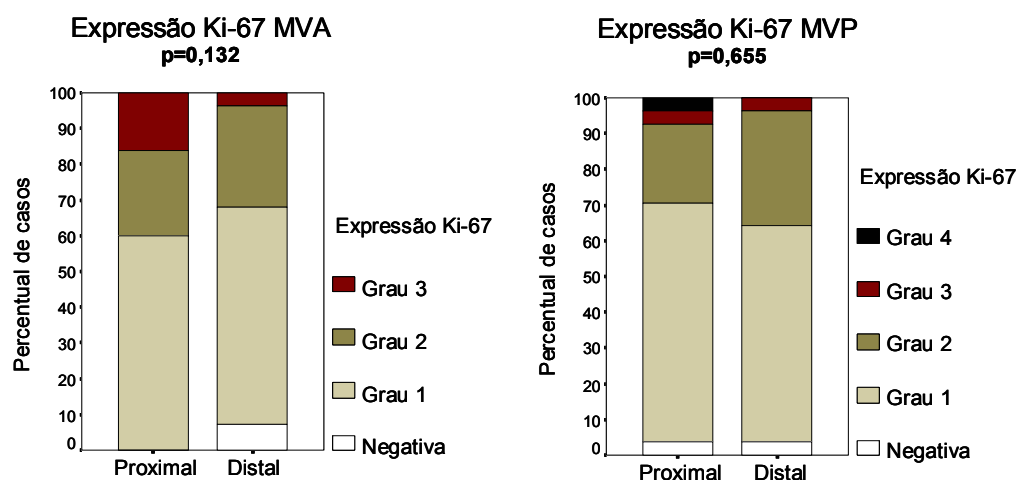


Figura 4-13 - Expressão da proteína Ki-67 na região proximal e distal da margem vaginal anterior e posterior de histerectomia radical nas pacientes com carcinoma invasor do colo uterino

Nota: Os valores de p foram calculados pelo teste de Wilcoxon. MVA: Margem vaginal anterior; MVP: Margem vaginal posterior. Grau 1: expressão da proteína em menos de 10% das células; Grau 2: de 11 a 25% das células; Grau 3: de 26 a 50% das células; Grau 4: mais de 50% das células (avaliação de um mínimo de 1000 células epiteliais, apenas a coloração nuclear foi considerada na quantificação da proteína Ki-67)

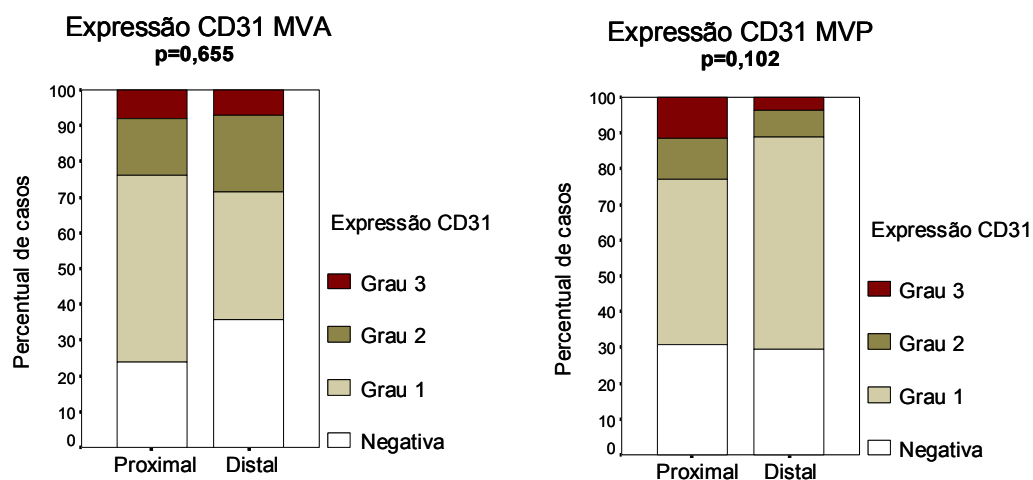


Figura 4-14 - Expressão da proteína CD31 na região proximal e distal da margem vaginal anterior e posterior de histerectomia radical nas pacientes com carcinoma invasor do colo uterino

Nota: Os valores de p foram calculados pelo teste de Wilcoxon. MVA: Margem vaginal anterior. Grau 1: expressão da proteína em menos de 10% das células; Grau 2: de 11 a 25% das células; Grau 3: de 26 a 50% das células (avaliação de um mínimo de 1000 células epiteliais, a expressão no citoplasma e na membrana das células endoteliais foi considerada para quantificação da proteína CD31)

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Neste estudo foram avaliadas as expressões das proteínas p53, Ki-67 e CD31 no tumor e nas margens vaginais de pacientes com CCE invasor do colo uterino, visando determinar possíveis fatores prognósticos e marcadores de doença residual nas margens vaginais em pacientes submetidas a histerectomia radical. Sabe-se que a carcinogênese é um processo complexo e a avaliação de 4700 genes pela técnica do *microarray*, mostrou 74 genes com expressão alterada em amostras de câncer do colo uterino comparadas a células normais⁽⁶⁴⁾. Apesar disso, a identificação de novos marcadores tumorais pode ser valiosa no seguimento das pacientes, na definição daquelas que se beneficiariam de terapia adjuvante ou de um tratamento primário mais agressivo⁽⁶⁵⁾. Essas três proteínas estudadas participam de importantes etapas do processo de carcinogênese, como o gene supressor de tumor p53, o aumento na proliferação celular e a aquisição de angiogênese.

5.1. Metodologia

Não há consenso na forma de quantificação pela IHQ das proteínas p53, Ki-67 e CD31. A avaliação pode ser qualitativa, semiquantitativa ou quantitativa; sendo a contagem das células realizada por método visual ou pela análise computadorizada da imagem.

Usualmente, é estabelecido um percentual de expressão proteica que divide os tumores em categorias: positivo e negativo (p53), alto ou baixo índice de proliferação (Ki-67), alta ou baixa atividade angiogênica (CD31). No entanto, esse percentual é variável na literatura. Em alguns estudos, buscou-se o ponto de corte em que se obtinham dois grupos com maior diferença estatística em relação ao prognóstico^(66,67). Em outros, utilizou-se a média ou mediana das taxas de expressão proteica dos casos estudados^(18,23,37,68,69). Em alguns, a determinação do ponto de corte foi arbitrária⁽⁷⁰⁻⁷²⁾.

Um estudo comparou o método de contagem (análise quantitativa) com a estimativa dos núcleos marcados pela IHQ para Ki-67 (análise semiquantitativa) no carcinoma de mama⁽⁷³⁾. Concluiu-se que a avaliação por estimativa parece ser suficientemente precisa, além de ser mais prática e consumir menos tempo do que a contagem⁽⁷³⁾. A escolha da área do tumor a ser avaliada representa uma outra limitação do método por contagem⁽⁷³⁾. No presente estudo, foi utilizada uma análise semiquantitativa dos marcadores como preconizado por Grace *et al.* (2003)⁽⁷⁴⁾. Essa metodologia, apesar de ser mais fácil do ponto de vista técnico, especialmente diante do grande número de amostras avaliadas, dificulta a determinação de um valor de dicotomização para definir os casos com superexpressão proteica.

Entre as técnicas existentes para investigação da inativação da proteína p53, a IHQ é a mais freqüentemente utilizada. A

IHQ tem suas limitações e a ausência de marcação não significa, necessariamente, a inexistência de alterações na proteína (falso negativo)⁽⁷⁵⁾. Inversamente, o acúmulo da proteína não é sinônimo de mutação⁽⁷⁵⁾. Os resultados podem variar pelo uso de diferentes anticorpos monoclonais, modos de incubação, variações nos métodos de recuperação antigênica, além da subjetividade da quantificação⁽⁷⁶⁾.

O índice de proliferação pode ser determinado pelo MIB-1, que detecta o antígeno nuclear Ki-67 e pelo *Proliferating cell nuclear antigen* (PCNA). O PCNA é uma proteína nuclear não histônica, que atua como um co-fator da DNA polimerase delta, sua presença no ciclo celular é observada na fase G1 tardia, com um pico na fase S e declínio durante a fase G2 e M⁽⁷⁷⁾. Neste estudo foi utilizado o MIB-1, que apresenta uma maior sensibilidade na detecção da proliferação celular que o PCNA, além de uma melhor correlação com os parâmetros histopatológicos⁽⁷⁸⁾.

O estudo da angiogênese pode ser feito pela IHQ, utilizando marcadores de células endoteliais, como o fator VIII, CD31, CD34 e BNH9^(29,79). O fator VIII é mais sensível como marcador de capilares normais⁽⁸⁰⁾. No presente estudo, foi utilizado o CD31 para a avaliação da angiogênese. O CD31 e o CD34 foram desenvolvidos para identificar o endotélio originado de células neoplásicas em tumores vasculares pouco diferenciados, onde se mostram superiores ao fator VIII⁽¹⁶⁾. Um estudo, avaliando amostras de colo uterino normal, NIC e CCE invasor, mostrou que o CD34 permitiu a detecção de maior número de

vasos que o fator VIII⁽⁸¹⁾. Outro estudo mostrou uma melhor quantificação da densidade microvascular com a utilização do anti-CD34 e BNH9 que com o anti-CD31⁽⁷⁹⁾. Outras variáveis na avaliação da angiogênese incluem as diferenças na fixação tecidual, o processamento das peças, as técnicas de coloração, a experiência do examinador em selecionar os pontos quentes vasculares, além da técnica de contagem⁽²⁵⁾.

5.2. Expressão das proteínas p53, Ki-67 e CD31 no tumor como fatores prognósticos

A sobrevida em cinco anos de pacientes com câncer de colo uterino estágio IB varia de 65 a 95%, o que motivou a pesquisa de fatores prognósticos que justificassem essa variação^(44,82). Idade, raça, nível socioeconômico, atividade sexual, imunossupressão e tabagismo são sugeridos como condições que influenciariam o prognóstico⁽³⁹⁾. Fatores relacionados ao tumor como estadiamento, volume tumoral, tipo histológico, invasão do corpo uterino, profundidade da invasão estromal, grau de diferenciação, invasão linfovascular, acometimento parametrial e metástase linfonodal são também considerados fatores prognósticos^(39,44).

O valor da expressão proteica do p53 como fator prognóstico no carcinoma invasor do colo uterino é controversa. A presença de uma superexpressão dessa proteína é evidenciada em 20 a 82% das neoplasias invasoras do colo uterino⁽⁸³⁻⁸⁷⁾. No presente estudo, em 55,3% das pacientes com CCE invasor foi identificada uma expressão

da proteína p53 em mais de 10% das células tumorais (graus 2 e 3). Não houve associação entre a expressão do p53 no tumor e o grau de diferenciação, a presença de invasão linfovascular, o tamanho tumoral, acometimento parametrial e metástase para linfonodos pélvicos. Um estudo envolvendo 109 pacientes com carcinoma do colo uterino, estádios IB a IIA, mostrou uma superexpressão da proteína p53 em 20% delas, sem associação com o prognóstico⁽⁸⁵⁾. Outro estudo, analisando 52 mulheres com CCE, estádios I a IV, mostrou 82% de positividade para a proteína p53. Aquelas com expressão positiva apresentavam pior prognóstico⁽⁸⁸⁾.

O presente estudo não mostrou uma correlação da expressão da proteína Ki-67 no tumor com o grau de diferenciação, invasão linfovascular, volume tumoral, presença de acometimento parametrial e metástase para os linfonodos pélvicos. A associação da proliferação celular com achados histopatológicos, prognóstico e resposta à radioterapia em pacientes com câncer de colo foi descrita na literatura^(23,89,90). Identificou-se uma correlação significativa entre a expressão da proteína Ki-67 com o tamanho tumoral, disseminação linfática e sobrevida livre de doença, mas não com o grau de diferenciação tumoral⁽⁸⁹⁾. Um outro estudo retrospectivo evidenciou uma menor sobrevida nas pacientes com maior expressão tumoral de Ki-67⁽²³⁾. Não houve correlação da expressão do Ki-67 com a idade, com o

tamanho tumoral, com o tipo histológico, e nem com a presença de invasão linfovascular ou metástases linfonodais⁽²³⁾.

A associação da angiogênese com o prognóstico de pacientes com carcinoma invasor do colo uterino tem sido descrita; entretanto a sua correlação com achados histopatológicos é controversa. No presente estudo, a expressão da proteína CD31 no tumor se associou significativamente com a presença de invasão linfovascular, tamanho tumoral e metástases para os linfonodos pélvicos. Uma associação da expressão do CD31 com a presença de metástases linfonodais e sobrevida de pacientes com CCE de colo uterino estágio IB foi demonstrada⁽³⁷⁾. Outro estudo mostrou uma associação entre angiogênese e a presença de invasão linfovascular, mas não com o grau de diferenciação, profundidade de invasão estromal, acometimento parametrial ou com metástases linfonodais⁽³⁶⁾. A avaliação de 130 pacientes com carcinoma do colo uterino, estádios I a IV, não evidenciou uma associação da expressão da proteína CD31 com o estadiamento clínico, tipo histológico, grau de diferenciação, invasão linfovascular ou presença de metástases linfonodais⁽⁹¹⁾.

5.3. Expressão das proteínas p53, Ki-67 e CD31 nas margens vaginais como marcadores de doença residual

A ressecção vaginal constitui um dos princípios da cirurgia radical para tratamento carcinoma invasor do colo uterino⁽⁴⁵⁾. Cerca de 58% das recorrências tumorais apresentam acometimento vaginal⁽⁴⁹⁻⁵³⁾. Apesar disso, o valor prognóstico da infiltração vaginal pelo tumor é controverso na literatura. Um estudo envolvendo 347 mulheres com carcinoma do colo uterino, estádios IB e IIA, mostrou uma correlação da sobrevida livre de doença com o volume tumoral, estadiamento clínico, profundidade de invasão estromal, número de linfonodos positivos e com a presença de acometimento tumoral da vagina ou das margens cirúrgicas⁽⁵⁵⁾. Outro estudo avaliando 345 pacientes com câncer de colo, estádios IB e II, não demonstrou uma correlação do acometimento vaginal ou do corpo uterino com a sobrevida⁽⁵⁴⁾. A importância das margens vaginais foi avaliada em um estudo envolvendo 1.223 pacientes com carcinoma do colo uterino, estádios IA2, IB e IIA, submetidas à histerectomia radical com linfadenectomia pélvica. Uma menor sobrevida e uma maior recorrência do tumor foi observada nos casos em que a margem de ressecção cirúrgica do tumor era menor que 0,5 cm. A radioterapia adjuvante nos casos de ressecção vaginal com margem de segurança igual ou inferior a 0,5 cm aumentou a sobrevida com diminuição significativa da recidiva tumoral na pelve. A margem vaginal foi

considerada um fator prognóstico e um dado importante na decisão para o tratamento adjuvante⁽⁴⁸⁾.

O câncer do colo uterino é uma doença de evolução lenta, que apresenta alterações celulares precursoras que podem ou não evoluir para um processo invasivo^(92,93). Uma característica fundamental de um marcador tumoral é a sua presença no tumor e ausência nos tecidos sem malignidade. Essa propriedade foi demonstrada no presente estudo, em que a expressão das proteínas p53, Ki-67 e CD31 foi significativamente superior no tumor em comparação ao colo normal. Alguns estudos sugerem que a expressão da proteína p53, o aumento da atividade mitótica e a aquisição de angiogênese são eventos progressivos no processo de carcinogênese do colo uterino. Um estudo mostrou que o colo uterino normal, o condiloma acuminado, a NIC I e a NIC II apresentam expressão negativa da proteína p53, enquanto, 15% das NIC III, 29% dos CCE invasores e 11% dos adenocarcinomas apresentam expressão positiva dessa proteína⁽⁹⁴⁾. Outro estudo mostrou uma expressão positiva da proteína p53 em 100% das amostras de NIC III e carcinoma invasor do colo uterino e em apenas 30% das amostras de NIC II⁽⁷⁴⁾. Ao contrário, um estudo retrospectivo evidenciou uma maior expressão da proteína p53 na NIC I em comparação à NIC II e III⁽⁹⁵⁾. Estudos avaliando amostras de colo uterino normal, NIC e carcinoma invasor mostram um aumento progressivo da proliferação celular avaliada pela IHQ para Ki-67, à medida que os tecidos apresentavam maiores

alterações histológicas^(24,96). A angiogênese foi avaliada, utilizando-se fator VIII ou CD31 em amostras teciduais de colo normal, NIC e carcinoma invasor do colo uterino. Foi evidenciado um aumento progressivo na densidade microvascular de um colo normal para a NIC e da NIC para o CCE invasor^(37,97).

As amostras vaginais com carcinoma invasor ou NIVA foram excluídas do estudo, pois a intenção era identificar marcadores biológicos de doença residual em casos histologicamente livres de tumor. Houve uma maior expressão das proteínas Ki-67, CD31 e p53 nas margens vaginais de pacientes com carcinoma invasor do colo uterino, histologicamente negativas, em comparação às margens vaginais de pacientes com colo normal. Um estudo avaliou a atividade de telomerase nas margens vaginais de pacientes com CCE e adenocarcinoma de colo e corpo uterino⁽⁹⁸⁾. A atividade de telomerase não se associou com a presença de malignidade histológica nas margens vaginais⁽⁹⁸⁾.

O tratamento do câncer do colo apresenta implicações na função sexual, sendo que 36 a 50% das pacientes evoluem com disfunções sexuais moderadas ou graves⁽⁹⁹⁻¹⁰³⁾. A histerectomia radical está relacionada a uma diminuição da lubrificação e a um encurtamento e diminuição da elasticidade vaginal⁽¹⁰⁴⁾. Foi proposta uma técnica cirúrgica para se evitar o encurtamento de vagina após a histerectomia radical⁽¹⁰⁵⁾. Não está definida a extensão de vagina que deve ser ressecada com segurança para que o controle local da doença seja eficaz. Um outro

objetivo do presente estudo foi avaliar a correlação das alterações moleculares nas margens vaginais com a sua localização em relação ao colo uterino. A expressão das proteínas p53, Ki-67 e CD31 foi semelhante nas regiões proximal e distal das margens vaginais de histerectomia radical em pacientes com carcinoma invasor do colo uterino.

5.4. Considerações finais

A identificação das proteínas p53, Ki-67 e CD31 utiliza uma metodologia simples, com a vantagem de poder ser realizada em tecidos parafinados. No entanto, é necessária uma padronização na forma de quantificação desses marcadores. O desenvolvimento de novas técnicas, como o *microarray*, pode propiciar o estudo de outras proteínas envolvidas no processo de carcinogênese do colo uterino.

Dos marcadores estudados, a proteína CD31 foi o que melhor se correlacionou com a agressividade tumoral, determinada pelo tamanho tumoral maior que 4 cm, presença de invasão linfovascular e metástases para os linfonodos pélvicos. O valor da maior expressão das proteínas p53, Ki-67 e CD31 nas margens vaginais de histerectomia radical, histologicamente negativas, de pacientes com carcinoma invasor do colo uterino em comparação às margens vaginais de pacientes com colo uterino normal será evidenciado apenas com o seguimento das pacientes. O acompanhamento dessas mulheres poderá mostrar se as recidivas ocorrerão com mais frequência nas pacientes cujas

margens vaginais apresentavam uma maior expressão desses marcadores. A ausência de diferenças das expressões do p53, Ki-67 e CD31 entre a região proximal e a distal das margens vaginais de pacientes com CCE invasor do colo uterino sugere não haver uma relação desses marcadores com a proximidade do tumor.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

O presente estudo permite concluir que:

- O CCE invasor do colo uterino apresenta uma maior expressão das proteínas p53, Ki-67 e CD31 do que no colo uterino normal de pacientes sem doença uterina maligna.
- A presença de invasão linfovascular, o tamanho tumoral e a ocorrência de metástases para os linfonodos pélvicos correlacionam-se com uma maior expressão da proteína CD31 no tumor de pacientes com CCE invasor do colo uterino. Não foi detectada associação entre a expressão tumoral do CD31 com o grau de diferenciação e o acometimento parametrial. A expressão das proteínas p53 e Ki-67 no tumor não se associou aos achados anatomopatológicos estudados.
- As margens vaginais de histerectomia radical de pacientes com carcinoma invasor do colo uterino, histologicamente negativas, apresentam uma maior expressão das proteínas o Ki-67, CD31 e p53 em comparação às margens vaginais de pacientes com colo uterino normal.
- As regiões proximal e distal das margens vaginais, após histerectomia radical em pacientes com CCE invasor do colo uterino, não

apresentam diferenças em relação à expressão das proteínas p53, Ki-67 e CD31.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70.
2. Stewart BW, Kleihues P, editors. *World cancer report*. Lyon: IARC Press; 2003.
3. Tjalma WA, Weyler JJ, Bogers JJ, Pollefliet C, Baay M, Goovaerts CG, et al. The importance of biological factors (bcl-2, bax, p53, PCNA, MI, HPV and angiogenesis) in invasive cervical cancer. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001; 97: 223-30.
4. Stanley MA. Human papillomavirus and cervical carcinogenesis. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2001; 15: 663-76.
5. Hahn WC, Weinberg RA. Rules for making human tumor cells. *N Engl J Med* 2002; 347:1593-603.
6. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 1998; 396: 643-9.
7. Clurman B, Groudine M. Tumour-suppressor genes: Killer in search of a motive? *Nature* 1997; 389: 122-3.
8. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature* 2000; 408: 307-10.

* *International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver, desenvolvidas pela US National Library of Medicine (JAMA 1997; 227: 927-34)*

9. Lane DP. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992; 358: 15-6.
10. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. 4^a ed. New York: Garland Science; 2002.
11. Carvalho HF, Recco-Pimentel SM. *A célula* 2001. São Paulo: Manole; 2001.
12. Gao CY, Zelenka PS. Cyclins, cyclins-dependent kinasis and differentiation. *BioEssays* 1997; 19: 307-15.
13. Weinert T. DNA damage and checkpoint pathways: molecular anatomy and interactions with repair. *Cell* 1998; 94: 555-8.
14. Orr-Weaver TL, Weinberg RA. A checkpoint on the road to cancer. *Nature* 1998; 392: 223-4.
15. Nakamura S, Gomyo Y, Roth JA. C-terminus of p53 is required for G(2) arrest. *Oncogene* 2002; 27: 2102-7.
16. Dabbs D.J. *Diagnostic immunohistochemistry*. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2002.
17. Jee SH, Won SY, Yun JE, Lee JE, Park JS, Ji SS. Polymorphism p53 codon-72 and invasive cervical cancer: a meta-analysis. *Int J Gynecol Obstet*. In Press December 2003.

18. Garzetti GG, Ciavattini A, Lucarini G, Goteri G, De Nictolis M, Biagini G. MIB-1 immunostaining in cervical carcinoma of young patients. *Gynecol Oncol* 1997; 67: 184-7.
19. Viberti L, Papotti M, Abbona GC, Celano A, Filosso PL, Bussolati G. Value of Ki-67 immunostaining in preoperative biopsies of carcinomas of the lung. *Hum Pathol* 1997; 28: 189-92.
20. Mochen C, Giardini R, Costa A, Silvestrini R. MIB-1 and S-phase cell fraction predict survival in non-Hodgkin's lymphomas. *Cell Prolif* 1997; 30: 37-47.
21. Jansen RL, Hupperets PS, Arends JW, Joosten-Achjanie SR, Volovics A, Schouten HC, et al. MIB-1 labelling index is an independent prognostic marker in primary breast cancer. *Br J Cancer* 1998; 78: 460-5.
22. Abramovich CM, Prayson RA. MIB-1 labeling indices in benign, aggressive, and malignant meningiomas: a study of 90 tumors. *Hum Pathol* 1998; 29: 1420-7.
23. Ming-Tak HD, Hsu CY, Chiang H. MIB-1 Labeling index as a prognostic indicator for survival in patients with FIGO stage IB squamous cell carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol* 2000; 76: 97-102.

24. Nair P, Nair MK, Jayaprakash PG, Pillai MR. Decreased Programmed Cell Death in the Uterine Cervix Associated with High Risk Human Papillomavirus Infection. *Pathol Oncol Res* 1999; 5: 95-103.
25. Abulafia O, Triest W, Sherer DM. Angiogenesis in malignancies of the female genital tract. *Gynecol Oncol* 1999; 72: 220-31.
26. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; 407:249-57.
27. Gullino PM. Angiogenesis and oncogenesis. *J Natl Cancer Inst* 1978; 61: 639-43.
28. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 4-6.
29. Sauer G, Deissler H. Angiogenesis: prognostic and therapeutic implications in gynecologic and breast malignancies. *Curr Op Obstet Gynecol* 2003; 15: 45-9.
30. Klagsbrun M, D'Amore PA. Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 1996; 1: 259-70.
31. Smith-McCune K, Zhu YH, Hanahan D, Arbeit J. Cross-species comparison of angiogenesis during the pre-malignant stages of squamous carcinogenesis in human cervix and K14-HPV 16 transgenic mice. *Cancer Res* 1997; 57: 1294-300.

32. Hernandez P, Merino N, Lopez-Ocejo O, Arana MJ. A mouse fibroblast cell model to study human papillomavirus-associated tumorigenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 270: 119-24.
33. Bequet-Romero M, López-Ocejo O. Angiogenesis modulators expression in culture cell lines positives for HPV-16 oncoproteins. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 277: 55-61.
34. Guidi AJ, Abu-Jawdeh G, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Dvorak HF, et al. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) expression and angiogenesis in cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 1237-45.
35. Abulafia O, Triest W, Sherer DM. Angiogenesis in squamous cell carcinoma in situ and microinvasive carcinoma of the uterine cervix. *Obstet Gynecol* 1995; 88: 927-33.
36. Wiggins DL, Granai CO, Steinhoff MM, Calabresi P. Tumor angiogenesis as a prognostic factor in cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 1995; 56: 353-6.
37. Deltas A, Moch H, Schultheiss E, Feichter G, Almendral AC, Gudat F, Torhorst J. Angiogenesis in Cervical Neoplasia: microvessel quantitation in precancerous lesions and invasive carcinomas with clinicopathological correlations. *Gynecol Oncol* 1997; 67: 27–33.

38. Parkin DM., Bray FI., Devesa SS., editor. Cancer burden in the year 2000. The global picture. Eur J Cancer 2001; 37 Suppl: S4-S66.
39. Waggoner SE. Cervical cancer. Lancet 2003; 361: 2217-25.
40. Ministério da Saúde. Estimativa de incidência e mortalidade por câncer no Brasil. Disponível em URL: <http://www.inca.gov.br>. Acesso em: 10 out. 2003.
41. Ferenczy A, Franco E. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia. Lancet Oncol 2002; 3: 11-6.
42. Araujo Souza PS, Villa LL. Genetic susceptibility to infection with human papillomavirus and development of cervical cancer in women in Brazil. Mutat Res 2003; 544: 375-83.
43. Pinto AP, Tulio S, Cruz OR. HPV Cofactors in cervical carcinogenesis. Rev Assoc Med Bras 2002; 48: 73-8.
44. ACOG Practice Bulletin. Diagnosis and treatment of Cervical Carcinomas Am J Obstet Gynecol 2002; 99: 855-67.
45. Shingleton HM, Thompson JD. Cancer of the Cervix. In: Rock JA, Thompson JD. Te Linde's Operative Gynecology. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997: 1413-26.
46. Bonney V. The treatment of carcinoma of the cervix by Wetheim's Operation. Surg Gynecol Obstet 1935; 30: 815-30.

47. Piver MS, Rutledge FN, Smith PJ. Five classes of extended hysterectomy of women with cervical cancer. *Obstet Gynecol* 1974; 44: 265-67.
48. Estape ER, Angioli R, Madrigal M, Janicek M, Gomez C, Penalver M, et al. Close vaginal margins as a prognostic factor after radical hysterectomy. *Gynecol Oncol* 1998; 68: 229-32.
49. Krebs HB, Helmkamp BF, Sevin BU, Poliakoff SR, Nadji M, Averette HE. Recurrent cancer of the cervix following radical hysterectomy and pelvic node dissection. *Obstet Gynecol* 1982; 59: 422-7.
50. Burke TW, Hoskins WJ, Heller PB, Shen MC, Weiser EB, Park RC. Clinical patterns of tumor recurrence after radical hysterectomy in stage IB cervical carcinoma. *Obstet Gynecol* 1987; 69: 382-5.
51. Larson DM, Copeland LJ, Stringer CA, Gershenson DM, Malone JM, Edwards CL. Recurrent cervical carcinoma after radical hysterectomy. *Gynecol Oncol* 1988; 30: 381-7.
52. Potter ME, Alvarez RD, Gay FL, Shingleton HM, Soong SJ, Hatch KD. Optimal therapy for pelvic recurrence after radical hysterectomy for early stage cervical cancer. *Gynecol Oncol* 1990; 37: 74-7.
53. Ijaz T, Eifel PJ, Burke T, Oswald MJ. Radiation Therapy of Pelvic Recurrence after Radical Hysterectomy for Cervical Carcinoma. *Gynecol Oncol* 1998; 70: 241-6.

54. Kamura T, Tsukamoto N, Tsuruchi N, Saito T, Matsuyama T, Akazawa K, et al. Multivariate analysis of the histopathologic prognostic factors of cervical cancer in patients undergoing radical hysterectomy. *Cancer* 1992; 69: 181-6.
55. Sevin BU, Nadji M, Lampe B, Lu Y, Hilsenbeck S, Koechli OR, et al. Prognostic factors of early stage cervical treated by radical hysterectomy. *Cancer Supplement* 1995; 76: 1978-86.
56. Shepherd JH. Cervical and vulva cancer: changes in FIGO definitions of staging. *Br J Obstet Gynaecol* 1996; 103: 405-6.
57. Benedet JL, Ngan HYS, Hacker NF. Staging classifications and clinical practice guidelines of gynaecologic cancers by FIGO Committee on Gynecologic Oncology and IGCS Guidelines Committee. Second edition. November 2003.
58. Heaney NS. A report of 565 vaginal hysterectomies performed for benign pelvic disease. *Am J Obstet Gynecol* 1934; 28:751.
59. Poulsen H, Taylor C. Histological typing of female genital tract tumors. Geneva: World Health Organization; 1975.
60. Zaino RJ, Ward S, Delgado G, Bundy B, Gore H, Fetter G, et al. Histopathologic predictors of the behavior of surgically treated stage IB squamous cell carcinoma of the cervix. A Gynecologic Oncology Group study. *Cancer* 1992; 69: 1750-8.

61. Berek JS; Hacker NF. Practical Gynecologic Oncology. 3. ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 2000.
62. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled (PAP) procedures. J Histochem Cytochem 1981; 29: 577-80.
63. Gown AM, Wever N, Battifora H. Microwave-based antigenic unmasking: a revolutionary new technique for routine immunohistochemistry. App Immunohistochem 1993; 1: 256-66.
64. Ahn WS, Bae SM, Lee JM, Namkoong SE, Han SJ, Cho YL, et al. Searching for pathogenic gene functions to cervical cancer. Gynecol Oncol. In Press February 2004.
65. Geisler JP, Geisler HE. Tumor markers and molecular biological markers in gynecologic malignancies. Curr Opin Obstet Gynecol 2001; 13: 31-9.
66. Haerslev T, Jacobsen GK, Zedeler K. Correlation of growth fraction by Ki-67 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunohistochemistry with histopathological parameters and prognosis in primary breast carcinomas. Breast Cancer Res Treat; 1996; 37: 101-13.

67. Dettmar P, Harbeck N, Thomssen C, Pache L, Ziffer P, Fizi K, et al. Prognostic impact of proliferation-associated factors MIB1 (Ki-67) and S-phase in node-negative breast cancer. *Br J Cancer* 1997; 75:1525-33.
68. Tjalma W, Van Marck E, Weyler J, Dirix L, Van Daele A, Goovaerts G, et al. Quantification and prognostic relevance of angiogenic parameters in invasive cervical cancer. *Br J Cancer* 1998; 78:170-4.
69. Suzuki M, Tsukagoshi S, Saga Y, Ohwada M, Sato I. Assessment of proliferation index with MIB-1 as a prognostic factor in radiation therapy for cervical cancer. *Gynecol Oncol* 2000; 79: 300-4.
70. Obermair A, Tempfer C, Wasicky R, Kaider A, Hefler L, Kainz C. Prognostic significance of tumor angiogenesis in endometrial cancer. *Obstet Gynecol* 1999; 93: 367-71.
71. Jain D, Srinivasan R, Patel FD, Gupta SK. Evaluation of p53 and Bcl-2 expression as prognostic markers in invasive cervical carcinoma stage IIb/III patients treated by radiotherapy. *Gynecol Oncol* 2003; 88: 22-8.
72. Koyamatsu Y, Yokoyama M, Nakao Y, Fukuda K, Saito T, Matsukuma K, et al. A comparative analysis of human papillomavirus types 16 and 18 and expression of p53 gene and Ki-67 in cervical, vaginal, and vulvar carcinomas. [Gynecol Oncol](#) 2003; 90: 547-51.

73. Mello ES, Alves VAF. Determinação da fração de proliferação celular no carcinoma de mama pela marcação imunoistoquímica do antígeno nuclear Ki-67: comparação dos métodos quantitativo e semi-quantitativo. J Bras Patol 1999; 35: 200-5.
74. Grace VMB, Shalini JV, Sree lekha TT, Devaraj SN, Devaraj H. Co-overexpression of p53 and bcl-2 proteins in HPV-induced squamous cell carcinoma of the uterine cervix. Gynecol Oncol 2003; 91: 51-8.
75. Wynford-Thomas D. p53 in tumour pathology: can we trust immunohistochemistry? J Pathol 1992; 166: 329-30.
76. Hall PA, Lane DP. p53 in tumour pathology: can we trust immunohistochemistry ? J Pathol 1994; 172: 1-4.
77. Hofstädter F, Knüchel R, Rüschoff J. Cell proliferation assessment in oncology. Virchows Archiv 1995; 427: 323-41.
78. Lindboe CF, Torp SH. Comparison of Ki-67 equivalent antibodies. J Clin Pathol 2002; 55: 467-7.
79. Vieira SC, Zeferino LC, Silva BB, Pinto GA, Vassallo J, Carasan GAF, et al. Quantification of angiogenesis in cervical cancer: a comparison among three endothelial cell markers. Gynecol Oncol. In Press March 2004.
80. Appleton MA, Attanoos RL, Jasani B. Thrombomodulin B as a marker of vascular and lymphatic tumours. Histopathology 1996; 29: 153-7.

81. Calux NMCT, Ribalta JCL, Focchi JNSJ, Baracat EC, Lima GR. Angiogênese na neoplasia escamosa do colo uterino: comparação entre dois marcadores de células endoteliais. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2001; 23: 313-9.
82. Creasman WT, Kohler MF. Is lymph vascular space involvement an independent prognostic factor in early cervical cancer? *Gynecol Oncol* 2004; 92: 525-9.
83. Borresen AL, Helland A, Nesland J, Holm R, Trope C, Kaern J. Papillomavirus, p53, and cervical cancer. *Lancet* 1992; 339: 1350-1.
84. Lambkin HA, Mothersill CM, Kelehan P. Variations in immunohistochemical detection of p53 protein overexpression in cervical carcinomas with different antibodies and methods of detection. *J Pathol* 1994; 172: 13-8.
85. Kainz CH, Kohlberger P, Gitsch G, Sliutz G, Breitenacker G, Reinthaller A. Mutant p53 in patients with invasive cervical cancer stages IB to IIB. *Gynecol Oncol* 1995; 57: 212-4.
86. Ebara T, Mitsuhashi N, Saito Y, Sakurai H, Hasegawa M, Takahashi M, et al. Prognostic significance of immunohistochemically detected p53 protein expression in stage IIb squamous cell carcinoma of the uterine cervix treated with radiation therapy alone. *Gynecol Oncol* 1996; 63: 216-8.

87. Skomedal H, Kristensen GB, Lie AK, Holm R. Aberrant expression of the cell cycle associated proteins TP53, MDM2, p21, p27, cdk4, cyclin D1, Rb and EGFR in cervical carcinomas. *Gynecol Oncol* 1999; 73: 223-8.
88. Nakano T, Oka K, Taniguchi N. Manganese superoxide dismutase expression correlate with p53 status and local recurrence of cervical carcinoma treated with radiation therapy. *Cancer Res* 1996; 56: 2771-5.
89. Garzetti GG, Ciavattini A, Lucarini G, Goteri G, De Nictolis M, Muzzioli M, et al. MIB 1 immunostaining in stage I squamous cervical carcinoma: relationship with natural killer cell activity. *Gynecol Oncol* 1995; 58: 28-33.
90. Zaghoul MS, Naggar ME, Deeb AE, Khaled H, Mokhtar N. Prognostic implication of apoptosis and angiogenesis in cervical uteri cancer. *Int J Rad Biol Phys* 2000; 48: 1409-15.
91. Tjalma W, Weyler J, Weyn B, Van Marck E, Van Daele A, Van Dam P, et al. The association between vascular endothelial growth factor, microvessel density and clinicopathological features in invasive cervical cancer. *Eur J Obstet Gynecol Rep Biol* 2000; 92: 251-7.
92. Holowaty P, Miller AB, Rohan T, To T. Natural history of dysplasia of the uterine cervix. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 252-8.

93. Rowlands PK, Lopes AB. Invasive carcinoma of the cervix. *Curr Obstet Gynaecol* 2001; 11: 172-7.
94. Dimitrakakis C, Kymionis G, Diakomanolis E, Papaspyrou I, Rodolakis A, Arzimanoglou I, et al. The possible role of p53 and bcl-2 expression in cervical carcinomas and their premalignant lesions. *Gynecol Oncol* 2000; 77: 129-36.
95. Vassallo J, Derchain SF, Pinto GA, Martinez EZ, Syrjänen KJ, Andrade LA. High risk HPV and p53 protein expression in cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Gynaecol Obstet* 2000; 71: 45-8.
96. Keating JT, Cviko A, Riethdorf S, Riethdorf L, Quade BJ, Sun D, et al. Ki-67, cyclin E and p16NK4 are complimentary surrogate biomarkers for human papilloma virus-related cervical neoplasia. *Am J Surg Patol* 2001; 25: 884-91.
97. Dobbs SP, Brown LJR, Ireland D, Abrams KR, Murray JC, Gatter K, et al. Platelet-derived endothelial cell growth factor expression and angiogenesis in cervical intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma of the cervix. *Ann Diagn Pathol* 2000; 4: 286-92.
98. Triginelli SA. Atividade de telomerase nas neoplasias uterinas, nas margens de ressecção vaginal e nos linfonodos pélvicos [tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina da UNESP; 2002.
99. Abitbol MM, Davenport JH. Sexual dysfunction after therapy for cervical carcinoma. *Am J Obstet Gynecol* 1974; 119: 181-9.

100. Abitbol MM, Davenport JH. The irradiated vagina. *Obstet Gynecol* 1974; 44: 249-56.
101. Flay LD, Matthews JH. The effects of radiotherapy and surgery on the sexual function of women treated for cervical cancer. *Int J Rad Oncol* 1995; 31: 399-404.
102. Anderson B, Lutgendorf S. Quality of life as an outcome measure in gynecologic malignancies. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2000, 12: 21-6.
103. Stead ML. Sexual dysfunction after treatment for gynaecologic and breast malignancies. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2003, 15: 57-61.
104. Bergmark K, Avall-Lundqvist E, Dickman PW, Henningsohn L, Steineck G. Vaginal changes and sexuality in women with a history of cervical cancer. *N Eng J Med* 1999; 340: 1383-9.
105. Yamamoto R, Okamoto K, Ebina Y, Shirato H, Sakuragi N, Fujimoto S. Prevention of vaginal shortening following radical hysterectomy. *BJOG* 2000; 107: 841-5.

8. ANEXOS

Anexo I - Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa da UFMG (COEP)

 Universidade Federal de Minas Gerais <i>Comitê de ética em pesquisa da UFMG - COEP</i>	
Parecer nº 135/02	
Interessado: Agnaldo Lopes da Silva Filho Depto de Ginecologia e Obstetrícia - FM/UFMG	
Voto:	
O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou no dia 21 de agosto de 2002 o projeto de pesquisa intitulado « Avaliação da angiogênese, P53 e MIB-1 na margem vaginal de ressecção do carcinoma invasor do colo uterino » e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do referido projeto. O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.	
 Prof. Dr. Dirceu Bartolomeu Greco Presidente do COEP/UFMG	
<i>Av. Alfredo Balena, 110 – 1º andar Cep 30.130-100 – Belo Horizonte-MG</i> <i>Telefone: (031) 248-9364 - FAX: (031) 248 -9380 e-mail: coep@reitoria.ufmg.br</i>	

voto 135

Anexo II - Consentimento Livre e Esclarecido

1. IDENTIFICAÇÃO DA PACIENTE:

Nome:

Registro:

Idade:

Carteira de identidade:

Endereço:

Telefone:

2. DECLARO QUE:

1. O Dr. Agnaldo Lopes da Silva Filho explicou-me e eu entendi que vou participar de uma pesquisa médica com o objetivo de avaliar alguns testes diagnósticos para o câncer do colo do útero. Serei submetida à técnica cirúrgica convencional para o tratamento do câncer do colo ou dos miomas uterinos, como descrita abaixo:

2a. DESCRIÇÃO TÉCNICA DOS PROCEDIMENTOS:

A descrição técnica dos procedimentos deste trabalho pode ser dividida em duas etapas. A primeira etapa refere-se ao tratamento cirúrgico do carcinoma do colo uterino ou dos miomas uterinos. Esta etapa do tratamento cirúrgico baseia-se em duas técnicas:

- 1- Retirada do útero de maneira radical, isto é útero, ovários tubas e porção superior da vagina, associada à retirada dos gânglios pélvicos bilateralmente nas pacientes com câncer de colo.
- 2- Retirada do útero pela vagina nas pacientes com miomas uterinos.

Essas técnicas são procedimentos padrões, já bem estabelecidos na área de cirurgia pélvica ginecológica. Nos procedimentos cirúrgicos utilizados não será acrescentada nenhuma modificação técnica que determine novo risco para a paciente.

A segunda etapa do trabalho diz respeito à retirada de biópsias de vagina (fragmentos de mucosa vaginal) e aos procedimentos laboratoriais que visam determinar a angiogênese, p53 e MIB-1 nessas amostras. Essas biópsias de vagina serão feitas após a retirada do útero no caso das pacientes com câncer do colo. Naquelas com miomas uterinos serão retirados dois pequenos fragmentos de vagina.

2b. OBJETIVO DOS PROCEDIMENTOS:

O objetivo é o estudo de alguns testes diagnósticos (p53, Ki-67 e CD31) no câncer de colo uterino.

2c. DESCRIÇÃO DOS INSUCESSOS:

O único insucesso possível é o da retirada do fragmento do colo uterino e de vagina sem a obtenção das análises previstas, o que em nada determinará prejuízo para mim. Os

procedimentos laboratoriais para a pesquisa do p53, Ki-67 e CD31 são realizados sem a minha participação direta.

2d. DESCRIÇÃO DAS COMPLICAÇÕES DOS MÉTODOS:

As complicações serão as mesmas relacionadas ao procedimento cirúrgico proposto (histerectomia radical ou vaginal).

Nas pacientes com câncer de colo, não haverá aumento do risco de complicações devido à retirada do fragmento de colo uterino ou vagina. Naquelas pacientes com miomas uterinos, apesar de todos os cuidados, existe um risco mínimo de sangramento.

No caso de ocorrerem complicações, elas serão tratadas pela mesma equipe cirúrgica.

2e. DESCRIÇÃO DA ANESTESIA:

Foi-me explicado haver necessidade de me submeter à anestesia. O tipo de anestesia será a anestesia geral ou bloqueio (raque ou peridural) com monitorização de todos os parâmetros orgânicos vitais.

2f. DESTINO DA PEÇA OPERATÓRIA:

A peça operatória retirada será enviada para estudo no Departamento de Anatomia Patológica da UFMG. Fragmentos das amostras do tumor, colo uterino e margens vaginais serão encaminhados ao Laboratório de Imunohistoquímica da Faculdade de Medicina de Botucatu. Nesse laboratório será realizada a pesquisa do p53, Ki-67 e CD31.

3. FORAM-ME DEVIDAMENTE EXPLICADOS A INTERVENÇÃO, OS RISCOS (COMPLICAÇÕES) E AS POSSIBILIDADES ALTERNATIVAS DE UM MODO CLARO (FÁCIL ENTENDIMENTO PARA UMA PESSOA LEIGA, OU SEJA, NÃO MÉDICA OU PROFISSIONAL DE SAÚDE).
4. NÃO HAVERÁ RESSARCIMENTO OU INDENIZAÇÕES.
5. RECEBI TODAS AS INFORMAÇÕES QUE DESEJAVA CONHECER E A POSSIBILIDADE DE FAZER PERGUNTAS E QUESTIONAR DÚVIDAS.
6. ASSIM, DECLARO AGORA QUE ESTOU SATISFEITA COM A INFORMAÇÃO RECEBIDA E QUE COMPREENDO O ALCANCE E RISCOS DO TRATAMENTO.
7. RESERVO-ME EXPRESSAMENTE O DIREITO DE REVOGAR A QUALQUER MOMENTO MEU CONSENTIMENTO ANTES QUE O PROCEDIMENTO OBJETO DESTE DOCUMENTO SE REALIZE.
8. POR TAL RAZÃO E NESSAS CONDIÇÕES, PARTICIPAREI DESSA PESQUISA E QUE O MATERIAL CIRÚRGICO RETIRADO SEJA SUBMETIDO À PESQUISA DO P53, Ki-67 E CD31.

TELEFONE DE CONTATO:

Dr. Agnaldo Lopes da Silva Filho: (0XX31) 32489430 / 99718010

COEP: (0XX31) 2489822

Cidade:

Data:

Assinatura do médico

Assinatura da paciente

Testemunha

Testemunha

Declaro que é possível, a qualquer momento antes da cirurgia, revogar o meu consentimento.

Revogo o consentimento prestado no dia E afirmo que não desejo prosseguir na pesquisa e tratamento que me foi proposto, que dou como finalizado nesta data.

Cidade:

Data:

Assinatura do médico

Assinatura da paciente

Testemunha

Testemunha

Anexo III - Estadiamento do carcinoma de colo uterino (FIGO 1994)

Estádio I: o carcinoma está restrito ao colo do útero.

IA: carcinoma invasor identificado apenas microscopicamente. A invasão é limitada ao estroma com uma profundidade máxima de 5mm e diâmetro inferior a 7mm.

IA1: invasão do estroma inferior a 3mm em profundidade e inferior a 7mm em diâmetro.

IA2: invasão do estroma superior a 3mm e inferior a 5mm em profundidade com diâmetro inferior a 7mm.

IB: lesões clínicas confinadas ao colo ou lesões pré-clínicas maiores que o estágio IA.

IB1: lesões clínicas menores que 4 cm.

IB2: lesões clínicas maiores que 4 cm.

Estádio II: o carcinoma ultrapassa o colo, mas não se estende à parede pélvica lateral. O tumor envolve o 1/3 superior da vagina.

IIA: sem óbvio acometimento do paramétrio.

IIB: acometimento óbvio do paramétrio, não atingindo a parede pélvica lateral.

Estádio III: o carcinoma estende-se à parede pélvica lateral. No toque retal, não se evidencia espaço livre de neoplasia entre o tumor e a parede lateral da pelve. O 1/3 inferior da vagina é acometido. Todos os casos com hidronefrose ou insuficiência renal devem ser incluídos, exceto se atribuídas a outras causas.

IIIA: tumor envolve o 1/3 inferior da vagina, sem extensão à parede pélvica lateral.

IIIB: tumor se estende à parede pélvica lateral e/ou causa hidronefrose ou insuficiência renal.

Estádio IV: tumor invade a mucosa da bexiga ou reto e/ou ultrapassa a pelve óssea.

IVA: disseminação do tumor aos órgãos pélvicos adjacentes (bexiga e reto).

IVB: disseminação do tumor à distância.

Anexo IV - Descrição cirúrgica da histerectomia radical

1. Laparotomia mediana infra e supra-umbilical com avaliação das estruturas abdominais e pélvicas.
2. Ligadura dos ligamentos redondos e infundíbulos pélvicos; abertura lateral do peritônio parietal com dissecação dos espaços paravesical e pararetal; e identificação dos ligamentos cardinal e útero-sacro.
3. Identificação do ureter no espaço retroperitoneal e, em seguida, dissecação do túnel do ureter com ligadura do ligamento vésico-uterino e do pilar vesical, e liberação do ureter até a sua penetração na musculatura vesical.
4. Abertura do septo reto-vaginal com separação do reto da porção proximal da vagina anteriormente e do ligamento útero-sacro lateralmente.
5. Ligadura do ligamento cardinal no seu 1/3 lateral próximo à parede pélvica lateral.
6. Ligadura dos paracolpos com abertura da cavidade vaginal e retirada do 1/3 superior da vagina útero e anexos em monobloco.
7. Fechamento da vagina com sutura contínua.
8. Linfadenectomia pélvica, iniciando a dissecação pela cadeia linfonodal dos vasos ilíacos comuns; em seguida, dos vasos ilíacos externos, internos e fossas obturatórias.
9. Síntese da parede abdominal por planos.

SUMMARY

9. SUMMARY

Introduction: The process of carcinogenesis implicates, among other factors, in the acquisition of mutant alleles of tumor-suppressor genes, the increase in cell proliferation and angiogenesis. This study was performed to evaluate the expression of p53, Ki-67 and CD31 in the tumor and in the vaginal margins of radical hysterectomy in patients with stage IB squamous cell carcinoma of the cervix.

Methods: Samples were taken from the tumor or normal cervix, anterior and posterior vaginal margins of 30 patients with stage IB (FIGO) squamous cell carcinoma (SCC) submitted to radical hysterectomy (study group) and 30 patients with uterine myoma submitted to vaginal hysterectomy (control group). The tissue was fixed in formalin, included in paraffin and processed for immunohistochemical evaluation of p53, Ki-67 and CD31.

Results: The age of the patients ranged from 27 to 73 years (49.4 ± 11.7 years). The expression of p53, Ki-67 and CD31 is significantly higher in the tumor than in the benign cervix. The vaginal margins of radical hysterectomy in patients with cervical carcinoma, histologically negative for neoplasia, have a higher expression of these markers in comparison to the vaginal margins of patients with benign cervix submitted to vaginal hysterectomy. The expression of CD31 in the tumor was associated with lymphatic vascular space invasion, tumor size and pelvic lymph node

metastasis, but not with grade of differentiation and parametrium involvement. There was no association between tumoral p53 and MIB-1 expression with the histopathological findings analyzed. There was no difference in p53, Ki-67 and CD31 expression between the proximal and distal vaginal margins in patients with carcinoma of the cervix.

Conclusions: The expression of p53, Ki-67 and CD31 is higher in the tumor and in the vaginal margins of patients with SCC of the cervix than in the cervix and vaginal margins of the control group. The expression of CD31 in the tumor correlates with lymphatic vascular space invasion, tumor size and pelvic lymph node metastasis.