



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Silas Otero Reis Salum

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA IMP3 COM AS
CLAUDINAS 3 E 4 NA AVALIAÇÃO PROGNÓSTICA E
MORFOLÓGICA DO CÂNCER DE ENDOMÉTRIO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia.

Orientador: Prof. Dr. Agnaldo Lopes da Silva Filho
Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida Custódio Domingues

**Botucatu
2016**

Silas Otero Reis Salum

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA IMP3 COM AS
CLAUDINAS 3 E 4 NA AVALIAÇÃO PROGNÓSTICA E
MORFOLÓGICA DO CÂNCER DE ENDOMÉTRIO

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de
Mestre em Ginecologia, Obstetrícia e
Mastologia.

Orientador: Prof. Dr. Agnaldo Lopes da Silva Filho
Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida Custódio Domingues

Botucatu
2016

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

Salum, Silas Otero Reis.

Análise da expressão da IMP3 com as claudinas 3 e 4 na avaliação prognóstica e morfológica do câncer de endométrio / Silas Otero Reis Salum. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Agnaldo Lopes da Silva Filho

Coorientador: Maria Aparecida Custódio Domingues

Capes: 40101150

1. Endométrio - Câncer - Prognóstico. 2. Morfologia.
3. Adenocarcinoma. 4. Imunohistoquímica.

Palavras-chave: Câncer de endométrio; IMP3 claudina 3 claudina 4; Imunoistoquímica; Morfologia; Prognóstico.

*A alegria está na luta, na tentativa,
no sofrimento envolvido e não na
vitória propriamente dita.*

Mahatma Gandhi

O que transforma qualquer ato em algo extraordinário é o fato de fazermos aquilo com o coração e o que transforma qualquer vida numa existência extraordinária é o fato de ser vivida com amor."

Mark Sanborn

"Eis os tesouros exteriores: descobrir um amor supremo, ter inteligência para ver as próprias faltas, estar consciente de tudo que acontece na vida, ser grato pelas bênçãos recebidas."

Paulo Coelho



Dedicatória

Agradeço por ter um lar amoroso, que dá um sentido especial a minha vida, meus sonhos e conquistas.

*À minha esposa **Luciana**,*

Que divide não só a missão de criarmos nossos filhos para que sejam pessoas felizes e contribuam para um mundo melhor, mas também compartilha sua vida com todos os seus momentos, me ensinando mais do que eu poderia imaginar, com amor e dedicação.

*À **Júlia** e **Arthur**,*

O maior presente que Deus nos concedeu, por me fazerem sempre lembrar que eu tenho motivos para agradecer e retribuir tudo de bom que recebi.

*Aos Meus Pais, **Maria José** e **Silas** e Tia **Vera**,*

Pelo apoio e por todos ensinamentos e exemplos de ética e amor ao próximo; por me permitirem ser médico.

*Ao meu sogro, **Kandir***

Pelo apoio e incentivo de sempre, exemplo de devoção e amor à medicina e inesgotável busca de conhecimento.

*À minha Sogra **Ema Amélia**,*

Por toda a atenção e carinho, por cuidar tão bem de meus filhos.



Agradecimentos Especiais

Ao Profº Agnaldo Lopes da Silva Filho,

Um grande professor que me aceitou e dedicou parte de seu tempo para me passar de forma simples e objetiva um pouco de seu enorme conhecimento. Um exemplo de carreira dedicada à pesquisa e constante aprimoramento.

À Profª Maria Aparecida Custódio Domingues,

Agradeço a toda dedicação e paciência, por ter me dado um exemplo que sempre lembrarei caso siga a carreira de ensino e pesquisa, de extrema competência e dedicação, aliado ao amor e convicção pelo que faz.

*À todas as **pacientes** que confiaram suas vidas aos meus cuidados, em um momento doloroso do diagnóstico e tratamento do câncer. Cada uma delas me fez crescer e buscar ser cada vez melhor, como médico e ser humano.*



Agradecimientos

À todos os brilhantes professores da pós graduação da FMB, que sem exceção contribuíram muito para minha formação.

*Aos amigos e colegas **Jorge Nahás Neto** e **Ângela F. S. Tonon**, por terem me possibilitado ser orientado por professores tão especiais.*

*Ao Profº **Eduardo Batista Cândido** da UFMG, por ter cedido o seu tempo para revisão de meu artigo.*

*À Profª **Elida Ojopi**, pelos ensinamentos em biologia molecular e genética, e pela colaboração em minha pesquisa.*

À equipe de ginecologia do Hospital Estadual de Bauru, da qual tenho a honra de pertencer, pelo coleguismo e amizade.

*À funcionária **Mônica** da UPCLIN, uma pessoa muito especial, que me atendeu sempre de forma cordial, ajudando muito em uma das etapas de minha pesquisa.*

*Ao Funcionário **Beto** do CEP, por sempre me atender tão bem e resolver minhas dúvidas com muita competência.*

*À funcionária **Diva** da biblioteca, por toda dedicação e apoio, sempre com a mesma disposição e simpatia.*

*À funcionária **Solange** da pós graduação, fundamental em todo andamento do mestrado e sempre disposta a ajudar.*

*Às funcionárias **Tatiana** e **Vânia** da pós graduação, pela atenção e apoio.*

*Ao funcionário **Paulo** da central de aulas, pessoa simples e dedicada, pelo atendimento cordial.*

*Ao funcionário **Santin**, pela colaboração na videoconferência.*

À todos os demais funcionários que colaboraram em alguma etapa desta pesquisa.



Resumo

SALUM, S.O.R. **Analysis of IMP3 expression in the morphological and prognostic evaluation of endometrial cancer.** 2016. 93f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2016.

Introdução: O câncer de endométrio (CE) é a neoplasia ginecológica mais comum em países desenvolvidos, e tem um comportamento heterogêneo sob o aspecto clínico, biológico, e morfológico, com taxas de recorrência de 15 a 20% após a cirurgia. Este estudo avaliou, a associação entre a proteína 3 de ligação ao mRNA com fator de crescimento insulina símile II (IMP3), e fatores prognósticos e morfológicos do CE.

Métodos: Realizou-se um estudo retrospectivo tipo transversal analítico, com avaliação anátomo-clínica em 79 pacientes com CE, com 70 casos de adenocarcinoma endometrióide (ACEE) e 9 casos de carcinoma seroso, entre 1992 e 2010. Setenta e quatro amostras de endométrio benigno, obtidas de pacientes com patologias benignas (mioma e pólipos), foram utilizadas como controle. A expressão da IMP3 foi avaliada por imunohistoquímica e quantificada em intensidade e extensão, e então associada a fatores morfológicos e prognósticos, e claudinas (CLDNs) 3 e 4, receptor de estrogênio (ER) e receptores de progesterona (PR), p53 e KI-67.

Resultados: Foi evidenciada associação entre a expressão da IMP3 no carcinoma seroso, em comparação com o ACEE, tanto em intensidade ($p=0,044$) quanto em extensão ($p<0,001$), bem como nos seguintes fatores prognósticos: grau de diferenciação ($p=0,024$; $p<0,010$), estadiamento ($p<0,001$; $p<0,001$), metástase ($p=0,002$; $p<0,001$). A expressão de IMP3 foi significativa em extensão ($p=0,002$), nos tumores de endométrio quando comparados aos controles. Houve associação da proteína p53 ($p<0,001$; $p<0,001$) em intensidade e extensão, e KI-67 ($p=0,01$) em extensão. **Conclusão:** A expressão de IMP3 foi maior nos tumores serosos de endométrio, comparados aos ACEE. Também houve maior expressão no CE quando comparadas aos controles e com fatores de pior prognóstico.



Abstract

SALUM, S.O.R. **Analysis of IMP3 expression in the morphological and prognostic evaluation of endometrial cancer.** 2016. 93f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2016.

Introduction: Endometrial cancer (EC) is the main gynecological cancer in developed countries. Clinically, biologically and morphologically it presents heterogeneous behavior and has a recurrence rate of 15 to 20%. This study evaluated the association between insulin-like growth factor II mRNA-binding protein 3 (IMP3) and the morphological features and prognosis of EC. **Methods:** A retrospective cross-sectional analytical study was conducted involving the anatomical and clinical evaluation of 79 patients with EC, 70 cases of endometrioid adenocarcinoma (EAC) and 9 cases of serous carcinoma, between 1992 and 2010. Seventy-four benign endometrial samples, obtained from patients with benign pathologies (myomas and polyps), were used as controls. IMP3 expression was evaluated by immunohistochemistry and quantified according to staining intensity and extension, and then associated with morphological and prognostic factors, claudin markers (CLDN 3 and 4), estrogen receptor and progesterone receptors p53 and Ki-67. **Results:** Associations were observed for IMP3 expression in serous carcinomas compared with EACs both in staining intensity ($p=0.044$) and extension ($p<0.001$) and for the following prognostic factors: degree of differentiation ($p=0.024$; $p<0.010$), stage ($p<0.001$; $p<0.001$), and metastasis ($p=0.002$; $p<0.001$). The extension of IMP3 expression was significant ($p=0.002$) in endometrial tumors compared with control samples. Associations were observed for p53 ($p<0.001$; $p<0.001$) in intensity and extension, and for Ki-67 ($p=0.01$) in extension. **Conclusion:** IMP3 expression was higher in serous tumors of the endometrium compared with EACs. Higher expression was also observed in endometrial tumors compared with controls and with factors of poor prognosis.



Abreviaturas e Siglas

% -	porcentagem
< -	menor
> -	maior
≤ -	menor igual
= -	igual
ACE -	Adenocarcinoma de endométrio
ACEE –	adenocarcinoma endometrial endometrióide
ACENE-	adenocarcinoma endometrial não endometrióide
AKT-	serine/threonine Kinase
ARID1A -	AT-rich interactive domain-containing protein 1A
ASTEC-A	Study in the Treatment of Endometrial Cancer
ASTRO-	American Society for Radiation Oncology
CA-125 -	cancer antigen 125
CDKN -	Climate and Development Knowledge Network
CE -	câncer de endométrio
CLDN	claudina
CLDNs	claudinas
CM3-	centimetri cubico
CRD-BP	The mouse Coding Region Determinant-Binding Protein
CTNNB-	beta catenina
DNA -	desoxyribonucleic acid
ER -	receptor de estrogênio
ERBB -	receptor tyrosine kinase
ETV5- ETS	variant 5 [Homo sapiens (human)]
FBXW7- F-	box and WD repeat domain containing 7 [Homo sapiens (human)]
FCEV –	fator de crescimento endotelial vascular
FIGO –	federação internacional de ginecologia e obstetrícia
G1-	grau 1 bem diferenciado
G2-	grau 2 moderadamente diferenciado
G3-	grau 3 indiferenciado
GOG-	grupo de ginecologia oncológica
HER2-	Human Epidermal growth factor Receptor-type 2
HMGA -	high mobility group A
hnRNP-K (KH)-	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K
IA –	estádio 1A
IB-	estádio 1B
IDH -	índice de desenvolvimento humano
IGF2BP1-	proteína 1 de ligação ao RNA mensageiro com fator de crescimento insulina símile 2

IGF2BP2-	proteína 2 de ligação ao RNA mensageiro com fator de crescimento insulina símile 2
IGF2BP3-	proteína 3 de ligação ao RNA mensageiro com fator de crescimento insulina símile 2
IIIA-	estádio 3A
IMC-	índice de massa corpórea
IMP1-	proteína 1 de ligação ao RNA mensageiro com fator de crescimento insulina símile 2
IMP2-	proteína 2 de ligação ao RNA mensageiro com fator de crescimento insulina símile 2
IMP3-	proteína 3 de ligação ao RNA mensageiro com fator de crescimento insulina símile 2
IV-	estádio 4
KI-67-	monoclonal antibody Ki-67; marker of proliferation Ki-67
KOC- KH	domain containing protein overexpressed in cancer
KRAS-	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
MACD-	Maria Aparecida Custódio Domingues
MDR1 -	Major Facilitator Transporter; benomyl/methotrexate resistance; aka BMR; closest <i>S. cerevisiae</i> gene is FLR1 (YBR008C) multidrug transporter
MI-	instabilidade de Microsatélite
MLH1-	mutL homolog 1
mm -	milímetro
mRNA-	RNA mensageiro
MSH2-	mutS homolog 2
MSH6-	mutS homolog 6
mTOR-	mammalian target of rapamycin
MYC-	v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
OMS-	organização mundial da saúde
PARP-	Poly-(ADP-ribose) polymerase
PET-CT-	tomografia computadorizada por emissão de pósitrons
PI3K-AKT-	phosphatidylinositol 3-kinase- serine/threonine kinase
PIK3CA -	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha
PMS2- PMS1	homolog 2, mismatch repair system component
PPP- P1	protein phosphatase
PR -	receptores de progesterona
PTEN –	Phosphatase and tensin homolog
rDNA	Ribosomal DNA
RE-	receptor de estrógeno
RNA –	ácido ribonucléico
RNPs -	ribonucleoproteínas
RP -	receptores de progesterona
RRMs -	RNA recognition motifs

RUX1-	roughex 1
STK-	serine/threonine kinase
STK15-	serine/threonine kinase 15
TCGA-	The Cancer Genome Atlas
TGF β -	transforming growth factor beta
TMA	tissuemicroarrays
TOR-	target of rapamycin
TP-	terminal protein
TQ-	tirosina quinase
TFF3-	trefoil factor 3
U/ml-	unidade por mililitro
USA-	United States of America
VGEF-	Vascular endothelial growth factor
VgRBP/Vera-	insulin like growth factor 2 mRNA binding protein 3 L homeolog
VICKZ-	Vg1RBP/Vera IGF2BP CRD-BP KOC ZBP1 (gene family alias)
ZBP	Z-DNA-binding protein



Sumário

1. Introdução.....	23
1.1 Conceito.....	24
1.2 Epidemiologia.....	24
1.2.1 ACE Esporádico e Hereditário.....	25
1.2.2 ACE e Características Fenotípicas e Fatores de Risco.....	25
1.3 Classificação Histológica e Anátomo-Clínica.....	26
1.4 Aspectos Clínicos e Diagnóstico.....	28
1.5 Estadiamento e Tratamento.....	29
1.5.1 Tratamento Adjuvante.....	31
1.5.2 Terapia Alvo Molecular.....	32
1.6 Aspectos Moleculares do ACE e Fatores Prognósticos.....	33
1.7 ACE, Claudinas 3 e 4 e IMP3.....	41
2. Justificativa.....	44
3. Objetivos.....	46
3.1 Objetivo Geral.....	47
3.2 Objetivos Específicos.....	47
4. Artigo.....	48
Resumo.....	50
Introdução.....	51
Material e Métodos.....	52
Resultados.....	56
Discussão.....	58
Referências.....	74
5. Conclusão.....	78
6. Bibliografia.....	80
7. Anexos.....	89



1. Introdução

1.1 Conceito

O câncer de endométrio é definido como neoplasia epitelial maligna do corpo uterino, originada do endométrio, geralmente com diferenciação glandular, com potencial de invasão miometrial e metástases (Tavassoli; Devilee, 2003). É uma doença heterogênea no aspecto clínico, biológico, morfológico, molecular e genético. A identificação de grupos com comportamento semelhante e previsível, é um dos objetivos para direcionar condutas terapêuticas e definir o seguimento apropriado (Murali et al., 2014).

1.2 Epidemiologia

O adenocarcinoma de endométrio (ACE) é o sexto tipo de câncer mais frequente entre as mulheres no mundo, com aproximadamente 320 mil casos novos por ano, o que representa cerca de 5% de todos os cânceres do sexo feminino, com 70 % dos casos ocorrendo em países com alto IDH (índice de desenvolvimento humano). A taxa de incidência é de 8,2 casos por 100 mil mulheres, e a maioria dos casos ocorrem acima de 50 anos. É responsável pelo óbito de aproximadamente 76 mil mulheres por ano, o que representa 2% dos óbitos em mulheres (www.inca.gov/estimativa/2016).

Nos Estados Unidos e Europa é a neoplasia maligna ginecológica mais comum, responsável por 6% dos casos novos de câncer e 3% de óbitos por ano (Murali et al., óbitos; também foi estimado risco de 2.8% de desenvolver a doença durante a vida (Siegel et al., 2016).

No Brasil é a 3ª neoplasia maligna ginecológica mais comum, com incidência esperada para o ano de 2016 de 6.950 casos novos, e risco estimado de 6,74/100.000 mulheres, estando atrás apenas das neoplasias de mama e colo uterino. O maior risco está na Região Sudeste com 9,58 casos a cada 100 mil mulheres, e o menor na Região Norte com 2,71 casos por 100 mil (www.inca.gov/estimativa/2016).

Houve um aumento na taxa de óbitos por 100 mil habitantes de 100% nos últimos 20 anos até 2012 (Sorosky, 2012). Vale ressaltar que esse índice tem relação com o aumento da expectativa de vida da população e com as comorbidades que geralmente acompanham esses casos. Em 90% dos casos, as pacientes com ACE tem mais que 50 anos, e apenas 5% dos casos ocorrem antes de 40 anos (Sorosky, 2012).

1.2.1 ACE Esporádico e Hereditário

Cerca de 90% dos casos são esporádicos e 10 % hereditários. A idade média de incidência é de 61 anos (Burke et al., 2014). Cerca de 5% dos casos hereditários estão associados à Síndrome de Lynch, (Câncer de colón não polipoide hereditário), síndrome autossômica dominante, caracterizada por mutação germinativa em um dos genes de reparo do DNA: MLH1, MSH2, PMS2 e MSH6. O risco acumulado de desenvolver ACE devido essas mutações aos 70 anos é: de 54% para MLH1, 21% para MSH2 e 16% para MSH6 (Burke et al., 2014). A mutação no PMS2 está associada à um risco acumulado de 15% durante a vida (Lancaster et al., 2015). Geralmente as pacientes com esta síndrome, desenvolvem câncer endometrial 10 anos antes da população geral, com um pico de incidência aos 46 anos, e normalmente o prognóstico é bom (Ellis et al., 2010).

A síndrome de Cowden autossômica dominante, está relacionada ao aumento de risco para ACE, associada à mutação germinativa no gene PTEN, e à um risco de 19-28% até os 70 anos. Está relacionada à risco aumentado para outras neoplasias, como, câncer de mama e tireóide (Lancaster et al., 2015).

1.2.2 ACE e Características Fenotípicas e Fatores de Risco

Há fatores de risco associados fenotípicos, e destaca-se a epidemia de obesidade, presente principalmente nos países desenvolvidos. Aproximadamente 70% das pacientes com ACE são obesas, o que também aumenta o risco de morte progressivamente em relação ao IMC (índice de massa corpórea), (Calle et al., 2003; Von Gruenigen et al., 2006; 2011); dados que mostram a necessidade da

implementação de políticas para mudança no estilo de vida, melhorando hábitos alimentares e atividades físicas.

O histórico reprodutivo, maior número de ciclos menstruais e estímulo estrogênico exógeno ou endógeno, também são importantes fatores. Neste contexto se enquadram: a nuliparidade, menarca precoce e menopausa tardia, anovulação crônica (presente principalmente na síndrome de ovários policísticos), obesidade (situação em que ocorre maior produção estrogênica devido a aromatização periférica), tumores produtores de estrógenos, cirrose, terapias hormonais estrogênicas isoladas e uso de Tamoxifeno.

O uso de estrógenos sem oposição da progesterona aumenta de 4 a 8 vezes o risco, enquanto a utilização da progesterona diminui substancialmente, a depender do tipo, dose e duração do tratamento. A nuliparidade e diabetes estão associados a um aumento de 3 vezes do risco, já a hipertensão parece estar mais associada à obesidade e diabetes do que ao risco de ACE. Em mulheres brancas há um risco 2 vezes maior que em negras, porém o prognóstico em população negra é pior, o que pode estar relacionado a tumores mais agressivos. O Tamoxifeno utilizado no tratamento e prevenção de câncer de mama, aumenta em até 3 vezes o risco, e a maioria dos casos é do tipo endométrioide, baixo grau e estágio inicial. A terapia hormonal estrogênica isolada, aumenta de 2 a 12 vezes o risco e este risco permanece por 2-3 anos após o fim do tratamento; nesses casos os tumores geralmente são precedidos por hiperplasia endometrial atípica (Sorosky, 2012) .

O uso de contraceptivo oral, acetato de medroxiprogesterona, dispositivo intrauterino liberador de progesterona diminuem o risco de ACE, bem como o tabagismo também tem sido associado a diminuição de risco (Murali et al., 2014).

1.3 Classificação Histológica e Anátomo-Clínica

A classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS), para os tumores dos órgãos genitais femininos identifica os diferentes tipos histológicos de ACE: Carcinomas epiteliais (endometrióide, seroso, células claras, escamoso, células de transição, células pequenas, mucinoso, indiferenciado); Tumores mistos

mesenquimais e epiteliais (carcinossarcoma, tumor milleriano misto); Tumores mesenquimais (musculo liso, estroma endometrial); Doença trofoblástica e outros tumores (Tavassoli; Deville, 2003). Os ACEE são classificados em relação à sua arquitetura em: Grau 1, com menos que 5% de padrão sólido não escamoso ou morular; Grau 2 de 5-50% e Grau 3 mais que 50% (Buhtoiarova et al., 2016).

O ACE também é classificado, segundo Bokhman, de 1983, em dois grandes subtipos, Tipo 1 e 2, baseando-se em características clínicas, epidemiológicas, metabólicas e endócrinas das pacientes. O Tipo 1, tem como características: exposição aumentada ao estrógeno, anovulação crônica (situação comum na síndrome de ovários policísticos), aumento da aromatização periférica convertendo maior quantidade de androgênios em estrógenos (comum em pacientes obesas e frequentemente associadas à dislipidemia e diabete), receptores hormonais de estrógeno e progesterona positivos, menor paridade, maior número de ciclos menstruais (menopausa após 50 anos), tumores de baixo grau, invasão miometrial superficial, baixa probabilidade de metástases linfáticas, alta sensibilidade à progesterona, prognóstico favorável, com sobrevida em 5 anos de 86%. O tipo histológico associado, é o adenocarcinoma endométrioide (ACEE), normalmente com estágio precoce (FIGO I e II) no momento do diagnóstico (Silverberg et al., 2003). Geralmente a lesão precursora é a hiperplasia epitelial atípica.

O tipo 2 ou adenocarcinoma não endométrioide (ACENE), é mais comum em pacientes sem exposição estrogênica excessiva, não obesas, sem distúrbios endócrinos e metabólicos, menopausa antes de 50 anos, raça negra, tumores de alto grau, invasão miometrial profunda com alta probabilidade de metástase linfática, baixa sensibilidade à progesterona, prognóstico desfavorável com sobrevida em 5 anos de 59% (Bokhman, 1983). O tipo histológico mais associado, é o Adenocarcinoma Seroso 5-15% e células Claras 1-5% dos casos, com baixa expressão de receptores de estrógeno e progesterona, e maior frequência de estágio (FIGO III/IV) no momento do diagnóstico. O endométrio atrófico normalmente precede esses casos e a lesão pré-neoplásica associada é o carcinoma intraepitelial endometrial (Murali et al., 2014; Llaudaró et al., 2012). A classificação de Bokhman, apesar de amplamente utilizada e servir de modelo para diversos estudos até o momento, não se adequa a parte dos casos, nos quais não consegue definir grupos homogêneos quanto a biologia, genética e patogenia, devido à sobreposição de características. Murali et al. (2014),

relata que cerca de 10-19% dos casos de ACEE são de alto grau e possuem características intermediárias entre o tipo 1 e 2, 20% dos carcinomas serosos não apresentam invasão miometrial profunda e 2% tem associação com hiperplasia endometrial. O grupo de ginecologia oncológica (GOG), mostrou evidências de fatores de risco comuns entre ACEE grau 3 e ACENE (Buhtoiarova et al., 2016). Setiawan e cols. (2012), observou outros fatores de risco comuns entre as duas entidades, como o uso de contraceptivo oral, paridade, tabagismo, idade da menarca, diabetes tipo 2, no entanto, também ressaltou que o IMC (índice de massa corpórea) tem uma maior relação com os tumores endométrioideis.

O estadiamento do ACE FIGO 2009, elaborado pelo comitê em Ginecologia Oncológica, foi descrito por Pecorelli. (2009). O estadiamento pela FIGO (Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia), 2009, divide-se no momento do diagnóstico em: I 72%, II 12%, III 13, IV 3% (Sorosky, 2012). Cerca de 80% dos casos são diagnosticados em estádios precoces, I e II pelo estadiamento da FIGO, com sobrevida em 5 anos entre 74-91%. Pacientes com estádios avançados, III e IV, tem respectivamente sobrevida em 5 anos de 57-66% e 20-26% (Murali et al., 2014).

Anexo I

1.4 Aspectos Clínicos e Diagnóstico

O sintoma mais comum no ACE é o sangramento vaginal anormal, que ocorre em 90% dos casos e possibilita o diagnóstico em estádios precoces em 75% dos casos (Sorosky, 2012). Qualquer sangramento pós menopausa é suspeito e deve ser investigado, e sangramentos anormais na pré menopausa também. A avaliação nestes casos normalmente se inicia com a realização de ultrassonografia pélvica transvaginal, que tem alta acurácia na mensuração do endométrio. O parâmetro utilizado é a espessura do endométrio, considerada normal com valores iguais ou menores que 4 mm (ACOG, 2012). Em casos alterados, indica-se biópsia do endométrio, que pode ser realizada ambulatorialmente, com maior frequência na prática, por catéter de Pipelle, com taxas de detecção para ACE e hiperplasias, de 99.6% e 98% respectivamente. A curetagem uterina também pode ser realizada, e a

histeroscopia com biópsia é o padrão ouro; todos os métodos tem alta especificidade em torno de 98% (Burke et al., 2014).

1.5 Estadiamento e Tratamento

A partir de 1988, a FIGO, recomendou o estadiamento cirúrgico para o tratamento inicial do ACE, e mesmo após a revisão em 2009 (Anexo 1), o padrão se manteve em histerectomia total com salpingooforectomia bilateral e linfadenectomia pélvica e para aórtica bilateral. É importante observar que em torno de 20 % das pacientes em que a impressão era de doença em estágio inicial, o estadiamento cirúrgico mostrou doença avançada (Burke et al., 2014). A abordagem cirúrgica pode ser feita por laparotomia, laparoscopia e cirurgia robótica. A conversão da laparoscopia para laparotomia tem relação entre outros fatores como a obesidade presente na maioria dos casos; no estudo do GOG, LAP2, a conversão ocorreu em 17.5% das mulheres com IMC de 25, 26.5% com IMC entre 34-35% e 57.1% quando o IMC era maior que 40 (Walker et al., 2009).

Dos procedimentos adotados no estadiamento, o que causa mais controvérsias, é a linfadenectomia, por dúvidas do seu papel no tratamento e prognóstico das pacientes, e o risco de morbidade associado. No ACE 6-8% das pacientes tem metástase linfonodal no momento do diagnóstico, 4-6 % tem metástase para linfonodos pélvicos (com ou sem para aórticos) e 2% tem metástase em linfonodos para aórticos (Werner et al., 2014). As evidências não mostram benefícios deste procedimento em pacientes com estágio precoce e baixo risco (Todo et al., 2010). Já o estudo ASTEC em 2009, conclui após avaliação de 1408 pacientes com ACE, que também não há benefícios deste procedimento neste grupo. No entanto este estudo apresentou vários pontos controversos, como: 1) apenas 50 % das pacientes de alto risco, foram randomizadas para tratamento adjuvante 2) 7-9 % das pacientes eram de baixo risco, 53-61% das pacientes com doença avançada (excluindo acometimento linfonodal) não foram randomizadas para terapia adjuvante. Além disto, do grupo de pacientes randomizadas para linfadenectomia, havia 3% a mais de lesão de alto grau e invasão linfovascular e 10 % a mais de invasão miometrial profunda (Kitchener et al., 2009). O linfonodo sentinela, tem sido uma proposta de minimizar a morbidade associada a linfadenectomia e substituir a linfadenectomia completa (Ballester et al., 2011). A avaliação pré-operatória das pacientes é essencial

para programação do tratamento cirúrgico; informações como invasão profunda do miométrio, invasão cervical e extrauterina, linfonodos suspeitos de metástases são fundamentais para dirigir uma abordagem cirúrgica mais adequada, desta forma, métodos de imagem tem um importante papel neste cenário. A ressonância magnética com contraste e ultrassonografia transvaginal é mais utilizada para avaliação da extensão local do tumor, enquanto a PET-CT (tomografia computadorizada por emissão de pósitrons) e tomografia computadorizada, tem um melhor desempenho para detectar metástases linfonodais e à distância (Haldorsen et al., 2016).

Sala et al. (2014), estudaram pacientes com ACEE através de dois modelos de risco para definir a extensão da cirurgia e correto estadiamento pelos critérios da FIGO. As pacientes foram submetidas à avaliação intraoperatória através de exame de congelação do útero e posteriormente classificadas em alto e baixo risco pelos modelos da GOG33 e Clínica Mayo.

O algoritmo da GOG33 segue o estadiamento da FIGO 1988 e é definido

Como:

- ✓ Baixo Risco: Estádio IA (acometimento superficial do endométrio), independente do grau. Estádio IB (acometimento de menos da metade do miométrio), Grau 1.
- ✓ Risco intermediário: Estádio IB Grau 2 e 3.
- ✓ Alto Risco: Estádio 1C (acometimento de mais da metade do miométrio), independente do Grau, ou Estádios superiores.

O algoritmo da Clínica Mayo é definido como:

- ✓ Baixo risco: tumores grau 1 e 2 com diâmetro do tumor ≤ 2 cm, infiltração de menos da metade do miométrio. Tumor endométrioide sem invasão do miométrio.
- ✓ Baixo risco intermediário: tumores de baixo risco grau 1 e 2, porém com diâmetro maior que 2 cm ou desconhecido.
- ✓ Alto risco intermediário: tumores endométrioides grau 1 e 2 com mais de 50% de invasão do miométrio e grau 3 com menos de 50% de invasão do miométrio.

- ✓ Alto Risco: tumores não endométríoides; endométríoides grau 3 com mais que 50% de invasão do miométrio; envolvimento parametrial, vaginal ou anexial; estágio IV da FIGO (Dowdy et al., 2014).

Após a classificação de risco, as pacientes eram ou não submetidas a linfadenectomia. Houve uma maior acurácia através dos critérios da Clínica Mayo, com apenas 1 caso, que representou 0.4% do total, subestimado em relação ao risco de disseminação linfonodal.

As principais terapias adjuvantes no ACE são radioterapia e quimioterapia e existem evidências de que não há benefícios da radioterapia para pacientes com estágio inicial e tumores Grau 1 e 2 (Blake et al., 2009). A radioterapia pélvica tem demonstrado diminuir em até 64% a recidiva locorregional, porém sem melhorar a sobrevida global e livre de doença (Kong et al., 2012).

1.5.1 Tratamento Adjuvante

A ASTRO (sociedade americana de radioterapia em oncologia), recomenda o tratamento radioterápico adjuvante da seguinte forma: 1) Pacientes sem doença residual em peças de histerectomia e com ACE de baixo risco, grau 1 e 2 sem invasão miometrial maior que 50%, não há indicação de radioterapia. 2) Pacientes com tumor grau 3 sem invasão miometrial maior que 50%, grau 1 e 2 maior ou igual a 50 %, a braquiterapia de fundo vaginal é a opção de escolha. 3) Pacientes com Tumores grau 3 e invasão miometrial acima de 50% ou invasão do estroma cervical, está indicado radioterapia pélvica. Pacientes com tumores avançados, há indicação de quimioterapia associada ou não a radioterapia externa. Não há benefício comprovado da associação de radioterapia externa com braquiterapia de fundo vaginal em nenhuma situação (Meyer et al., 2016). A quimioterapia tem a sua indicação em tumores avançados e pode ser associada à radioterapia com melhora da resposta; o regime quimioterápico com melhores resultados, é a associação de paclitaxel e carboplatina, e tem a menor toxicidade (Burke et al., 2014 Part 2).

O tratamento hormonal também é uma alternativa, e pode ser indicado em casos de pacientes jovens e tumores iniciais de baixo grau, com desejo de preservação de fertilidade. A medroxiprogesterona e acetato de megestrol são os

fármacos mais utilizados nestes casos (Erkanli et al., 2010). Também pode ser utilizado na doença recorrente e avançada, com taxas de resposta entre 10-25%, e resultados melhorados com associação de tamoxifeno, que aumenta a expressão dos receptores de progesterona (Sorosky, 2012).

1.5.2 Terapia Alvo Molecular

A terapia alvo molecular é outro tipo de tratamento que surgiu com o avanço da compreensão dos eventos moleculares envolvidos no ACE. É uma opção para doença recorrente e/ou metastática, situação que apresenta uma média de sobrevida de 7-12 meses, e requer tratamentos mais efetivos (Dedes et al., 2011). A utilização destas terapias ainda faz parte de ensaios clínicos e não é utilizada na prática clínica do ACE; a caracterização molecular do tumor primário é fundamental para melhores resultados. Os melhores impactos clínicos são alcançados na associação com quimioterapia, e diferentes vias de sinalização são candidatas a terapias alvo. A via de sinalização PI3K-AKT é a mais frequente no ACEE, e frequentemente resulta da mutação do gene supressor tumoral PTEN e da PIK3CA (Llaudaró et al., 2012). Inibidores da PI3K podem ser usados como potentes agentes no tratamento do câncer, e uma diminuição na fosforilação da AKT e um aumento na apoptose é notada em pacientes com ACE e mutação da PTEN após uso de inibidores de PI3K (Matias-Guiu, 2013).

Tumores associados com a inativação da PTEN são suscetíveis ao tratamento com inibidores da via mTOR (alvo em mamíferos da rapamicina). Inibidores da mTOR fazem parte de ensaios clínicos, como: temsirolimus, everolimus e ridaforolimus. A utilização de inibidores da mTOR no tratamento do ACE é sustentada pela alta prevalência de perda de função da PTEN, mutação da PI3K, ativação do sinal da PI3K, e amplificações na doença metastática (Salvesen et al., 2012). Pacientes com mutação da PIK3CA tratadas com inibidores da via PIK3/AKT/mTOR tem resposta significativamente superior que pacientes sem a mutação (Salvesen et al., 2012). O uso da via dupla PI3K-mTOR tem sido proposta para terapia alvo no ACE (Shoji K et al., 2012). Receptores de Tirosina Quinase (TQ) também são alvos para o tratamento do câncer e se relacionam entre outras funções, à regulação da expressão de fatores de crescimento.

Um exemplo é receptor do fator de crescimento epidermal (HER), que tem a atividade intrínseca da TQ para sua expressão. A utilização de anticorpos monoclonais para inibição do HER, resulta em parada do crescimento celular, e um efeito semelhante é visto na inibição da atividade da TQ relacionada à este fator (Matias - Guiu, 2013).

O fator de crescimento endotelial vascular (FCEV) é outro receptor de TQ com um importante papel na angiogênese e está altamente expresso em ACEE.

O Bevacizumab, um anticorpo monoclonal recombinante de imunoglobulina humana para o FCEV, tem sido utilizado em pacientes com doença recorrente, com resposta de 20% e estabilização da doença em 30% (Matias - Guiu, 2013).

O fator de crescimento de fibroblasto (FGF) e o eixo de receptor de sinalização do FGF, tem um importante papel em órgãos normais e no desenvolvimento vascular. A mutação do receptor do fator de crescimento de fibroblasto 2 (FGF2) identificado no ACE, está associada à sensibilidade com a inibição do FGF, com estudos in-vitro e in vivo demonstrando efeitos pró apoptóticos e antiproliferativos (Salvesen et al., 2012).

A enzima poli (adp-ribose) polimerase (PARP), é um novo alvo terapêutico importante no tratamento do câncer; esta enzima tem um papel essencial no reparo de quebras do DNA, e terapias alvo tem sido propostas para subtipos específicos do ACE, como aqueles com mutação da PTEN (Llaudaró et al., 2012).

1.6 Aspectos Moleculares do ACE e Fatores Prognósticos

O ACE é uma doença heterogênea, no aspecto clínico, morfológico e molecular.

Apesar da doença ser diagnosticada em 75% dos casos em estádios iniciais, e com uma sobrevida em 5 anos em torno de 80% considerando todos os estádios, 15-20% dos casos irá recidivar, sendo um terço em pelve e vagina e dois terços à distância (Salvesen et al, 2012), e o prognóstico para doença metastática, será de uma sobrevida de apenas 7-12 meses, e apenas 10-15 % das pacientes irão se beneficiar de tratamento nesta fase (Haldorsen et al., 2016; Salvasen et al., 2012).

Outro aspecto importante, é que deste grupo de recorrência, 20% são do ACEE, ou tipo 1, teoricamente menos agressivos e de melhor prognóstico (Salvesen et al., 2012). Por outro lado, 50% das pacientes com ACE de alto risco irão se curar da doença (Werner; Salvesen, 2014).

A identificação de subtipos biologicamente distintos e marcadores de pior prognóstico, é fundamental neste cenário, para individualizar terapias e diminuir a chance de recorrência, como também, evitar tratamentos desnecessários com a toxicidade associada.

Até 70 % das recorrências ocorrem nos 2-3 anos após o tratamento, e a relação com fatores de risco histológicos é bem conhecida: tumores de alto grau, invasão de mais da metade do miométrio, acometimento do espaço linfovascular, invasão do segmento inferior do útero, e histologia não endométrioide (Ben Arie et al., 2011).

Lavazzo et al. (2014), em uma revisão sobre recorrência em ACEE de estádios iniciais, encontraram os seguintes fatores:

- 1) Uma taxa global de recorrência em pacientes com ACE de 14.2%, associada aos fatores de risco: idade avançada, grau histológico, atividade mitótica, invasão miometrial, invasão do espaço linfovascular, metástases microscópicas vaginais, envolvimento anexial e linfonodal, com maior RR (risco relativo) para idade.
- 2) Em pacientes com ACEE de baixo grau e estádios iniciais, o acometimento do espaço linfovascular é um fator importante para recorrência e mortalidade.
- 3) Envolvimento do segmento inferior uterino também pode estar associado a um risco maior de recorrência.
- 4) A aneuploidia se mostrou como fator independente de risco para pacientes com ACE estágio Ia.
- 5) Pacientes com expressão aumentada da p53, mesmo em tumores diploides, tiveram maior risco de recorrência.
- 6) O papel da linfadenectomia é fundamental na avaliação de risco, e pacientes com recorrências precoces, podem estar associadas a

subestadiamento; a combinação da avaliação do grau tumoral pré-operatória e da invasão miometrial intraoperatória, pela macroscopia, leva a decisões erradas em 11 % dos casos.

- 7) Fatores genéticos como a metilação do rDNA, superexpressão e mutação do p53, presente até 3 vezes mais em mulheres de raça negra com ACE estágio I, sd de Lynch que é caracterizada pela IM (instabilidade de microssatélites), inativação do gene 14-3-3-sigma, amplificação do KRAS e expressão mRNA KRAS, tem correlação com maior agressividade e recorrência.

Vários estudos avaliaram a expressão molecular dos diferentes tipos histológicos, com o objetivo de identificar perfis moleculares que caracterizassem subtipos distintos de ACE.

Como em outras neoplasias, o ACE resulta de uma sequência de alterações genéticas, relacionadas a cada tipo histológico. Existem perfis com características mais comuns em cada subtipo. O tipo 1 apresenta alterações no PTEN(Phosphatase and tensin homolog), PIK3CA (Phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate 3-Kinase, catalytic subunit alpha), KRAS (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homologue), Beta-catenina, e/ou IM, e genes de reparo do DNA.O tipo 2 apresenta mutação da TP53 (tumor protein p53), amplificação do STK15 e HER2 (fator 2 do receptor de crescimento epidermal humano), alta expressão da p16 e baixa expressão ou perda da E-caderina, e perda da heterozigose (Llauradó et al., 2012). Neste contexto, houve uma melhor compreensão da patogênese do ACE, marcada por eventos moleculares na progressão de lesões pré-neoplásicas para carcinomas invasivos e da evolução destes para invasão e metástases. Nos carcinomas tipo 1, a hiperplasia simples ou complexa progride para hiperplasia atípica e neoplasia epitelial endometrial através de mutações dos genes de reparo do DNA, MLH2 e MLH6, silenciamento do MLH1 e proliferação policlonal; destas lesões pode ocorrer evolução para ACEE e invasão miometrial e metástases ou invasão vascular e metástases por mutações nos genes RUX1, ETV5, TGF β . No carcinoma tipo 2, o endométrio atrófico apresenta perda dos RE e RP e progride para carcinoma intraepitelial endometrial, e deste para ACENE de alto grau através de perdas de heterozigose, mutação da p53, amplificação da Her2/neu e aneuploidia, podendo evoluir com invasão miometrial e/ou vascular e

metástases (Llaudaró et al., 2012). Apesar de existir um perfil molecular mais prevalente para cada tipo, é fato, que há muita sobreposição na expressão molecular entre ambos (Murali et al., 2014). A porcentagem das alterações moleculares mais comuns em relação aos subtipos 1 e 2 do ACE são respectivamente: mutação de PTEN 52-78% e 1-11%, PIK3CA 36-52% e 24-52%, PIK3R1 21-43% e 0-12%, KRAS 15-43% e 2-8%, ARID1A 25-48% e 6-11%, CTNNB1 23-24% e 0-3%, TP53 9-12% e 60-91%, PPP2R1A 5-7% e 15-43%, ampliação de HER, 2,0% e 27-44%, instabilidade de microssatélite, 28-40 % e 0-2% (Murali et al., 2014).

PTEN é um gene supressor tumoral que tem importante papel na regulação do ciclo celular e apoptose, e também regula a sobrevivência celular e proliferação através de ação antagônica na via PI3K/AKT (Phosphoinositide 3-Kinase) (Ellis et al., 2010; Llaudaró et al., 2012). A perda de função do PTEN causa um aumento na proliferação celular e alteração no mecanismo de apoptose. A expressão do PTEN no endométrio, varia de acordo com a fase do ciclo menstrual e é regulada pelo estrogênio e progesterona. Na fase proliferativa há uma maior expressão, diminuindo na fase secretora.

A inativação do PTEN tem sido amplamente associada ao desenvolvimento do ACE, e vários autores tem demonstrado mutação deste gene em hiperplasias típicas e atípicas do endométrio (Ellis et al., 2010). A perda do PTEN tem sido associada à 30-60% de hiperplasia endometrial e a sua inativação com piora na sobrevivência e estádios mais avançados (Ellis et al., 2010). O KRAS, tem sido relacionado com o crescimento tumoral e diferenciação, normalmente se expressa em tumores tipo 1. Estudos têm demonstrado a sua expressão progressivamente mais alta, de hiperplasias simples para complexas e destas para carcinoma; a presença de sua mutação em material de biópsia de lesões pré-malignas podem sugerir sua função na progressão para carcinoma (Llaudaró et al., 2012).

Microssatélites são simples repetições de sequências de DNA no genoma, que são suscetíveis à erros de replicação. A instabilidade de microssatélites (IM) é uma condição de dano no DNA, devido alterações no processo de reparação durante a sua replicação, o que está relacionado aos genes de reparo de DNA (Llaudaró et al., 2012). As primeiras alterações nos genes de reparo de DNA foram descritas em pacientes com carcinoma colorretal não polipoide hereditário (CCNPH); algumas mutações na linhagem germinativa: hMLH2, MLH-1, e hMLH6 tem sido descrita em

ACE, e a inativação do MLH-1, descrita como a causa mais comum de IM em ACEE esporádico (Llauradó et al., 2012).

O Her-2/neu é um oncogene da família do fator de crescimento epidermal e desempenha um importante papel na regulação do crescimento e diferenciação celular. A sua superexpressão e amplificação se relacionam a vários tipos de câncer, entre eles, o de endométrio, mama e ovário e estão relacionadas à menor intervalo livre de doença e sobrevida global. No ACE, está mais expresso em ACENE ou endometrioides de alto grau. (Ellis et al, 2010).

A p53 é um gene supressor tumoral com importante função na apoptose, proliferação tumoral, e na carcinogênese do ACE. Principalmente no tipo 2 de ACE, foram descritos até 85% de alterações da p53, e relacionados à estádios avançados, metástase linfonodal, e tumores de alto grau (Ellis et al., 2010).

Um desafio no diagnóstico anatomo-patológico, é diferenciar os ACE de alto grau, que incluem os tumores endometrioides grau 3, serosos, células claras, e indiferenciados. Atualmente o coriocarcinoma, tumores epiteliais mistos e “tumores híbridos” (com morfologia ambígua, sem caracterização do tipo histológico), também são inclusos nesta relação. Existe até 20% de divergência no diagnóstico deste grupo (Soslow, 2013). O grupo de estudo do TCGA (O Atlas do Genoma do câncer), sugeriu que 20-30% de tumores diagnosticados como endometrioides grau 3 e em menor proporção grau 2, possuíam características moleculares do carcinoma seroso. Entre 10-19% de ACEE são de alto grau, e tem características clínicas, histopatológicas e moleculares intermediárias com ACENE, incluindo falta de associação com hiperplasia endometrial e pior prognóstico (Murali et al., 2014).

O ACEE de alto grau geralmente evolui com metástases primária para linfonodos pélvicos e paraaórticos e tecidos pélvicos, mais raramente para outros órgãos. A doença extrauterina geralmente ocorre em casos com invasão profunda do miométrio e linfovascular. Entretanto, os ACENE serosos, além das metástases linfonodais e viscerais, frequentemente apresentam invasão anexial e peritoneal. Tanto ACENE seroso e de células claras tem relato de associação frequente com pólipos endometriais (Soslow, 2013).

A imunoistoquímica tem auxiliado a elucidar o grupo de alto grau, como descrito a seguir.

PTEN, PIK3CA e ARID1A tem a mutação encontrada em mais de 60% dos ACEE grau 3, há mutação da TP53 em cerca de um terço dos casos e 20-30% tem alta instabilidade de microssatélites. A Perda do PTEN e ARID1A e expressão de RE e RP, mesmo que focal, também são encontrados no ACEE grau 3 (McConechy et al., 2012). O ACENE seroso apresenta alta taxa de mutação da TP53, variando de 67-90% dos casos, aproximadamente metade tem mutação de PPP2R1A e um quarto mutação da PIK3CA. O carcinoma seroso típico, também apresenta alta expressão da p16, e RE e RP com baixa expressão ou ausentes, PTEN e ARID1A com baixa expressão e raramente alta IM. O carcinoma de células claras tem frequente mutação de PIK3CA e ARID1A, baixa mutação da p53 (semelhante ao ACEE grau3) e baixa taxas de mutação da PTEN; frequente há perda da expressão do RE e RP e ocasionalmente alta expressão da p53 e p16 (Soslow, 2013).

A expressão aumentada da p53, RP negativo e baixa expressão da PTEN auxilia a definição de ACNE seroso em relação ao ACEE Grau 3; e baixa taxa ou RP negativo associado à alta expressão da HNF-1Beta (fator nuclear do hepatócito-1Beta), favorece o diagnóstico de ACNE de células claras (Soslow, 2013).

Alvarez et al. (2012), concluíram que o ACEE grau 3 tem em comum com o ACEE de baixo grau, a expressão aumentada da cyclin D1 mas não a sua amplificação e também a baixa frequência de expressão e amplificação do HER-2. Na correlação com os ACNE serosos, observou a alta expressão do p53 e p16 e baixa frequência dos genes de reparo de DNA em comum, e raramente a alta expressão e ou ampliação do HER-2 e ampliação da cyclin D1 e WT-1.

A superexpressão do HER2 se associa a tumores agressivos e auxilia a definição de subtipos; A baixa expressão de ER/PR tem relação com baixa sobrevida, metástase linfonodal e define prognóstico e subtipos. A alta expressão da Stamina se associa à baixa sobrevida, metástases linfonodais e baixa resposta ao tratamento com taxanos (Werner; Salvesen., 2014).

Os melhores marcadores para subtipos histológicos do ACE segundo este mesmo estudo são: RE e RP, p53 e ploidia do DNA; os RE e RP são comuns em ACEE, e a superexpressão de p53, aneuploidia, presença de ganhos e perdas cromossômicas, são mais presentes em ACNE. A perda da expressão do RE e RP tem claramente se associado a tumores agressivos, mesmo os do tipo endometrióide.

A ploidia do DNA tem se mostrado um marcador independente de prognóstico para ACE em vários estudos, identificando grupos de alto risco, até para pacientes que presumidamente eram classificados como baixo risco por critérios clínicos e patológicos (Werner; Salvesen., 2014).

Um perfil morfológico e molecular foi elaborado para prever a probabilidade de doença disseminada no momento pré operatório e também estabelecer o prognóstico, a sobrevida em 5 anos. Os achados foram: histologia não endométrioide ou endometrióide grau 3, invasão vascular, perda da expressão dos RE e RP, superexpressão da p53, perda da expressão da CDKN2A (cyclin dependent kinase inibitor 2A), alto grau de proliferação, superexpressão da Stamina e do ERBB2, aneuploidia (Salvesen, 2012).

Em um painel de imunoistoquímica utilizando os RE e RP, p16, PTEN, e p53, obteve-se apenas 62.5% de concordância no diagnóstico diferencial de tumores de alto grau, em carcinomas puros e mistos, após avaliação de três patologistas (Gilks et al., 2013).

Um estudo utilizando RE, IMP3 (proteína 3 de ligação ao RNA mensageiro do fator de crescimento insulina símile II), p16, p53, RP e PTEN, em pacientes com tipo puro de ACEE grau 3 e ACNE seroso, encontrou uma maior expressão de IMP3, PTEN e p16 neste último, e também observou a associação de p16 e PTEN como fator preditivo para ACNE grau 3, com sensibilidade de 90% e especificidade de 96.8% (Alkushi et al., 2010).

Um painel imunoistoquímico com nove marcadores: p53, IMP3, IMP2, HMGA2, p16, FolR1, ciclina, receptor de estrógeno, PTEN se mostrou útil na diferenciação do ACNE seroso com ACEE grau 1-2, com sensibilidade de 100% e especificidade de 83% (Santacana et al., 2014).

O grupo de estudo TCGA , identificou padrões genômicos no ACE e dividiu em 4 grupos de acordo com espectro de mutações, número de cópias com aberração e instabilidade de microssatélites. Sugeriu uma integração destas características, para identificar grupos homogêneos, e corrigir fatores como a sobreposição de características, presente em parte dos casos na classificação de Bokhman. Os grupos são:

- 1) POLE (polymerase-epsilon, catalytic subunit) ultramutado, caracterizado por altas taxas de mutação, baixo número de cópias com aberração, mutação no PTEN, PIK3R1, PIK3CA, FBXW7 e KRAS, evolução favorável.
- 2) Instabilidade de microssatélite (MSI hipermutado), grupo de ACEE caracterizados por instabilidade de microssatélites, devido a metilação do MLH1, altas taxas de mutação, baixo número de cópias com aberração, recorrente deleção da RPL22, e mutação do KRAS e PTEN.
- 3) Baixo número de cópias (tumores endométrioide), compreendendo ACEE grau 1 e 2 com instabilidade de microssatélite e baixa taxa de mutação, frequente mutação de CTNNB1.
- 4) Alto número de cópias (tumores serous –like), caracterizado por elevado número de cópias com aberração e baixa taxa de mutação, recorrente mutação de TP53, FBXW7 e PPP2R1A e mutação pouco frequente de PTEN e KRAS, prognóstico ruim (Kandoth et al., 2013).

A utilização desta classificação por dois patologistas com experiência em ginecologia oncológica, em 82 casos com diagnóstico de ACEE grau 3, levou a reclassificação em ACENE seroso em 20-25 % dos casos com concordância de 88% entre os observadores. (Soslow., 2013; Kandoth et al., 2013).

A presença de receptores hormonais para estrógeno e progesterona, normalmente se correlaciona com tumores de baixo grau, endométrioide, de melhor prognóstico. Aneuploidia tem sido correlacionada com tumores de pior prognóstico. Avaliação de atividade proliferativa também é fator preditivo de mal prognóstico. A superexpressão da ERBB2 tem sido associada a redução da sobrevida. A oncoproteína Stamina tem sido relacionada com a ativação da via PIK3 e tipos mais agressivos de ACE. A expressão aumentada da p53 e p16 tem identificado pacientes com ACE de alto risco (Salvesen, 2012).

Myers et al. (2014), encontraram mutação da CTNNB1 associado a alto risco de recorrência em tumores endometrióides la Grau1, sem tratamento adjuvante.

Portanto, fica claro, que muito se evoluiu na compreensão do comportamento e características biológicas do ACE, através da pesquisa de suas características genéticas e moleculares, por técnicas imunoistoquímicas e moleculares; porém ainda

há necessidade de um aprofundamento e confirmação do papel dos marcadores estudados, para determinar subtipos de ACE biologicamente distintos.

1.7 ACE, Claudinas 3 e 4 e IMP3

Em estudos prévios do nosso grupo (aguardando publicação), utilizando-se a técnica de Microarranjos de Tecido (TMA) e análise imunoistoquímica da expressão das Claudinas (CLDNs) 3 e 4 no ACE, observou-se que nos casos de ACEE, houve correlação positiva da intensidade da claudina-3 com estágio avançado da doença e claudina-4 com a presença de metástase a distância. Observou-se ainda que a claudina-4 se mostrou um marcador independente na avaliação de agressividade do ACEE. Portanto, tais estudos vieram acrescentar, que as claudinas 3 e 4 exercem um papel importante na progressão dos ACEE.

As claudinas são proteínas que fazem parte das junções estreitas das células epiteliais, as quais estão envolvidas na manutenção da polaridade celular, proliferação, diferenciação, e funcionam como uma barreira paracelular regulando a homeostase. Nas neoplasias ocorre a interrupção da adesão intracelular e acredita-se que a perda da integridade epitelial seja devido a expressão das claudinas, com consequente alteração do espaço paracelular e aumento do suprimento nutricional das células neoplásicas (Tonon, 2013).

A IMP3 faz parte de uma família de oncoproteínas fetais de ligação ao RNAm (RNA mensageiro) do fator de crescimento insulina-símile II (IGF2BP1, IGF2BP2, IGF2BP3), também representados pelas siglas (IMP1, IMP2, IMP3), entre outros sinônimos na literatura: CRD-BP, VICKZ, ZBP, VgRBP/Vera ou KOC. As três proteínas possuem 2 RRM (RNA –recognition motifs) na parte N-terminal e 4 domínios homólogos hnRNP-K (KH) na região C-terminal.

As IMPs são predominantemente citoplasmáticas, onde se ligam à mRNAs no complexo de RNPs (ribonucleoproteínas mensageiras) citoplasmáticas, controlando o seu destino, que pode evoluir para a tradução de uma proteína ou degradação do mRNA. Nos mamíferos, a sua estrutura em ordem e espaçamento dos domínios é muito semelhante, bem como a sequência de aminoácidos que é semelhante em mais

de 56% e acima de 73% entre as IMP1 e IMP3, o que sugere que dividam funções bioquímicas semelhantes (Bell et al., 2013; Lederer et al., 2014).

No período da embriogênese, a IMP3 é expressa em epitélios em desenvolvimento, músculos e placenta, tem importante papel na migração de células nervosas e desenvolvimento morfológico, envolvendo o controle do remodelamento e dinâmica do citoesqueleto. São altamente expressos em tecidos fetais e tumores malignos e raramente expressos em tecidos benignos. (Bell et al., 2013; Gong et al., 2014).

Estão relacionadas a várias funções celulares, como polarização celular, migração, morfologia, metabolismo, proliferação, diferenciação e adesão nas células tumorais. Também se relacionam a mau prognóstico, maior agressividade, metástases e expressão de fatores oncogênicos (KRAS, MYC e MDR1) (Bell et al., 2013).

O controle da expressão das IMPs parece estar relacionada ao microRNA let-7, beta-catenina e MYC (Bell et al., 2013).

A expressão da IMP3 tem sido associada a tumores agressivos em diferentes sítios, como: endométrio, ovário, colo, mama, carcinomas pancreáticos, renais, uroteliais, esofágicos, pulmonares, trato gastrointestinal entre outros, e também como fator preditivo na evolução de lesões pré neoplásicas para tumores invasivos. (Lu et al., 2011; Gong et al., 2014). A maioria dos estudos considerou apenas a IMP1 e IMP3, com menos evidências sobre o papel carcinogênico da IMP2 (Bell et al., 2013).

A primeira descrição da IMP3 em neoplasias malignas em humanos, foi no estudo de Müller – Pillasch et al. (1997), em neoplasias pancreáticas; Foi identificado um gene no cromossomo 7p11.5 denominado KOC (domínio KH contendo proteína superexpressa em câncer), envolvido na regulação da proliferação de células tumorais, tanto na fase de transcrição como pós transcricional.

A IMP3 foi estudada em câncer ginecológico, de endométrio, ovário e colo, associada à alto grau tumoral e mau prognóstico (Lederer et al., 2014). Vários estudos avaliaram a expressão da IMP3 em ACE, principalmente para diferenciar ACEE de ACENE serosos e identificar tumores mais agressivos. A maior parte dos estudos

utilizou anticorpos primários da marca DAKO, variando em sua diluição e na leitura e notas de corte no estudo imunoistoquímico.

Em estudo de Li et al. (2007), os autores avaliaram a imunoexpressão da IMP3 em ACE, e encontraram uma expressão significativamente maior em ACENE serosos em relação aos ACEE, também encontraram uma expressão aumentada da p53 e uma relação com neoplasias de alto grau.

Um painel com os marcadores IMP3, IMP2, p53, p16 pode ser útil na distinção de ACENE serosos e ACEE, em casos de lesão de alto grau duvidosos e tumores mistos, devendo sempre associar a morfologia da lesão, principalmente na peça cirúrgica (Gatius; Matias-Guiu., 2016).

Em estudo de Mhawech-Fauceglia et al. (2010), foram avaliados os marcadores, IMP3, PTEN, Beta-catenina e p53, entre os tumores serosos de endométrio e os endometrióides, para diferenciá-los, principalmente nos endometrióides de alto grau, que são muitas vezes um desafio. A IMP3 se mostrou o melhor marcador independente e associado à expressão positiva do PTEN, para prever casos de carcinoma seroso do endométrio. Em 2013 os mesmos autores , estudaram a associação de ER+/PR+/TFF3+/IMP3-, e observaram que esta combinação de marcadores, foi mais expressa em ACEE, em relação aos ACE serosos e de células claras; como marcador isolado, a IMP3 se manteve predominantemente expressa nos tumores serosos e de células claras.

A expressão significativamente maior em carcinomas serosos e suas lesões precursoras (carcinoma intraepitelial seroso do endométrio), foi observada em estudo de Wenxin Zheng et al. (2008).

O estudo atual pretende determinar a expressão da IMP3 e sua relação com as Claudinas 3 e 4 no ACE, para diferenciar pacientes com pior prognóstico e definir subtipos histológicos e desta forma compor um painel de marcadores moleculares que auxilie na tomada de decisões terapêuticas, bem como auxilie no diagnóstico de casos duvidosos.

2. Justificativa

O ACE é uma neoplasia maligna que se destaca por sua heterogenicidade de causas, padrão morfológico, alterações moleculares e evolução clínica. Prova disso se faz na classificação dualística, que divide os ACE em tipo 1 e 2 e nem sempre responde as informações necessárias, visto que, há sobreposição das características em parte dos casos, e não consegue caracterizar casos do tipo 1, teoricamente de bom prognóstico, que evoluem com metástases e recidiva em até 20 % e casos de alto risco, que evoluem com cura em até 50% dos casos. Encontrar marcadores que preencham estas lacunas e auxiliem na identificação de subtipos biologicamente distintos, vai melhorar a definição prognóstica e terapêutica da doença, o que é fundamental para o desfecho final.

A IMP3 é uma proteína já estudada em várias neoplasias malignas, relacionada a tumores mais agressivos; a sua expressão foi avaliada em câncer de endométrio principalmente para identificar ACENE, mas também associada a tumores de alto grau e outros marcadores como a p53.

Com este estudo pretende-se avaliar a expressão da IMP3 em ACE, não apenas para definir subtipos histológicos, mas também para avaliar outros fatores prognósticos, como associação com metástases, estadiamento, grau tumoral, e avaliar sua relação com as claudinas 3 e 4, que em estudos prévios do nosso grupo mostraram associação com ACEE e fatores de mau prognóstico como metástases à distância e estadiamento avançado.

Isso determinará mais um importante elemento na compreensão do ACE e na racionalização de decisões terapêuticas.



3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Analisar a associação da expressão da IMP3 com as claudinas 3 e 4 na determinação de prognóstico e subtipos histológicos no ACE.

3.2 Objetivos Específicos

- Correlacionar a expressão da IMP3 com a morfologia dos subtipos histológicos mais agressivos
 - Correlacionar a expressão da IMP3 com casos de pior prognóstico
 - Avaliar o perfil imunoistoquímico (Claudina 3 / claudina 4 / IMP3) como possível marcador de agressividade e pior prognóstico no ACE
 - Avaliar a expressão da IMP3 com marcadores prognósticos.

4. Artigo

*Análise da expressão da IMP3 na avaliação prognóstica
e morfológica do câncer de endométrio*

Silas O. R. Salum¹, Maria Aparecida C. Domingues², Elida Benquique Ojopi³, Ângela F. S. Tonon⁴, Agnaldo L. da Silva-Filho⁵.

- 1 Aluno da Pós-graduação do departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Botucatu, universidade Estadual Paulista, São Paulo, Brasil.
- 2 Departamento de Patologia, Faculdade de medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, Brasil.
- 3 Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, Brasil.
- 4 Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade estadual Paulista, São Paulo, Brasil.
- 5 Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

Endereço de correspondência: Agnaldo L. da Silva Filho, M.D, PHD

Departamento de Ginecologia e Obstetrícia

Universidade Federal de Minas Gerais

Avenida Alfredo Balena, 190, Santa Efigênia, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

Cep 30130100- Fone (31) 340989764-Fax (31) 34099765

e-mail: Agnaldo.ufmg@gmail.com

RESUMO

Introdução: O câncer de endométrio (CE) é a neoplasia ginecológica mais comum em países desenvolvidos, e tem um comportamento heterogêneo sob o aspecto clínico, biológico, e morfológico, com taxas de recorrência de 15 a 20% após a cirurgia. Este estudo avaliou, a associação entre a proteína 3 de ligação ao mRNA do fator de crescimento insulina símile II (IMP3), e fatores prognósticos e morfológicos do CE.

Métodos: Realizou-se um estudo retrospectivo tipo transversal analítico, com avaliação anátomo-clínica em 79 pacientes com CE, com 70 casos de adenocarcinoma endometrióide (ACEE) e 9 casos de carcinoma seroso, entre 1992 e 2010. Setenta e quatro amostras de endométrio benigno, obtidas de pacientes com patologias benignas (mioma e pólipos), foram utilizadas como controle. A expressão da IMP3 foi avaliada por imunohistoquímica e quantificada em intensidade e extensão, e então associada a fatores morfológicos e prognósticos, e claudinas (CLDNs) 3 e 4, receptor de estrogênio (RE) e receptores de progesterona (PR), p53 e KI-67.

Resultados: Foi evidenciada associação entre a expressão da IMP3 no carcinoma seroso, em comparação com o ACEE, tanto em intensidade ($p=0,044$) quanto em extensão ($p<0,001$), bem como nos seguintes fatores prognósticos: grau de diferenciação ($p=0,024$; $p<0,010$), estadiamento ($p<0,001$; $p<0,001$), metástase ($p=0,002$; $p<0,001$). A expressão de IMP3 foi significativa em extensão ($p=0,002$), nos tumores de endométrio quando comparados aos controles. Houve associação da proteína p53 ($p<0,001$; $p<0,001$) em intensidade e extensão, e KI-67 ($p=0,01$) em extensão. **Conclusão:** A expressão de IMP3 foi maior nos tumores serosos de endométrio, comparados aos ACEE. Também houve maior expressão no CE quando comparadas aos controles e com fatores de pior prognóstico.

INTRODUÇÃO

O câncer de endométrio (CE) é a neoplasia ginecológica mais comum em países desenvolvidos, tendo as mulheres, um risco de 2-3% de desenvolverem esta neoplasia durante a vida. Nos Estados Unidos a estimativa é de aproximadamente 60.050 novos casos e 10.470 mortes para o ano de 2016. (Siegel et al., 2016)

O principal fator de risco associado é a exposição excessiva de estrogênios sem oposição da progesterona (Sorosky, 2012; Colombo et al., 2015).

Trata-se de uma doença heterogênea no aspecto clínico, patológico, biológico e molecular, característica que dificulta prever seu comportamento, e adequar tratamentos mais eficientes (Murali et al., 2014).

A classificação dualística de Bokhman, divide o CE em dois subtipos distintos, baseado em características clínicas, epidemiológicas, endócrinas e metabólicas: tipo 1 (80-90%), associado ao adenocarcinoma endometrióide (ACEE), e tipo 2 (10-20%), que englobam os adenocarcinomas não endometrióides (ACENE), com comportamento mais agressivo. (Bokhman, 1983; Ellis et al., 2010; Murali et al., 2014).

O estudo molecular e genético tem auxiliado a caracterização dos dois subtipos. O tipo 1 está mais associado a alterações nos genes PTEN, PIK3CA, KRAS, B-catenina, e de reparo do DNA; enquanto no tipo 2 são mais comuns as mutações p53, STK15, amplificação da HER2/neu, superexpressão da p16, perda da E-caderina e perda de heterozigose (Llaudaró et al., 2012; Salvesen et al., 2012; Murali et al., 2014).

Apesar da maioria dos casos (75%) ser diagnosticado em estágio precoce, existe um subgrupo de tumores mais agressivos, que irão recidivar após o tratamento primário, em 15-20% dos casos, comprometendo a sobrevida global. A identificação deste subgrupo e dos mecanismos envolvidos na progressão da doença, permitirá direcionar melhores tratamentos (Werner, 2014; Salvesen et al., 2012).

A IMP3 é membro de uma família de 3 proteínas de ligação ao mRNA: IMP1, IMP2, IMP3. É uma oncoproteína fetal que se expressa nos períodos de embriogênese e em tumores malignos, associada a pior prognóstico, e é rara ou ausente em tecidos

benignos (Gong et al., 2014). Foi clonada pela primeira vez em tumores pancreáticos, e estudos in-vitro mostram sua função na modulação pós-transcricional da expressão de genes relacionados a proliferação, adesão, invasão, quimioresistência e metástases. (Muller-Pillasch et al., 1997; Bell et al., 2013; Lederer et al., 2014).

A maioria dos estudos associando neoplasias ginecológicas e IMP3, foram em tumores de endométrio, ovário e colo do útero, e foi utilizado técnica de imunoistoquímica com anticorpo da marca Dako. A nota de corte para considerar a positividade da IMP3 variou muito nestes estudos (Gong et al., 2014; Lederer et al., 2014).

No CE a expressão da IMP3 avaliou a diferenciação entre os casos de ACENE e ACEE, e a associação da patogênese e com os fatores prognósticos, como grau de diferenciação tumoral e estadiamento (Li et al., 2007; Zheng et al., 2008; Mhaweche-Fauceglia et al., 2010; Mhaweche-Fauceglia et al., 2013).

Li et al. (2007), fizeram o primeiro estudo entre ACE e IMP3, e demonstraram associação com ACENE serosos e tumores de alto grau. Zheng et al. (2008), também encontraram associação com tumores serosos e lesões precursoras. Mhaweche-Fauceglia et al. (2010), concluíram que a IMP3 foi o melhor marcador para distinguir ACENE seroso de ACEE, em relação a B-catenina, p53 e PTEN. Os mesmos autores em 2013, definiram o painel RE+/RP+/TTF3+/IMP3-, como melhor marcador para tumores endometrióides.

O presente estudo avaliou a associação da expressão da IMP3 com fatores prognósticos e morfológicos do ACE e com os marcadores tumorais claudinas 3 e 4, receptor de estrogênio (RE), receptores de progesterona (PR), p53 e KI-67, visando auxiliar a definição de subtipos histológicos e identificar tumores com pior prognóstico.

MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de estudo retrospectivo transversal analítico de caso-controle com análise anatomoclínica em pacientes com adenocarcinoma de endométrio .

Foram selecionadas 79 pacientes com exame anátomo-patológico evidenciando CE, com 70 casos de ACEE e 9 casos de ACENE serosos. (Tonon, 2013)

A partir dos laudos, foram identificados os prontuários para coleta de dados clínicos e os blocos de parafina do Departamento de Patologia da FMB-UNESP. As pacientes foram diagnosticadas no período de 1992 à 2010 e tratadas por histerectomia total abdominal + salpingo-ooforectomia bilateral + linfadenectomia s/n e adjuvância s/n.

As amostras selecionadas foram revisadas por um ginecopatologista (MACD), para confirmação diagnóstica, e classificadas segundo os critérios da OMS para os Adenocarcinomas de Endométrio, (Tavassoli; Deville, 2003).

A partir dos blocos de parafina foi elaborada a plataforma de Tissuemicroarrays (TMA), para posterior estudo imunohistoquímico.

No grupo controle foram selecionadas 74 pacientes, com diagnóstico anatomopatológico de prolapso e leiomioma uterino, que apresentavam endométrio com padrão atrófico, proliferativo e secretor.

O estudo foi submetido ao Comitê de Ética em pesquisa da FMB-UNESP, com dispensa do termo de consentimento livre e esclarecido (CAAE: 42995315.2.0000.5411).

Coleta de Dados

Clínicos

Nas pacientes com CE e controles foram coletados: idade e *status* menopausal. Também se registrou nas pacientes com CE, as seguintes características: menopausa, paridade, uso de contracepção hormonal, peso, altura, índice de massa corpórea (IMC) , antecedente de diabetes e hipertensão, uso e tempo de terapia hormonal e características do ciclo menstrual.

Ultrassonográficos

O volume uterino (cm^3), foi calculado pelos diâmetros longitudinal, anteroposterior e transversal, por exame transvaginal. A espessura do endométrio (mm) foi medida de basal a basal, em corte sagital do útero.

Laboratoriais

O marcador tumoral CA-125 foi quantificado pelo método de quimiluminescência, conforme recomendações do fabricante, (valor de referência < 35,0 U/ml). (Architect i 2000 SR).

Anatomopatológicos

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

Seguimento clínico

Foram levantadas as seguintes informações: tratamento adjuvante (radioterapia, quimioterapia, e hormonioterapia), recidivas e metástases à distância.

Elaboração do Tissue microarrays (TMA).

Foi confeccionada uma plataforma de TMA (conforme descrito por Nagai e cols, 2007) por meio do aparelho Tissue Microarrayer (Beecher Instruments[®], Silver Spring, USA), contendo amostras representativas (cores) de 79 casos de CE e 74 do grupo controle, com endométrio atrófico, proliferativo e secretor.

Avaliação Imunohistoquímica

A reação imunohistoquímica foi realizada segundo protocolo do serviço. Os anticorpos primários utilizados foram: IMP3 (Dako, 1:100, clone 69.1). Os cores foram incubados por 1 hora. Os anticorpos secundários utilizados foram obtidos do Kit Flex Mouse Dako. A especificação dos demais marcadores consta na tabela 2.

Leitura do TMA

Para a IMP3 foi utilizado um score de leitura avaliando-se a extensão e intensidade da imunomarcac o citoplasmática:

- Para extensão: 0 = negativo; 1 = até 1/3 do core; 2 = até 2/3 do core; 3 = acima de 2/3 do core;
- Para intensidade: 0 = negativo; 1 = discreta; 2 = moderada; 3 = intensa.

Para a expressão da proteína p53 utilizou-se o mesmo score de leitura da IMP3 em intensidade e extensão, porém nesta, avaliou-se a imunomarcac o nuclear.

O  ndice de prolifera o nuclear, avaliado pela imunomarcac o nuclear do KI-67, traduziu a porcentagem de núcleos corados em 100 células/core e assumiu-se uma nota de corte de 25% .

Para os receptores de estrógeno e progesterona, foram avaliadas a imunomarcac o nuclear, positiva ou negativa, e a porcentagem de núcleos corados em 100 células/core.

Para as claudinas 3 e 4, foi elaborado um score que observou:

- Padrão da colora o da membrana: 0 = negativo; 1= padrão focal; 2 = padrão difuso; 3 = padrão difuso em membrana e citoplasma; a porcentagem das células coradas : 0 = negativa a 5 %; 1 = 6% a 30 %; 2 = 31% a 50 %; 3 = 51 % a 80 %; 4 = 81% a 100%;
- Intensidade de marca o: 0 =negativa; 1 = discreta; 2 = moderada; 3 = intensa.

Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o software versão 19.9 (SPSS.Inc, Chicago, IL).Foi utilizado o teste QUI-Quadrado para avaliar associa o

da expressão da IMP3 nas amostras de câncer de endométrio e endométrio normal, e nas variáveis tumorais indicadoras de prognóstico, bem como sua associação com os marcadores CLDNs 3 e 4, KI-67, RE, RP, e p53. As diferenças foram consideradas significativas com valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Nas 79 pacientes com CE a idade variou entre 36 e 80 anos (mediana de 63 anos). Nas 74 pacientes com endométrio normal observou-se 19 casos com padrão atrófico, 50 proliferativo e 5 secretor, com idade variando de 36 a 80 (mediana de 60 anos).

Nos tumores de endométrio, a maioria das pacientes apresentou idade acima de 52 anos no momento do diagnóstico, menopausa acima 48 anos, IMC > 25 , hipertensão, CA125 ≤ 35 U/ mL, espessura endometrial > 4 mm, ausência de diabetes, hiperplasia e câncer de mama.

Houve 7 casos de metástase à distância, sendo 4 (57,1%) ACEE e 3 (42,9%) ACENE serosos. A distribuição em relação ao grau histológico foi feita em 73 casos: 58.9% G1; 28.7% G2; 12.3% G3. O estadiamento FIGO dos 79 casos foi: 78.4% IA; 15.1% IB; 3.7% IIIA; 1.2 % IV .

A invasão miometrial foi avaliada em 77 casos: 74% < 50 % e 26% > 50 % .

Foram identificados 70 subtipos histológicos de ACEE e 9 subtipos de ACENE serosos. Não houve diferenças significativas nos dados clínicos e anátomopatológicos, entre esses dois grupos. (Tabela 1)

O padrão de marcação da IMP3 foi avaliado em intensidade e extensão conforme Figura 1.

Na avaliação da expressão da IMP3 nos CE e controles, houve um resultado estatisticamente significativo, quando a marcação da IMP3 foi avaliada em extensão ($p = 0.002$), porém sem associação em intensidade ($p = 0.121$) (Figura 2).

Houve diferença significativa da expressão da IMP3 com metástases à distância, em intensidade ($p < 0.002$) e extensão ($p < 0.0001$) (Figura 3); com o grau de diferenciação tumoral, em intensidade ($p < 0.024$) e extensão ($p < 0.01$) (Figura 4); com estadiamento, em intensidade ($p < 0.001$) e extensão ($p < 0.001$) (Figura 5).

Observou-se imunoexpressão da IMP3 em intensidade ($p < 0.0001$) e extensão ($p < 0.0001$), em casos de ACENE serosos, comparados aos subtipos histológicos de ACEE (Figura 6). Não houve associação da expressão da IMP3 com invasão miometrial profunda ($> 50\%$).

Não houve diferença significativa na associação entre a expressão da IMP3 com as CLDs 3 e 4, RP e RE.

Houve diferença significativa na associação com a expressão da proteína p53 tanto em extensão x intensidade e extensão da IMP3 ($p < 0.001$), quanto em intensidade x intensidade e extensão ($p < 0.001$; $p < 0.001$). (Figuras 7 e 8)

Houve associação da IMP3 com KI-67, em extensão ($p < 0.01$), mas não em intensidade ($p < 0.218$) (Figura 9).

DISCUSSÃO

O câncer endometrial apresenta comportamento heterogêneo nos aspectos clínico, biológico, morfológico, genético e molecular. Apesar de diagnosticado precocemente na maioria dos casos, 20 % das pacientes classificadas como de baixo risco por critérios clínicos e patológicos evoluirão de maneira desfavorável (Werner; Salvesen., 2014).

O estudo morfológico associado à características clínicas, epidemiológicas e moleculares, não tem sido suficiente para distinguir subtipos biologicamente distintos (Murali et al., 2014).

A distinção entre tumores de alto grau, mais frequentemente entre ACE grau 3 e ACENE serosos, é um desafio, mesmo com o uso da imunohistoquímica (Soslow, 2013).

Neste cenário, é fundamental determinar marcadores que isoladamente ou em associação definam subtipos de alto risco, com maior probabilidade de recidiva e metástases para direcionar o tratamento (Salvesen, 2012; Werner; Salvesen., 2014).

O estudo atual avaliou a expressão da IMP3 e sua associação com fatores prognósticos, morfológicos e com os marcadores CLDN 3 e 4, RE, RP, P53 e KI-67.

Os estudos realizados até o momento, utilizando IMP3 foram feitos por imunohistoquímica, normalmente interpretando a intensidade da coloração e a porcentagem de células coradas. Caracteristicamente, suas notas de corte para considerar o exame positivo ou negativo, apresentam grandes variações (Jiang et al., 2008; Walter et al., 2009; Jeng et al., 2008).

No presente estudo, a imunoexpressão da IMP3 foi avaliada em intensidade e extensão e os resultados demonstraram que houve expressão significativa da IMP3 nas pacientes com CE, em relação aos controles. Este achado encontra-se de acordo com o que há na literatura, mostrando sua maior expressão em várias neoplasias malignas (Bell et al., 2013; Lederer et al., 2014). Outros estudos, avaliando IMP3 nos tumores de endométrio não encontraram expressão em tecidos benignos do grupo controle (Li et al., 2007; Zheng et al., 2008; Mhawech-Fauceglia et al., 2010). Esses

resultados reforçam o importante papel da IMP3 auxiliando a diferenciação entre de lesões malignas e benignas.

Na avaliação do grau de diferenciação tumoral, houve associação da expressão da IMP3 com alto grau tumoral, demonstrando o papel deste marcador para diferenciar neoplasias mais agressivas. Estudos avaliando adenocarcinomas ductais pancreáticos de alto grau, carcinomas de células renais e carcinomas hepáticos obtiveram resultados semelhantes (Schaeffer et al., 2010; Jiang et al., 2008; Jeng et al., 2008). Outro artigo também observou associação da expressão da IMP3 com neoplasias endometriais de alto grau (Mhaweche-Fauceglia et al., 2010). Os dados do atual estudo determinaram uma associação tanto na marcação por intensidade como por extensão entre IMP3 e ACENE serosos, destacando-se que a maioria dos casos de maior expressão da intensidade e extensão se concentraram neste grupo, dados que combinam com a literatura (Li et al., 2007; Zheng et al., 2008; Mhaweche-Fauceglia et al., 2010).

Estudo avaliando a expressão da IMP3 com metástases em cânceres ginecológicos, não evidenciou esta associação (Lereder et al., 2014). Dados do atual estudo mostram associação entre ACE, metástases e estadiamento avançado. Lu et al. (2009), demonstrou uma maior expressão nas metástases de tireóide, mama, endométrio e células escamosas, sugerindo o papel desta proteína na progressão das neoplasias.

Observou-se também a associação da IMP3 com KI-67, um importante marcador de proliferação celular e neoplasias mais agressivas. Até o presente momento este fato não foi relatado, sendo mais um elemento que demonstra a característica da IMP3 em se associar a neoplasias agressivas.

Os resultados também foram significativos na associação da IMP3 com a p53, e corroboram a literatura vigente. (Li et al., 2007; Santacana et al., 2014). Os ACENE serosos apresentam altas taxas de mutação da p53, variando entre 67%-90% (Soslow, 2013). Na maioria dos estudos, a expressão aumentada da p53 tem sido associada com baixa sobrevida sendo um marcador independente de mau prognóstico no ACE (Alvarez et al., 2012).

O presente estudo obteve expressivos resultados na avaliação de fatores prognósticos e morfológicos no CE, alguns deles ainda inéditos na literatura,

demonstrando a importância deste marcador na definição de subtipos histológicos, especificamente para ACENE serosos, e na identificação de neoplasias com comportamento mais agressivo.

A metodologia aplicada nesse estudo pode ser facilmente reproduzida em novos estudos, como na prática diária, porém é importante que nossos resultados sejam validados com futuros estudos prospectivos e com maior casuística, que determinem um padrão de leitura e nota de corte da imunexpressão da IMP3.

Conflito de Interesses

Não houve.

TABELAS

Tabela 1: Características gerais das pacientes com câncer endometrial estratificadas pelos subtipos histológicos.

Variável	Endometrióide n (%)	Não Endometrióide n (%)	p
Idade (anos)			
<52	11 (16)	0 (0)	0.346
≥52	59 (84)	9 (100)	
Menarca (anos)			
<13	32 (46)	6 (67)	0.480
≥13	35 (50)	3 (33)	
ND	3 (4)	0 (0)	
Menopausa (anos)			
<48	19 (27)	2 (22)	1.000
≥48	46 (66)	7 (78)	
ND	5 (7)	0 (0)	
Tempo de menopausa (anos)			
<14	31 (44)	2 (22)	0.283
≥14	35 (50)	7 (78)	
ND	4 (6)	0 (0)	
IMC (Kg/m ²)			
< 25	14 (20)	0 (0)	0.195
≥ 25	52 (74)	9 (100)	
ND	4 (6)	0 (0)	
Hipertensão			
Sim	47 (67)	5 (56)	0.461
Não	21 (30)	4 (44)	
ND	2 (3)	0 (0)	
Diabetes			
Sim	21 (30)	4 (44)	0.470
Não	45 (64)	5 (56)	
ND	4 (6)	0 (0)	
Hiperplasia			
Sim	5 (7)	0 (0)	1.000
Não	60 (86)	9 (100)	
ND	5 (7)	0 (0)	
Câncer de Mama			
Sim	4 (6)	1 (11)	0.487
Não	61 (87)	8 (89)	
ND	5 (7)	0 (0)	
			Continua

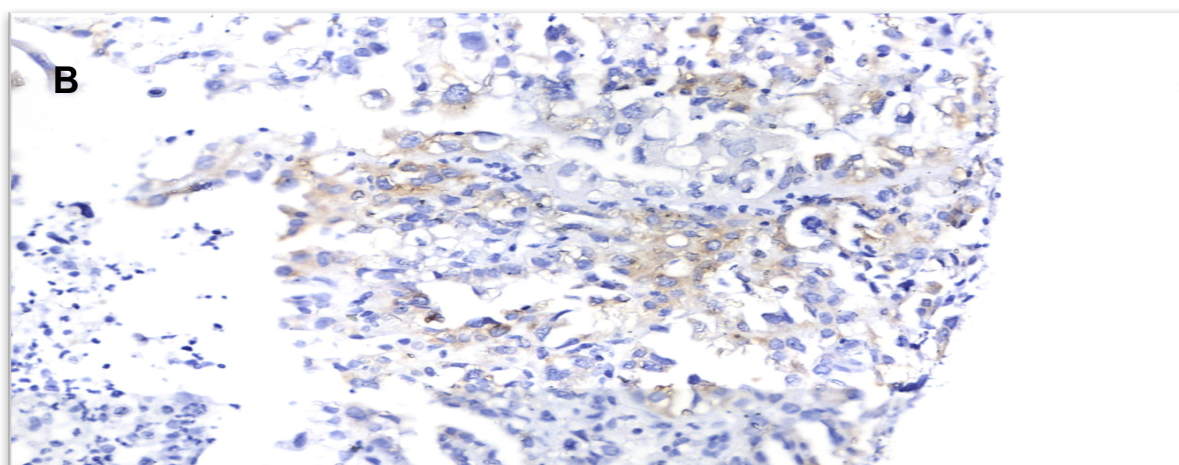
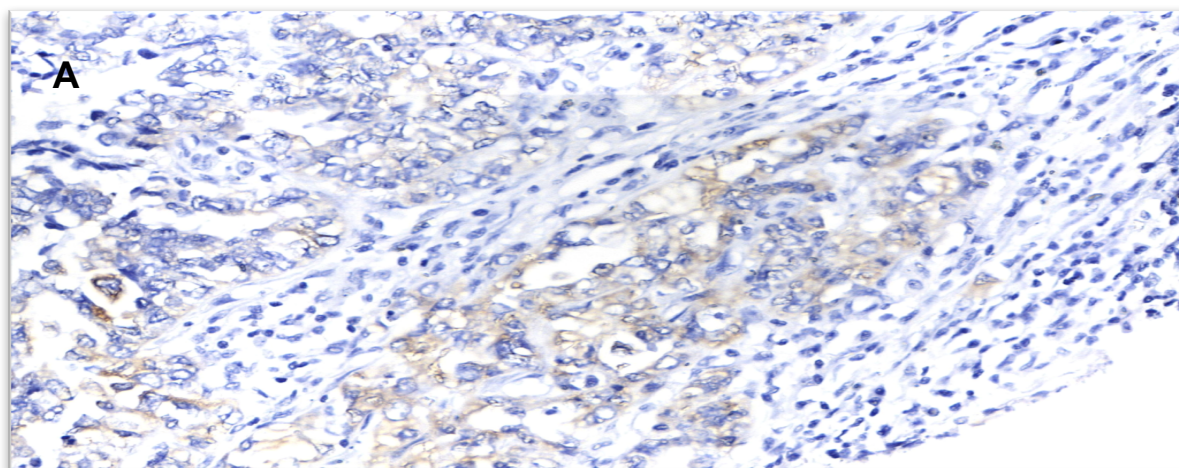
Continuação

Variável	Endometrióide n (%)	Não Endometrióide n (%)	p
CA125 (U/mL)			
≤ 35	51 (73)	5 (56)	0.141
> 35	9 (13)	3 (33)	
ND	10 (14)	1 (11)	
Espessura Endometrial (mm)			
≤ 4	5 (7)	1 (11)	0.466
> 4	52 (74)	5 (56)	
ND	13 (19)	3 (33)	
Volume Uterino (cm ³)			
< 83	32 (46)	3 (33)	0.478
≥ 83	30 (43)	6 (67)	
ND	8 (11)	0 (0)	
Grau de Diferenciação			
1	42 (60)	ND	ND
2	18 (26)	ND	
3	4 (6)	ND	
ND	6 (9)	ND	
Invasão miometrial			
1 ^a	54 (77)	5 (56)	0.220
1B	16 (23)	4 (44)	
ND			
Estadiamento			
1 ^a ,1B	68(98.5)	6(77)	1.000
3A,4	1(1.5)	3(33)	
Metástase			
Não	59 (87)	6 (67)	1.000
Sim	4 (6)	3 (33)	
ND	5 (7)	0 (0)	

Nota: Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$ pelo teste χ^2 .

Tabela 2 – Anticorpos primários, secundários e metodologia usada no estudo imunoistoquímico

Anticorpo Primário	Clone	Código	Marca	Diluição	Anticorpo Secundário	Recuperação	Cromógeno
RE	SP1	RM9101	Thermo	1:100	Kit HiDef Polímero Cell Marque 454D	Trilogy 920P em Panela Pressurizada 117°C	Kit DAB Cell Marque 957-D
RP	Y85	323R	Cell Marque	1:200	Kit HiDef Polímero Cell Marque 454D	Trilogy 920P em Panela Pressurizada 117°C	Kit DAB Cell Marque 957-D
KI67	SP6	275R	Cell Marque	1:250	Kit HiDef Polímero Cell Marque 454D	Trilogy 920P em Panela Pressurizada 117°C	Kit DAB Cell Marque 957-D
P53	DO-7	453M	Cell Marque	1:150	Kit HiDef Polímero Cell Marque 454D	Trilogy 920P em Panela Pressurizada 117°C	Kit DAB Cell Marque 957-D
CLDN3	Policional	341700	Invitrogen	1:100	Kit HiDef Polímero Cell Marque 454D	Trilogy 920P em Panela Pressurizada 117°C	Kit DAB Cell Marque 957-D
CLDN4	3E2C1	329400	Invitrogen	1:50	Kit HiDef Polímero Cell Marque 454D	Trilogy 920P em Panela Pressurizada 117°C	Kit DAB Cell Marque 957-D

FIGURAS

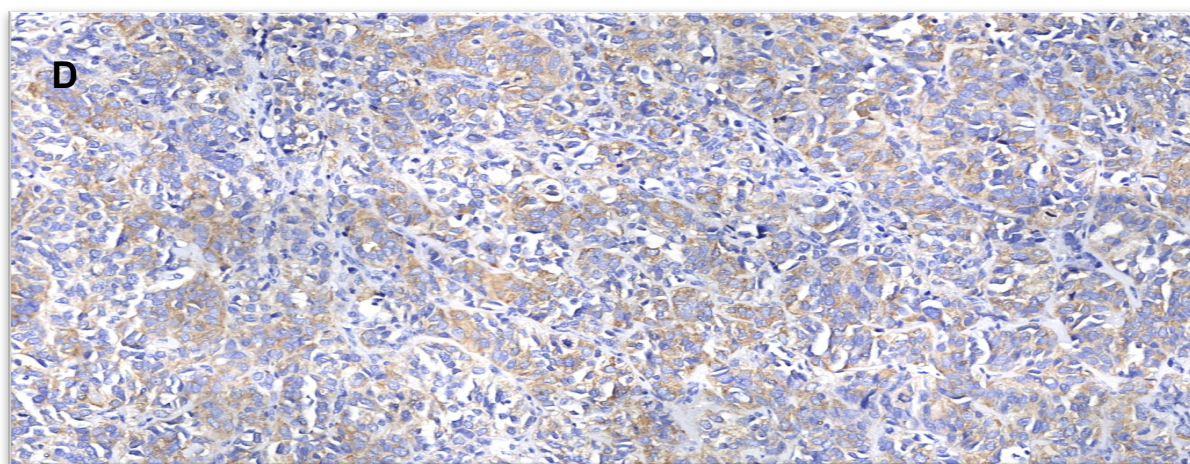
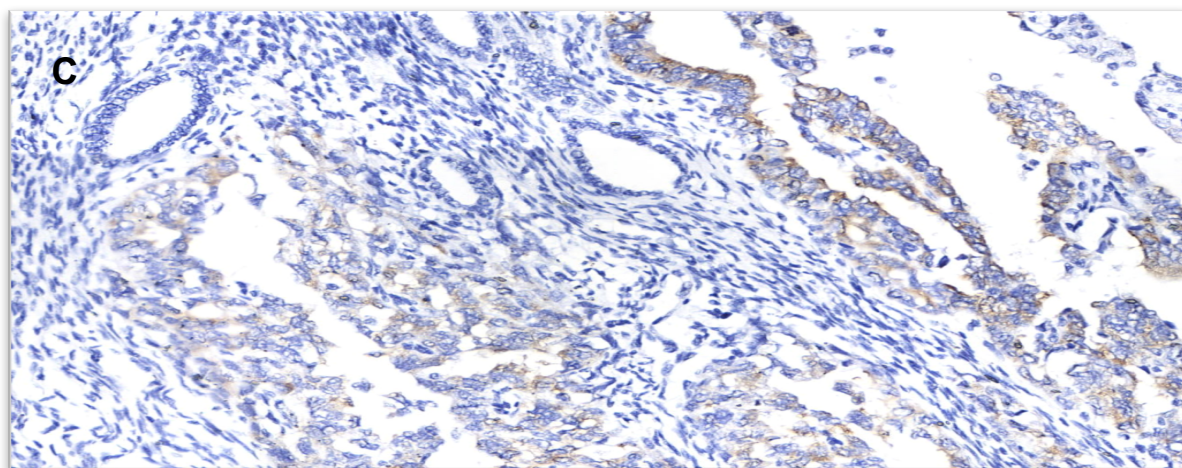


Figura 1: Expressão da IMP3 por imunohistoquímica em casos de câncer de endométrio: A) Intensidade 1 e Extensão 1; B) Intensidade 1 e Extensão 2; C) Intensidade 2 e Extensão 2; D) Intensidade 3 e Extensão 3.

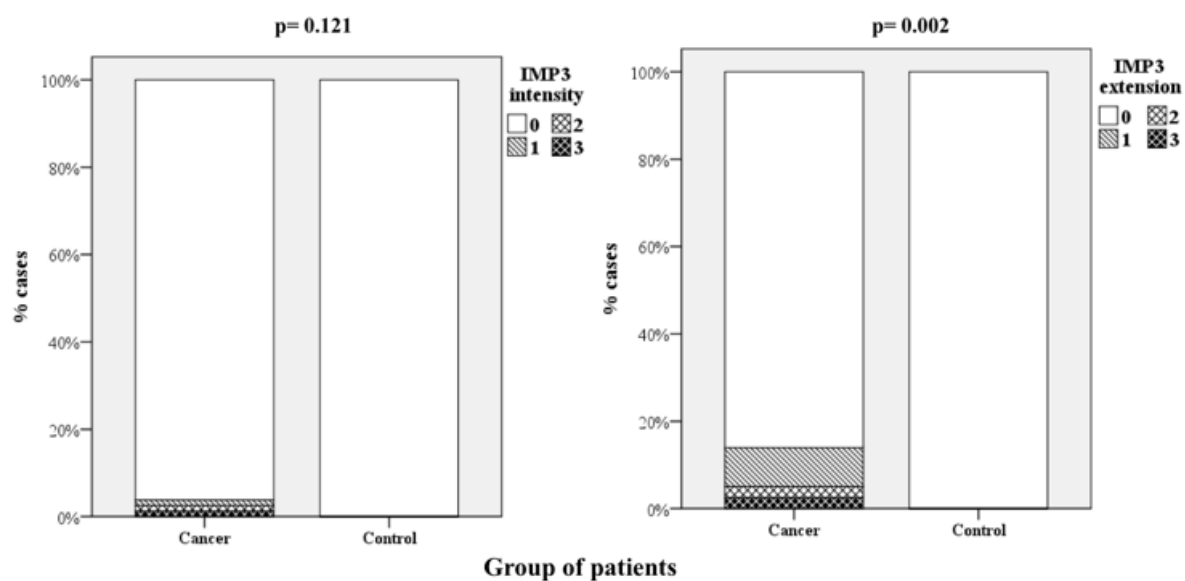


Figura 2: Expressão da IMP3 nas pacientes com câncer de endométrio e com endométrio normal.

Nota: Gráfico de barras mostrando a porcentagem de casos com ACE e expressão da IMP3 comparado com o grupo controle. Dados obtidos de 79 casos de ACE e 74 casos benignos. Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$ pelo teste χ^2 .

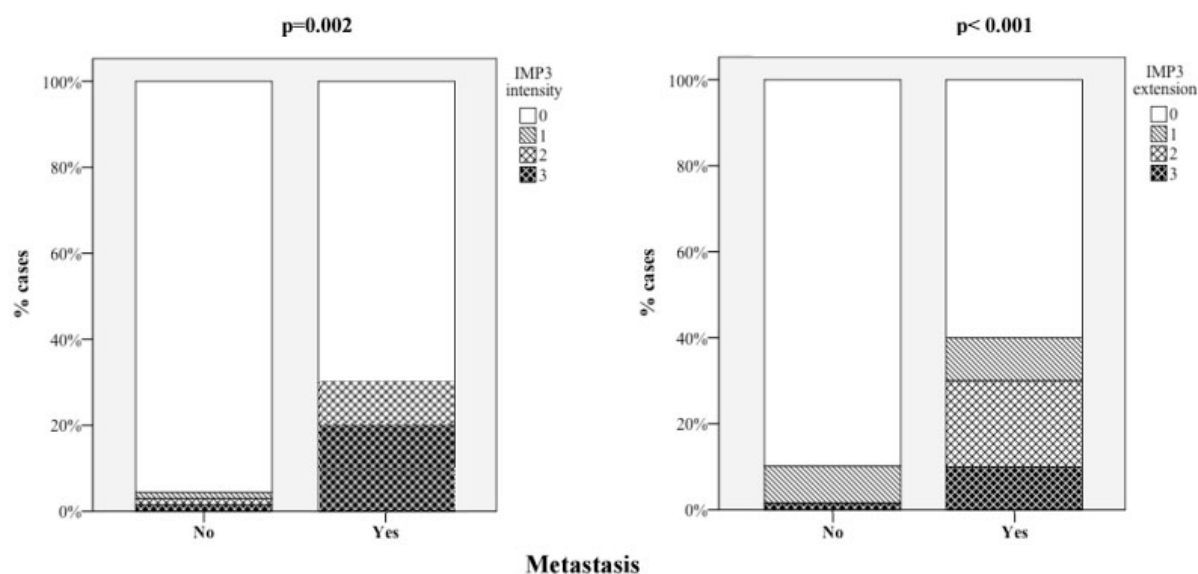


Figura 3: Expressão da IMP3 em intensidade e extensão nas pacientes com e sem metástases à distância.

Nota: Gráfico de barras mostrando a porcentagem de casos de ACE com expressão da IMP3 associado à ausência ou presença de metástases à distância. Dados obtidos de 78 casos de ACE. Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$ pelo teste χ^2 .

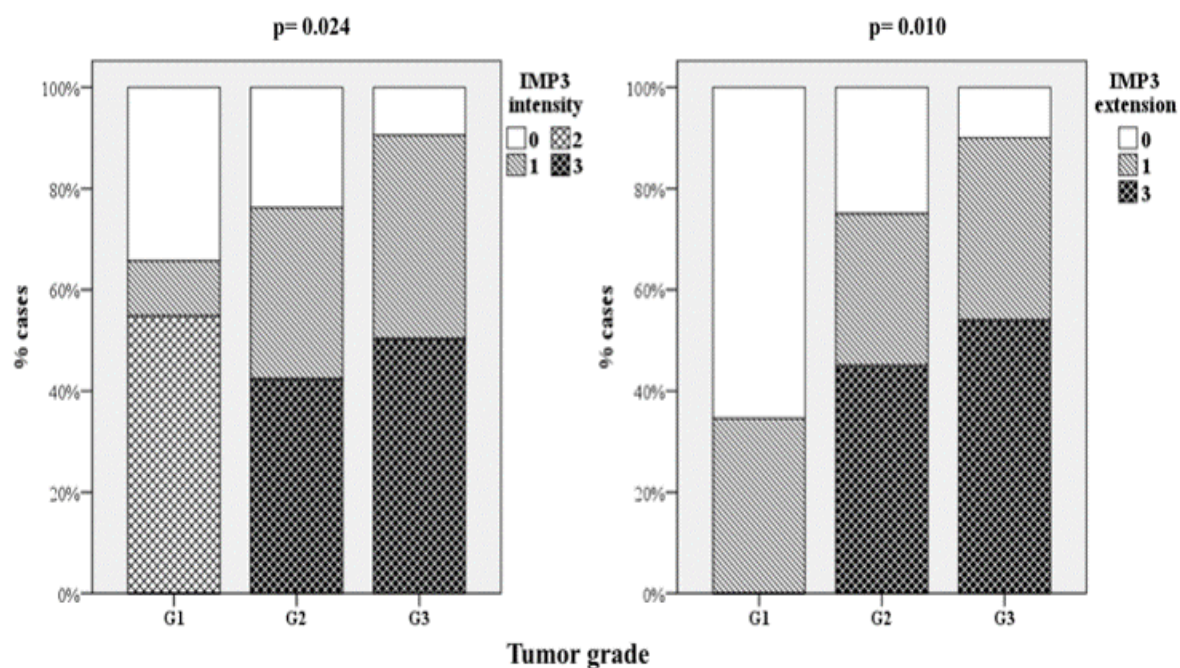


Figura 4: Associação entre a expressão da IMP3 em intensidade e extensão e o grau de diferenciação tumoral.

Nota: Gráfico de barras mostrando a porcentagem de casos de ACE com expressão associada ao grau tumoral. Dados obtidos de 73 casos de ACE. Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$ pelo teste χ^2 .

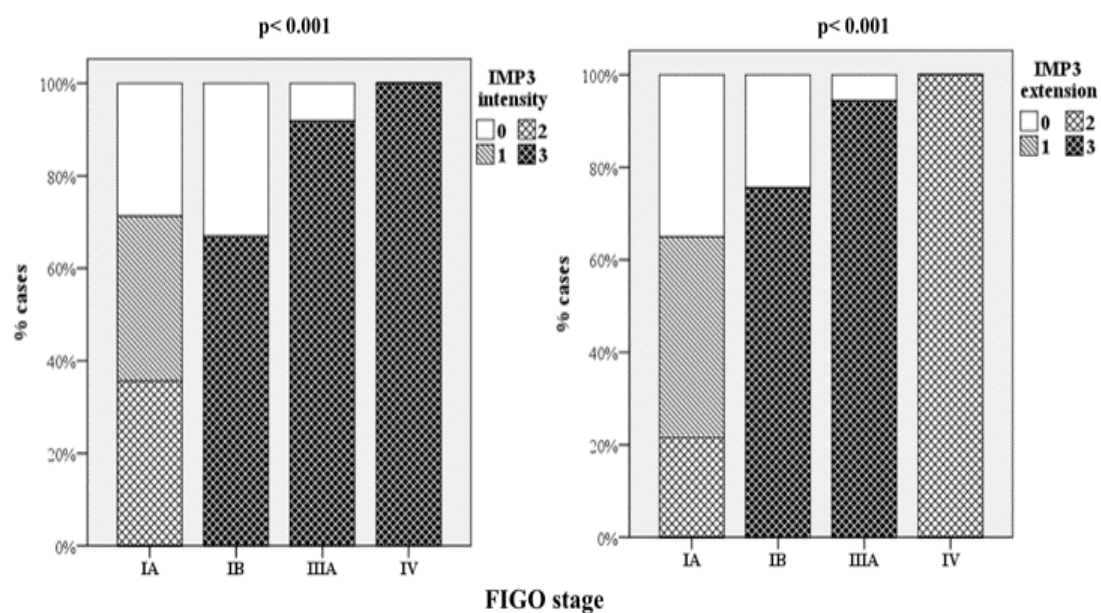


Figura 5: Associação entre a expressão da IMP3 em intensidade e extensão e o estadiamento do câncer de endométrio.

Nota: Gráfico de barras mostrando a porcentagem de casos de ACE com expressão da IMP3 em relação ao estadiamento FIGO. Dados obtidos de 78 casos de ACE. Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$ pelo teste χ^2 .

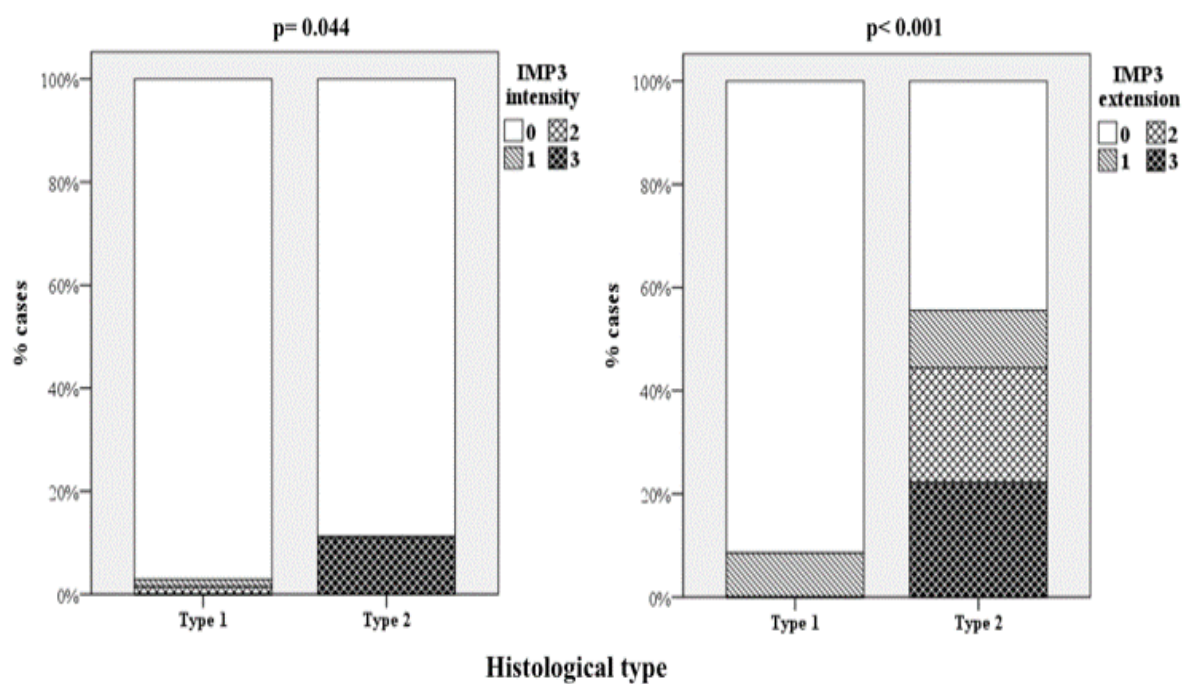


Figura 6: Associação da imunoexpressão da IMP3 em intensidade e extensão, entre as pacientes com ACENE serosos e ACE.

Nota: Gráfico de barras demonstrando uma porcentagem significativamente maior da expressão da IMP3 em intensidade e extensão nos casos de ACENE serosos. Dados obtidos de 79 casos de ACE. Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$ pelo teste χ^2 .

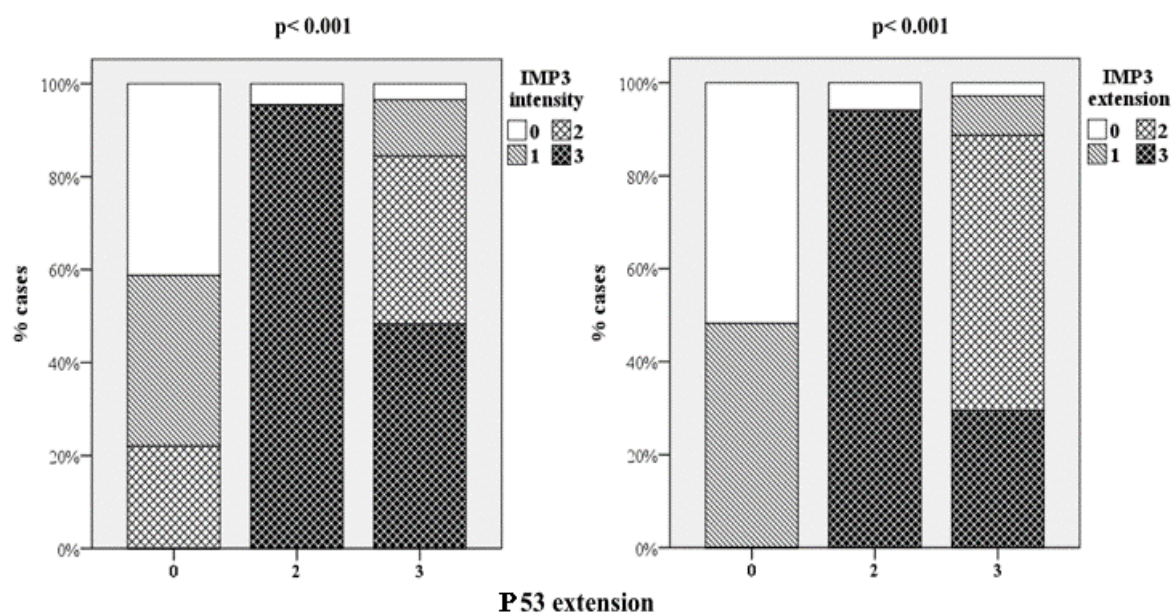


Figura 7: Avaliação da associação entre expressão da proteína p53 em extensão x intensidade e extensão da IMP3.

Nota: Gráfico de barras demonstrando que houve associação entre a expressão da IMP3 e da p53. Dados obtidos de 74 casos de ACE. Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$ pelo teste χ^2 .

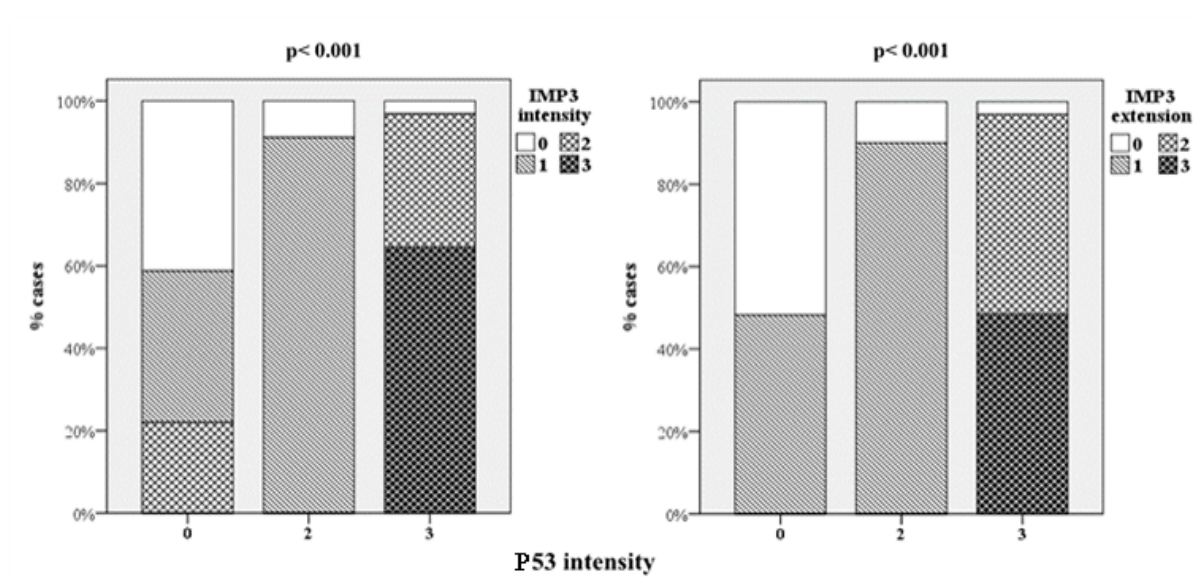


Figura 8: Avaliação da associação entre expressão da proteína p53 em intensidade x intensidade e extensão da IMP3.

Nota: Gráfico de barras demonstrando que houve associação entre a expressão da IMP3 e da p53. Dados obtidos de 74 casos de ACE. Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$ pelo teste χ^2 .

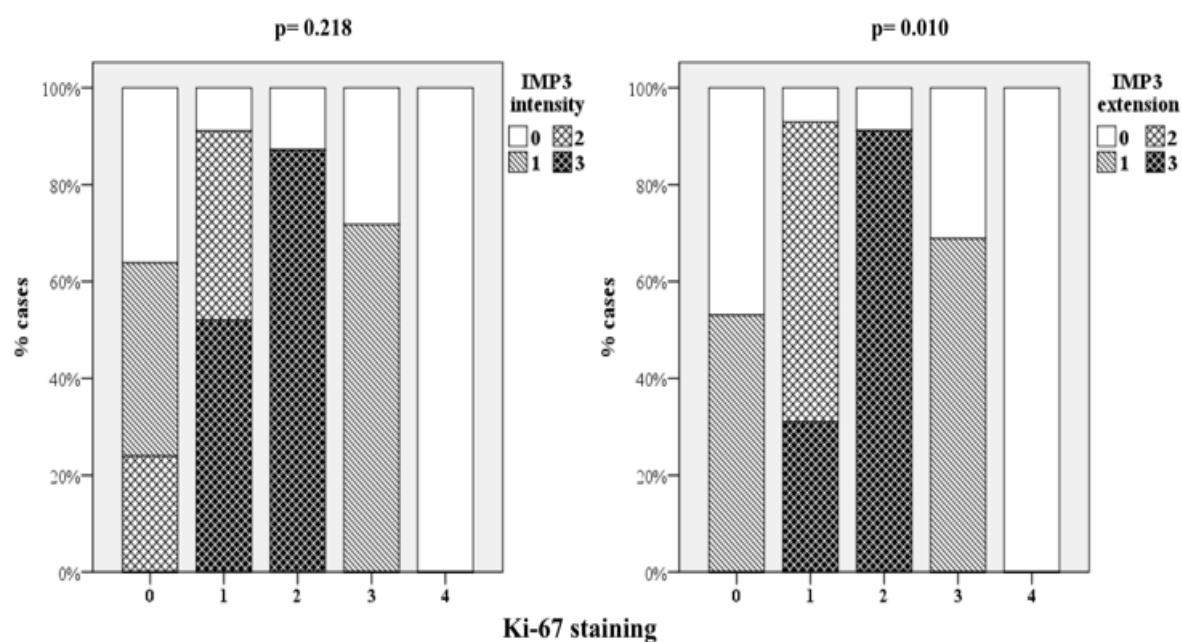


Figura 9: Associação da IMP3 com KI-67, em extensão e em intensidade.

Nota: O ponto de corte determinado para a KI-67 foi de 25% de células coradas e a porcentagem de células coradas foi dividida em: 0 = 0 - 5%, 1 = 6 - 24%, 2 = 25 - 50%, 3 = 51 - 80%, 4 = 81 - 100%. Houve diferença significativa na associação da KI-67 x IMP3 em extensão. Dados obtidos de 73 casos de ACE. Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$ pelo teste χ^2 .

REFERÊNCIAS

Alvarez T, Miller E, Duska L, Oliva E. Molecular Profile of Grade 3 Endometrioid Endometrial Carcinoma: Is it a Type I or Type II Endometrial Carcinoma? *Am J Surg Pathol*. 2012 may; 36(5):753-61.

Bell JL, Wächter K, Mühleck B, Pazaitis N, Köhn M, Lederer M, Hüttelmaier S. Insulin-like growth factor 2 mRNA –binding proteins (IGF2PBs): post transcriptional drivers of cancer progression?. *Cell Mol Life Sci*. 2013 aug; 70(15):2657-75.

Bokhman JV. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol*. 1983 feb; 15(1):10–7.

Bosse T, Nout RA, Stelloo E, Dreef E, Nijman HW, Jürgenliemk-Schulz IM, Jobsen JJ, Creutzberg CL, Smit VT. L1 cell adhesion molecule is a strong predictor for distant recurrence and overall survival in early stage endometrial cancer: pooled PORTEC trial results. *Eur J Cancer*. 2014 Oct; 50(15):2602-10

Colombo N, Creutzberg C, Amant F, Bosse T, González-Martín A, Ledermann J, Marth C, Nout R, Querleu D, Mirza MR, Sessa C. Esmo-Esgo-Estro Consensus Conference on Endometrial Cancer: Diagnosis, Treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2016 jan; 27(1):16-41.

Findeis-Hosey JJ, Xu H. The use of insulin like-growth factor II messenger RNA binding protein-3 in diagnostic pathology. *Hum Pathol*. 2011 mar; 42(3):303–314.

Gatius S, Matias-Guiu X. Practical issues in the diagnosis of serous carcinoma of the endometrium. *Mod Pathol*. 2016 Jan; 29 Suppl 1: S 45-58.

Gong Y, Woda BA, Jiang Z. Oncofetal protein IMP3, a new cancer biomarker. *Adv Anat Pathol*. 2014 May; 21(3):191-200.

Jeng YM, Chang CC, Hu FC, Chou HY, Kao HL, Wang TH, Hsu HC. RNA-binding protein insulin-like growth factor II mRNA-binding protein 3 expression promotes tumor invasion and predicts early recurrence and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2008 oct; 48(4):1118–27.

Jeng YM, Chang CC, Hu FC, Chou HY, Kao HL, Wang TH, Hsu HC. RNA-binding protein insulin-like growth factor II mRNA-binding protein 3 expression promotes tumor invasion and predicts early recurrence and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2008 oct; 48(4):1118-27.

Jiang Z, Chu PG, Woda BA, Liu Q, Balaii KC, Rock KL, Wu CL. Combination of quantitative IMP3 and tumor stage: a new system to predict metastasis for patients with localized renal cell carcinomas. *Clin Cancer Res*. 2008 sep 1; 14(17):5579-84.

Lederer M, Bley N, Schleifer C, Hüttelmaier S. The role of the oncofetal IGF2 mRNA-binding protein 3 (IGF2BP3) in cancer. *Semin Cancer Biol*. 2014 Dec; 29:3-12.

Li C, Zota V, Woda BA, Rock KL, Fraire AE, Jiang Z, Lu D, Xu B, Dresser K, Lutman CV, Fischer AH. Expression of a novel oncofetal mRNA-binding protein IMP3 in endometrial carcinomas: diagnostic significance and clinicopathologic correlations. *Mod Pathol*. 2007 dec; 20(12):1263-8.

Llauradó M, Ruiz A, Majem B, Ertekin T, Colás E, Pedrola N, Devis L, Rigau M, Sequeiros T, Montes M, Garcia M, Cabrera S, Gil-Moreno A, Xercavins J, Castellví J, Garcia A, Ramóm Y, Cajal S, Moreno G, Alameda F, Vásques-Levin M, Palacios J, Prat J, Doll A, Matias´Guiu X, Abal M, Reventós J. Molecular bases of endometrial cancer: New roles for new actors in the diagnosis and the therapy of the disease. *Mol Cell Endocrinol*. 2012 jul; 358(2):244-55.

Lu D, Zhou Y, Kamionek M, Lyle M, Woda BA, Hao SY, Rock KL, Jiang Z. Expression of IMP3, an oncofetal protein, in various malignant primary and metastatic neoplasms, a study of 1099 cases. *Mod Pathol*. 2009 jan; 89(22):340A.

Mhaweche-Fauceglia P, Herrmann FR, Rai H, Tchabo N, Lele S, Izevbaye I, Odunsi K, Cheney RT. IMP3 distinguishes uterine serous carcinoma from endometrial endometrioid adenocarcinoma. *Am J Clin Pathol*. 2010 jun; 133(6):899-908.

Mhaweche-Fauceglia P, Yan L, Liu S, Pejovic T. ER+ /PR+ /TFF3+ /IMP3-immunoprofile distinguishes endometrioid from serous and clear cell carcinomas of the endometrium: a study of 401 cases. *Histopathology*. 2013 jun; 62(7):976-85.

Mueller-Pillasch F, Lacher U, Wallrapp C, Micha A, Zimmerhackl F, Hameister H, Varga G, Friess H, Buchler M, Beger HG, Vila MR, Adler G, Gress TM. Cloning of a gene highly overexpressed in cancer coding for a novel KH-domain containing protein. *Oncogene*. 1997 jun; 14(22):2729–33.

Murali R, Soslow RA, Weigelt B. Classification of endometrial cancer: more than two types. *Lancet Oncol*. 2014 jun; 15(7):268-278.

Pecorelli, S. Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, and endometrium. *Int J Gynaecol Obstet*. 2009 may; 105(2):103–104.

Salvesen HB, Haldorsen IS, Trovik J. Markers for individualised therapy in endometrial carcinoma. *Lancet Oncol*. 2012 aug; 13(8):353-61.

Santacana M, Maiques O, Valls J, Gatus S, Abó AI, López-García MA, Mota A, Reventós J, Moreno-Bueno G, Palacios J, Bartosch C, Dolcet X, Matias-Guiu X. A 9-protein biomarker molecular signature for predicting histologic type in endometrial carcinoma by immunohistochemistry. *Hum Pathol*. 2014 dec; 45(12):2394–403.

Schaeffer DF, Owen DR, Lim HJ, Buczkowski AK, Chung SW, Scudamore CH, Huntsman DG, Ng SS, Owen DA. Insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 3 (IGF2BP3) overexpression in pancreatic ductal adenocarcinoma correlates with poor survival. *BMC Cancer*. 2010 feb; 10:59.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2016. CA Cancer J CLIN. 2016 jan; 66(1):7-30.

Sorosky JI. Endometrial Cancer. Obstet Gynecol. 2012 aug; 120(2 Pt 1):383-97.

Soslow RA. High-grade endometrial carcinomas-Strategies for typing. Histopathology, v.62, n.1, p.89-110, Jan 2013.

Tonon AFS e cols. Claudina-3 e Claudina -4, potenciais marcadores de agressividade no carcinoma de endométrio Tipo I. Tese (doutorado). Botucatu – SP: Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu,2013.

Walter O, Prasad M, Lu S, Quinlan RM, Edmiston KL, Khan A. IMP3 is a novel biomarker for triple negative invasive mammary carcinoma associated with a more aggressive phenotype. Hum Pathol. 2009 nov; 40(11):1528-33.

Werner HM, Salvesen HB. Current status of molecular biomarkers in endometrial cancer. Curr Oncol Rep. 2014 sep; 16(9)403.

Zheng W, Yi X, Fadare O, Liang SX, Martel M, Schwartz PE, Jiang Z. The oncofetal protein IMP3: a novel biomarker for endometrial serous carcinoma. Am J Surg Pathol. 2008 feb; 32(2):304-15.



5. Conclusão

A leitura da imunoistoquímica pela metodologia utilizada para expressão da IMP3 em ACE, é inédita na literatura, e permite a sua reprodução em novos estudos, bem como na prática diária.

1- Os resultados demonstraram uma associação da imunoexpressão da IMP3 com fatores de pior prognóstico: metástases à distância, alto grau tumoral, estádios avançados.

2- Houve uma associação da IMP3 com tipos não endometrióides serosos, que normalmente são tumores mais agressivos, dados que confirmam a literatura e corroboram na definição de tipos histológicos em casos duvidosos.

3- Houve associação da IMP3 com a p53, que também confirma resultados da literatura, tanto para identificar casos mais agressivos e de pior prognóstico, como definir tipo histológico não endometrióide seroso.

4- Houve associação da IMP3 com o marcador KI-67, que está relacionado ao índice de proliferação celular, e casos mais agressivos.

5- Não houve associação das claudinas com a IMP3, provavelmente por estes marcadores se expressarem em tipos histológicos distintos, sendo as claudinas prevalentes em ACEE e a IMP3 em ACENE.

6- Não houve associação da expressão da IMP3 com casos benignos, destacando-se que não houve marcação em nenhum caso, achado concordante com a literatura.

7 - Concluimos que é altamente recomendável a utilização da IMP3 na definição de tipos histológicos do ACE e para decisão terapêutica, uma vez que a sua expressão também se associa a casos de pior prognóstico.

8- É necessário estabelecer uma nota de corte padrão para leitura da IMP3, permitindo a sua reprodução em novos estudos e aplicação na prática diária.



6. Bibliografia

Acog: Practice Bulletin n° 128: Diagnosis of Abnormal uterine bleeding in reproductive – Aged Human. *Obstet Gynecol.* 2012 jul; 120(1):120-97.

Alkushi A, Köbel M, Kalloger SE, Gilks CB. High-grade endometrial carcinoma: serous and grade 3 endometrioid carcinomas have different immunophenotypes and outcomes. *Int J Gynecol Pathol.* 2010 jul; 29(4):343-50.

Alvarez T, Miller E, Duska L, Oliva E. Molecular Profile of Grade 3 Endometrioid Endometrial Carcinoma: Is it a Type I or Type II Endometrial Carcinoma? *Am J Surg Pathol.* 2012 may; 36(5):753-61.

Ballester M, Dubernard G, Lécuru F, Heitz D, Mathevet P, Marret H, Querleu D, Golfier F, Leblanc E, Rouzier R, Daraï E. Detection rate and diagnostic accuracy of sentinel-node biopsy in early stage endometrial cancer: a prospective multicentre study (SENTI-ENDO). *Lancet Oncol.* 2011 may; 12(5):469–76.

Bell JL, Wächter K, Mühleck B, Pazaitis N, Köhn M, Lederer M, Hüttelmaier S. Insulin-like growth factor 2 mRNA –binding proteins (IGF2PBs): post transcriptional drivers of cancer progression?. *Cell Mol Life Sci.* 2013 aug; 70(15)2657-75.

Ben Arie A, Lavie O, Gdalevich M, Voldarsky M, Barak F, Schneider D, Levy T, Anteby E, Gerner O. Temporal pattern of recurrence of stage I endometrial cancer in relation to histological risk factors. *Eur J Surg Oncol.* 2012 feb; 38(2):166-9.

Blake P, Swart AM, Orton J, Kitchener H, Whelan T, Lukka H, Eisenhauer E, Bacon M, Tu D, Parmar MK, Amos C, Murray C, Qian W. Adjuvant external beam radiotherapy in the treatment of endometrial cancer (MRC ASTEC and NCIC CTG EN.5 randomised trials): pooled trial results, systematic review, and meta- analysis. *Lancet.* 2009 jan; 373(9658):137-46.

Bokhman JV. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol.* 1983 feb; 15(1):10–7.

Buhtoiarova TN, Brenner CA, Singh M. Endometrial Carcinoma: Role of Current and Emerging Biomarkers in Resolving Persistent Clinical Dilemmas. *Am J Clin Pathol*. 2016 jan; 145(1):8-21.

Burke WM, Orr J, Leitao M, Salom E, Gehrig P, Olawaiye AB, Boruta D, Villella J, Herzoq T, Shahin FA. Endometrial cancer: A review and current management strategies: Part I. *Gynecol Oncol*. 2014 aug; 134(2):385-92.

Burke WM, Orr J, Leitao M, Salom E, Gehrig P, Olawaiye AB, Brewer M, Boruta D, Herzoq T, Shahin FA. Endometrial cancer: A review and current management strategies: Part II. *Gynecol Oncol*. 2014 aug; 134(2):393-402.

Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med*. 2003 april; 348:1625–38.

Dedes KJ, Wetterskog D, Ashworth A, Kaye SB, Reis-Filho JS. Emerging therapeutic targets in endometrial cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2011 may; 8(5):261–71.

Dowdy SC. Improving oncologic outcomes for women with endometrial cancer: realigning our sights. *Gynecol Oncol*. 2014 may; 133(2):370-4.

Ellis PE, Ghaem-Maghami S. Molecular characteristics and risk factors in endometrial cancer: what are the treatment and preventative strategies?. *Int J Gynecol Cancer*. 2010 oct; 20(7):1207-16.

Erkanli S, Ayhan A. Fertility-sparing therapy in young women with endometrial cancer: 2010 update. *Int J Gynecol Cancer*. 2010 oct; 20(7):1170-87.

Gatius S, Matias-Guiu X. Practical issues in the diagnosis of serous carcinoma of the endometrium. *Mod Pathol*. 2016 Jan; 29 Suppl 1: S 45-58.

Gilks CB, Oliva E, Soslow RA. Poor interobserver reproducibility in the diagnosis of high-grade endometrial carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2013 jun; 37(6):874-81.

Gong Y, Woda BA, Jiang Z. Oncofetal protein IMP3, a new cancer biomarker. *Adv Anat Pathol*. 2014 May; 21(3):191-200.

Haldorsen IS, Salvesen HB. What is the best Preoperative imaging for Endometrial Cancer?. *Curr Oncol Rep*. 2015 mar; 18(4):25.

INCA-Instituto Nacional do Câncer-Ministério da Saúde. Rio de Janeiro. Disponível em:<<http://www.inca.gov/estimativa/2016>>. Acesso em :05 maio.2016.

Kandoth C, Dooling D, Fulton R, Fulton L, Kalicki-Weitzer J, McLellan MD, O'Laughlin M, Schmidt H, Wilson RK, Ye K, Ding L, Mardis ER. Integrated genomic profiling of endometrial carcinoma. *Nature*. 2013 may; 497(7447):67-73.

Kitchener H, Swart AM, Qian Q, Amos C, Parmar MK. Efficacy of systematic pelvic lymphadenectomy in endometrial cancer (MRC ASTEC trial): a randomised study. *Lancet*. 2009 jan; 373(9658):125–36.

Kong A, Johnson N, Kitchener HC, Lawrie TA. Adjuvant radiotherapy for stage I endometrial cancer: an updated Cochrane systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst*. 2012 jan; 104(21):1625-34.

Lancaster JM, Powell CB, Chen LM, Richardson DL. Society of Gynecologic Oncology statement on risk assessment for inherited gynecologic cancer predispositions. *Gynecol Oncol*. 2015 jan; 136(1):3-7.

Lavazzo C, Gkegkes ID, Vrachnis N. Early recurrence of early stage endometrioid endometrial carcinoma: possible etiologic pathways and management options. *Maturitas*. 2016 jul; 78(3):155-9.

Lederer M, Bley N, Schleifer C, Hüttelmaier S. The role of the oncofetal IGF2 mRNA-binding protein 3 (IGF2BP3) in cancer. *Semin Cancer Biol.* 2014 Dec; 29:3-12.

Li C, Zota V, Woda BA, Rock KL, Fraire AE, Jiang Z, Lu D, Xu B, Dresser K, Lutman CV, Fischer AH. Expression of a novel oncofetal mRNA-binding protein IMP3 in endometrial carcinomas: diagnostic significance and clinicopathologic correlations. *Mod Pathol.* 2007 dec; 20(12):1263-8.

Llauradó M, Ruiz A, Majem B, Ertekin T, Colás E, Pedrola N, Devis L, Rigau M, Sequeiros T, Montes M, Garcia M, Cabrera S, Gil-Moreno A, Xercavins J, Castellví J, Garcia A, Ramóm Y, Cajal S, Moreno G, Alameda F, Vásques-Levin M, Palacios J, Prat J, Doll A, Matias-Guiu X, Abal M, Reventós J. Molecular bases of endometrial cancer: New roles for new actors in the diagnosis and the therapy of the disease. *Mol Cell Endocrinol.* 2012 jul; 358(2):244-55.

Lu D, Yang X, Jiang NY, Woda BA, Liu Q, Dresser K, Mercurio AM, Rock KL, Jiang Z. IMP3 ,a new biomarker to predict progression of cervical intraepithelial neoplasia into invasive cancer. *Am J Surg Pathol.* 2011 nov; 35(11):1638-45.

Lu D, Zhou Y, Kamionek M, Lyle M, Woda BA, Hao SY, Rock KL, Jiang Z. Expression of IMP3, an oncofetal protein, in various malignant primary and metastatic neoplasms, a study of 1099 cases. *Mod Pathol.* 2009 jan; 89(22):340A.

Matias-Guiu X, Prat J. Molecular pathology of endometrial carcinoma. *Histopathology,* 2013 jan; 62(1):111-23.

McConechy MK, Ding J, Cheang MC, Wiegand KC, Senz J, Tone AA, Yang W, Prentice LM, Tse K, Zeng T, McDonald H, Schmidt AP, Mutch DG, McAlpine JN, Hirst M, Shah SP, Lee CH, Goodfellow PJ, Gilks CB, Huntsman DG. Use of mutation profiles to refine the classification of endometrial carcinomas. *J Pathol.* 2012 sep; 228(1):20-30.

Meyer LA, Bohlke K, Wright AA. Postoperative Radiation Therapy for Endometrial Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Endorsement of the American Society for Radiation Oncology Evidence-Based Guideline. *J Oncol Pract*. 2016 feb; 12(2):182-5.

Mhaweche-Fauceglia P, Herrmann FR, Rai H, Tchabo N, Lele S, Izevbaye I, Odunsi K, Cheney RT. IMP3 distinguishes uterine serous carcinoma from endometrial endometrioid adenocarcinoma. *Am J Clin Pathol*. 2010 jun; 133(6):899-908.

Mhaweche-Fauceglia P, Yan L, Liu S, Pejovic T. ER+ /PR+ /TFF3+ /IMP3-immunoprofile distinguishes endometrioid from serous and clear cell carcinomas of the endometrium: a study of 401 cases. *Histopathology*. 2013 jun; 62(7):976-85.

Murali R, Soslow RA, Weigelt B. Classification of endometrial cancer: more than two types. *Lancet Oncol*. 2014 jun; 15(7):268-278.

Myers A, Barry WT, Hirsch MS, Matulonis U, Lee L. β -Catenin mutations in recurrent FIGO IA grade I endometrioid endometrial cancers. *Gynecol Oncol*. 2014 aug; 134(2):426-7.

Pecorelli, S. Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, and endometrium. *Int J Gynaecol Obstet*. 2009 may; 105(2):103–104.

Sala P, Mototti M, Menada MV, Cannavino E, Maffeo I, Abete L, Fulcheri E, Menoni S, Venturini P, Papadia A. Intraoperative frozen section risk assessment accurately tailors the surgical staging in patients affected by early-stage endometrial cancer: the application of 2 different risk algorithms. *Int J Gynecol Cancer*. 2014 jul; 24(6):1021-6.

Salvesen HB, Haldorsen IS, Trovik J. Markers for individualised therapy in endometrial carcinoma. *Lancet Oncol*. 2012 aug; 13(8):353-61.

Santacana M, Maiques O, Valls J, Gatus S, Abó AI, López-Garcia MA, Mota A, Reventós J, Moreno-Bueno G, Palacios J, Bartosch C, Dolcet X, Matias-Guiu X. A 9-protein biomarker molecular signature for predicting histologic type in endometrial carcinoma by immunohistochemistry. *Hum Pathol*. 2014 dec; 45(12):2394–403.

Setiawan VW, Yang HP, Pike MC, McCann SE, Yu H, Xiang YB, Wolk A, Wentzensen N, Weiss NS, Webb PM, Van den Brandt PA, Van de Vijver K, Thompson PJ, Strom BL, Spurdle AB, Soslow RA, Shu XO, Schairer C, Sacerdote C, Rohan TE, Robien K, Risch HA, Ricceri F, Rebbeck TR, Rastogi R, Prescott J, Polidoro S, Park Y, Olson SH, Moysich KB, Miller AB, McCullough ML, Matsuno RK, Magliocco AM, Lurie G, Lu L, Lissowska J, Liang X, Lacey JV Jr, Kolonel LN, Henderson BE, Hankinson SE, Håkansson N, Goodman MT, Gaudet MM, Garcia-Closas M, Friedenreich CM, Freudenheim JL, Doherty J, De Vivo I, Courneya KS, Cook LS, Chen C, Cerhan JR, Cai H, Brinton LA, Bernstein L, Anderson KE, Anton-Culver H, Schouten LJ, Horn-Ross PL. Type I and II Endometrial Cancers: Have They Different Risk Factors?. *J Clin Oncol*. 2013 jul; 31(20):2607-18.

Shoji K, Oda K, Kashiwayama T, Ikeda Y, Nakagawa S, Sone K, Miyamoto Y, Hiraike H, Tanikawa M, Miyasaka A, Koso T, Matsumoto Y, Wada-Hiraike O, Kawana K, Kuramoto H, McCormick F, Aburatani H, Yano T, Kozuma S, Taketani Y. Genotype-dependent efficacy of a dual PI3K/mTOR inhibitor, NVP-BEZ235, and an mTOR inhibitor, RAD001, in endometrial carcinomas. *PLoS One*. 2012 may; 7(5):e37431.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2016. *CA Cancer J CLIN*. 2016 jan; 66(1):7-30.

Silverberg SG, Kurman RJ, Nogales F, Mutter GL, Kubik-Huch RA, Tavassoli FA. Epithelial tumours and related lesions. In: Tavassoli FA, Devilee P, eds. *World Health Organization classification of tumours: pathology and genetics—tumours of the breast and female genital organs*. Lyon: IARC Press. 2003; 217–32.

Sorosky JI. Endometrial Cancer. *Obstet Gynecol*. 2012 aug; 120(2 Pt 1):383-97.

Soslow RA. High-grade endometrial carcinomas-Strategies for typing. *Histopathology*. 2013 jan; 62(1):89-110.

Tavassoli, F. A.; Devilee, P. *Pathology and Genetics Tumours of the Breast and Female Genital Organs: WHO Classification of Tumors*. Lyon: IARC. 2003; 3:432.

Todo Y, Kato H, Kasanori M, Watari H, Takeda M, Sakuragi N. Survival effect of para-aortic lymphadenectomy in endometrial cancer (Sepal study): a retrospective cohort analysis. *Lancet*. 2010 april; 375(9721):1165-72.

Tonon AFS e cols. Claudina-3 e Claudina -4, potenciais marcadores de agressividade no carcinoma de endométrio Tipo I. Tese (doutorado). Botucatu – SP: Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu, 2013.

Von Gruenigen VE, Tian C, Frasure H, Waggoner S, Keys H, Barakat RR. Treatment effects, disease recurrence, and survival in obese women with early endometrial carcinoma: a Gynecologic Oncology Group study. *Cancer*. 2006 dec; 107(12):2786-91.

Von Gruenigen VE, Waggoner SE, Frasure HE, Kavanagh MB, Janata JW, Rose PG, Courneya KS. Lifestyle challenges in endometrial cancer survivorship. *Obstet Gynecol*. 2011 jan; 117(1):93–100.

Walker JL, Piedmonte MR, Spirtos NM, Eisenkop SM, Schlaerth JB, Mannel RS, Spiegel G, Barakat R, Pearl ML, Sharma SK. Laparoscopy compared with laparotomy for comprehensive surgical staging of uterine cancer: Gynecologic Oncology Group Study LAP2. *J Clin Oncol*. 2009 nov; 27(32):5331–6.

Werner HM, Salvesen HB. Current status of molecular biomarkers in endometrial cancer. *Curr Oncol Rep*. 2014 sep; 16(9):403.

Zheng W, Yi X, Fadare O, Liang SX, Martel M, Schwartz PE, Jiang Z. The oncofetal protein IMP3: a novel biomarker for endometrial serous carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2008 feb; 32(2):304-15.

7. Anexos

Anexo 1 – Estadiamento

Estádio I: Tumor confinado ao corpo uterino.

Ia- Tumor limitado ao endométrio ou invasão menor que a metade da espessura do miométrio (G1, G2 e G3).

Ib-Invasão igual ou maior que a metade da espessura do miométrio (G1, G2 e G3). Invasão glandular do colo deve ser considerada Estádio I.

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

Estádio III: Tumor com invasão local e/ou regional.

IIIa- Tumor invade a serosa do corpo uterino e/ou anexos (G1, G2 e G3).

IIIb-Involvimento vaginal e/ou parametrial (G1, G2 e G3).

IIIc-Metástases para linfonodos pélvicos e /ou paraaórticos (G1, G2 e G3).

IIIc1-Linfonodos pélvicos positivos

IIIc2-Linfonodos paraaórticos positivos com ou sem linfonodos pélvicos positivos.

A citologia do lavado peritoneal deve ser reportado separadamente, sem mudar o estadiamento.

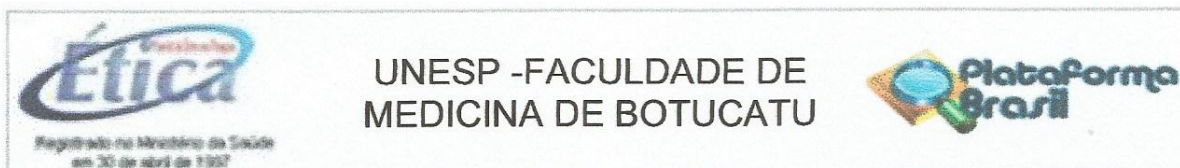
Estádio IV: O tumor invade a bexiga e/ou a mucosa do intestino, e/ou metástase à distância.

IVa- Tumor invade a bexiga e/ou mucosa intestinal (G1, G2 e G3).

IVb-Metástase à distância, incluindo metástase intra-abdominal e/ou linfonodos inguinais.

Anexo 2 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

 Registrado no Ministério da Saúde em 30 de abril de 1997	UNESP -FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU									
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP										
DADOS DA EMENDA										
Título da Pesquisa: Análise da expressão da IMP3 com as claudinas 3 e 4 na avaliação prognóstica e morfológica do câncer de endométrio.										
Pesquisador: Silas Otero Reis Salum										
Área Temática:										
Versão: 3										
CAAE: 42995315.2.0000.5411										
Instituição Proponente: Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP										
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio										
DADOS DO PARECER										
Número do Parecer: 1.578.628										
Apresentação do Projeto:										
Tratam os autos de Emenda enviada pelo pesquisador no sentido de:										
1. Retirar da Pesquisa MicroRNAS e Introduzir IMP3; com a seguinte justificativa: A pesquisa dos microRNAs não é feita em nosso centro de pesquisa e teríamos que enviar o material para outro centro em São Paulo ,sem um prazo definido para avaliação ,podendo exceder o permitido.										
2. Mudança do Título do Projeto:										
DE: "Pesquisa dos MicroRNAs relacionados à expresso das claudinas 3 e 4 no câncer do endométrio"										
PARA: Análise da expressão da IMP3 com as claudinas 3 e 4 na avaliação prognóstica e morfológica do câncer de endométrio.										
3. Foi postada nova versão de Folha de Rosto com o título da pesquisa devidamente corrigida;										
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"><tr><td style="width: 40%;">Endereço: Chácara Butignolli , s/n</td><td style="width: 20%;">CEP: 18.618-970</td></tr><tr><td>Bairro: Rubião Junior</td><td></td></tr><tr><td>UF: SP Município: BOTUCATU</td><td></td></tr><tr><td>Telefone: (14)3880-1608</td><td>E-mail: capellup@fmb.unesp.br</td></tr></table>			Endereço: Chácara Butignolli , s/n	CEP: 18.618-970	Bairro: Rubião Junior		UF: SP Município: BOTUCATU		Telefone: (14)3880-1608	E-mail: capellup@fmb.unesp.br
Endereço: Chácara Butignolli , s/n	CEP: 18.618-970									
Bairro: Rubião Junior										
UF: SP Município: BOTUCATU										
Telefone: (14)3880-1608	E-mail: capellup@fmb.unesp.br									



Continuação do Parecer: 1.578.628

4. Foi postado Projeto de Pesquisa devidamente emendado.

5. Foi solicitada a dispensa de aplicação de TCLE, pois foi esclarecido pelo pesquisador que por ocasião do início da pesquisa proposta, foi tentado aplicar o TCLE, mas infelizmente somente foi possível a localização de 03 participantes, devido a óbito, comorbidades, dificuldade de locomoção e endereço desatualizado. Enfatizando que na presente pesquisa, somente será analisado o prontuário médico e material histológico em blocos de parafina.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

- Analisar a expressão da IMP3, em casos previamente avaliados quanto a imunoexpressão das Claudinas 3 e 4, para estabelecer a correlação entre estas proteínas, com o prognóstico e subtipos histológicos;

Objetivo Secundário:

- Correlacionar a expressão da IMP3 com a morfologia dos subtipos histológicos mais agressivos;
- Correlacionar a expressão da IMP3 com casos de recorrência e mal prognóstico nos subtipos endométrioides;
- Avaliar o perfil de expressão proteica (claudina 3, 4 e IMP3) como possíveis marcadores de agressividade e pior prognóstico no câncer de endométrio.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Utilização das Lâminas de estudo anterior que podem sofrer algum tipo de avaria e dificultar estudos futuros que possam beneficiar as pacientes

Benefícios:

melhor compreensão e avaliação da doença, buscando ferramentas para melhor seguimento e tratamento.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Em relação a proposta inicial o pesquisador precisou modificar o método de análise das amostras devido a dificuldades operacionais, acreditamos que isto não comprometerá a valor científico da presente pesquisa

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

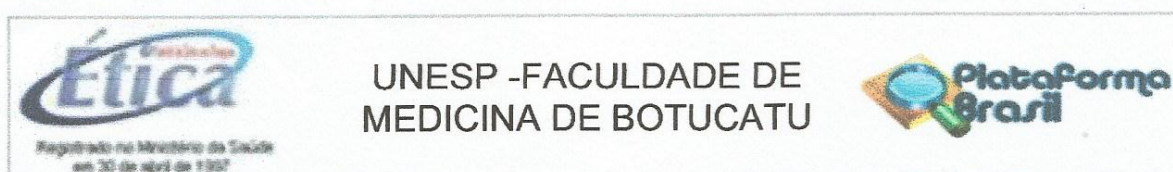
UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1608

CEP: 18.618-970

E-mail: capellup@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 1.578.628

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Diante da justificativa apresentada pelos pesquisadores somos favoráveis a Dispensa de aplicação do TCLE.

Recomendações:

Recomenda-se o envio de Relatório Final de Atividades tão logo o estudo seja concluído.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sugiro aprovação de:

1. Retirar da Pesquisa MicroRNAs e Introduzir IMP3;

2. Mudança do Título do Projeto:

DE: "Pesquisa dos MicroRNAs relacionados à expressão das claudinas 3 e 4 no câncer do endométrio"

PARA: Análise da expressão da IMP3 com as claudinas 3 e 4 na avaliação prognóstica e morfológica do câncer de endométrio.

3. Nova versão de Folha de Rosto com o título da pesquisa devidamente corrigida;

4. Projeto de Pesquisa devidamente emendado.

Considerações Finais a critério do CEP:

O CEP em reunião de 06 de junho de 2.016 APROVOU a Emenda apresentada pelos pesquisadores na seguinte conformidade:

1. Retirar da Pesquisa MicroRNAs e Introduzir IMP3; com a seguinte justificativa: A pesquisa dos microRNAs não é feita em nosso centro de pesquisa e teríamos que enviar o material para outro centro em São Paulo ,sem um prazo definido para avaliação ,podendo exceder o permitido.

2. Mudança do Título do Projeto:

Endereço: Chácara Butignolli , s/n

Bairro: Rubião Junior

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1608

CEP: 18.618-970

E-mail: capellup@fmb.unesp.br

**UNESP -FACULDADE DE
MEDICINA DE BOTUCATU**

Continuação do Parecer: 1.578.628

DE: "Pesquisa dos MicroRNAs relacionados à expressão das claudinas 3 e 4 no câncer do endométrio"

PARA: Análise da expressão da IMP3 com as claudinas 3 e 4 na avaliação prognóstica e morfológica do câncer de endométrio.

3. Foi postada nova versão de Folha de Rosto com o título da pesquisa devidamente corrigido;

4. Foi postado Projeto de Pesquisa devidamente emendado.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_662905 E1.pdf	16/05/2016 10:19:58		Aceito
Outros	OficioExplicativoEmenda.docx	16/05/2016 10:18:04	Silas Otero Reis Salum	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_emendado.pdf	16/05/2016 10:13:37	Silas Otero Reis Salum	Aceito
Folha de Rosto	folhadeRosto.pdf	16/05/2016 10:12:30	Silas Otero Reis Salum	Aceito
Outros	declaração HCFMB.pdf	17/03/2015 13:22:24		Aceito
Outros	Autorização para realização de pesquisa 2.pdf	16/03/2015 17:26:57		Aceito
Outros	Autorização para realização de pesquisa 1.pdf	16/03/2015 17:26:27		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Chácara Butignolli, s/n**Bairro:** Rubião Junior**CEP:** 18.618-970**UF:** SP**Município:** BOTUCATU**Telefone:** (14)3880-1608**E-mail:** capellup@fmb.unesp.br