

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

Guacyra Magalhães Pires

PERFIL IMUNOISTOQUÍMICO DO CÂNCER DE COLO
UTERINO

RECIFE
2012

Guacyra Magalhães Pires

**PERFIL IMUNOISTOQUÍMICO DO CÂNCER DE COLO
UTERINO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Mestre em Patologia.

Orientador: Prof^o Dr. Adelmar Afonso de Amorim Júnior

**RECIFE
2012**

Catálogo na fonte
Bibliotecária Giseani Bezerra, CRB4-1738

P667p Pires, Guacyra Magalhães.
 Perfil imunoistoquímico do câncer de colo uterino / Guacyra
 Magalhães Pires. – Recife: O autor, 2012.
 99 folhas : il. ; 30 cm.

 Orientador: Ademar Afonso de Amorim Juúnior.
 Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco,
 CCS. Programa de Pós-Graduação em Patologia, 2012.
 Inclui bibliografia, apêndices e anexos.

 1. Endotélio vascular. 2. Fatores de crescimento endotelial. 3. Fator
 de crescimento epidérmico. 4. Angiogênese. I. Amorim Júnior, Ademar
 Afonso de (Orientador). II. Título.

616.07 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2012-122)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

R E I T O R

Prof. Amaro Henrique Pessoa Lins

VICE- REITOR

Prof. Gilson Edmar Gonçalves e Silva

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

D I R E T O R DO CENTRO DE CIÊNCIA DA SAÚDE

Prof. José Thadeu Pinheiro

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA

Prof. Adriana Maria da Silva Telles

COORDENADOR DO MESTRADO EM PATOLOGIA

Prof. Mário Ribeiro de Melo Júnior

VICE-COORDENADOR DO MESTRADO EM PATOLOGIA

Profa. Manuela Figueiroa Lyra de Freitas

R E C I F E

2012



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

Centro de Ciências da Saúde - UFPE

Av. Prof. Moraes Rego 1235 - Cidade Universitária - CEP: 50670-901 - Recife – PE

Prédio da Pós-graduação do Centro de Ciências da Saúde (CCS) - térreo

DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM PATOLOGIA.

AUTORA: GUACYRA MAGALHÃES PIRES

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PATOLOGIA

**NOME DA DISSERTAÇÃO: “PERFIL IMUNOISTOQUÍMICO DO CÂNCER DE COLO
UTERINO”**

ORIENTADOR: PROF. DR. ADELMAR AFONSO DE AMORIM JÚNIOR.

DATA DA DEFESA: 28 DE FEVEREIRO DE 2012.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Hilton Justino da Silva

Profa. Dra. Wylla Tatiana Ferreira e Silva

Prof. Dr. Rivaldo Mendes de Albuquerque

*A meus pais,
Djalma e Fátima, pelo incentivo constante.*

*A meu marido, Gustavo,
e meus filhos, Gustavinho e Giovana,
pela compreensão e força
em todos os momentos dessa trajetória.*

AGRADECIMENTOS

À minha família pelo constante incentivo ao crescimento intelectual.

A Gustavo, meu marido, pelo incentivo, apoio, companheirismo, compreensão e carinho.

A meu orientador, Prof. Dr. Ademar Afonso, pela confiança no desenvolvimento de minha dissertação de mestrado.

A Prof. Dr. Hilton Justino, pela paciência, incentivo, confiança e estímulo.

A minha cunhada, Lúcia Duarte e minha sogra, Socorro Bezerra, pelo incentivo e amizade, por ajudarem ficando com meu filho, Gustavo, quando o estudo era necessário, para que esse sonho se realizasse.

A meus colegas da turma de mestrado, em especial, Julliana, Darley, Ada, Andrea, Paulo pelo companheirismo e experiências acadêmicas compartilhadas.

Aos funcionários e estagiários do mestrado em Patologia da UFPE, em especial, Tatiane, pela dedicação e apoio.

Aos patologistas, Romualdo Lins e Gustavo Barbosa, pela dedicação, apoio, confiança, disponibilidade e incentivo.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse trabalho.

RESUMO

Introdução: O câncer de colo uterino é um importante problema de saúde pública mundial, terceira causa de morte por câncer em mulheres. Os receptores de membrana com atividade intrínseca de tirosina quinase controlam funções celulares como proliferação e diferenciação celular através da ativação de vias intracelulares de transdução de sinal, relacionando-se com a angiogênese que desempenha papel crucial no crescimento tumoral e promoção de metástases. **Objetivos:** Identificar características histopatológicas de amostras de câncer de colo uterino; verificar a expressão e o grau de expressão dos marcadores imunoistoquímicos VEGF (fator de crescimento vascular endotelial), PDGFR- β (receptor β do fator de crescimento derivado de plaquetas), EGFR (receptor do fator de crescimento epidérmico); descrever associação entre características histopatológicas e perfil imunoistoquímico. **Métodos:** Estudo transversal, retrospectivo. Coleta de dados no Laboratório Romualdo Lins, Caruaru, Pernambuco, entre setembro de 2010 e junho de 2011. 31 blocos de parafina de espécimes exclusivos de carcinomas de colo uterino obtidos unicamente por histerectomia. Excluídos: espécimes obtidos por biópsia ou conização; os cedidos para revisão em outro laboratório e não devolvidos; insuficiência de material ou presença de desgaste comprometendo realização de revisão histológica e imunoistoquímica. Dados organizados em planilha *Excel*[®] e analisados com programa SPSS[®], versão 17.0. Realizadas revisões histopatológicas e reações imunoistoquímicas para os marcadores VEGF, PDGFR- β e EGFR. Para análise dos dados, utilizamos teste Qui-quadrado, teste exato de Fisher, teste t de Student ou teste de Mann-Whitney, considerando nível de significância de 0,05 para rejeição da hipótese nula, conforme distribuição de frequência obedecesse às Regras de Cochran. **Resultados:** A média de idade foi 46,74 anos. 6 (19,35%) tumores microinvasivos (margens livres e ausência de comprometimento linfovascular em 100% dos espécimes) e 25 (80,65%) tumores invasivos. Tumores invasivos predominaram como pouco diferenciados. Os tumores mais frequentemente foram negativos para PDGFR- β e positivos para VEGF. Em relação ao grau de positividade, predominaram tumores com expressão mínima do PDGFR- β , decrescendo as expressões moderada e forte, diferindo dos outros dois marcadores. Para VEGF, os tumores mais frequentemente tiveram expressão moderada; para EGFR, expressão forte. Todas essas diferenças alcançaram significância estatística. Para EGFR, houve diferença significativa ($p=0,010$) entre expressão mínima e expressões moderada/forte, predominando menor expressão nos tumores microinvasivos e forte expressão nos tumores invasivos. Para PDGFR- β , identificou-se diferença significativa ($p=0,043$) na positividade, dado que tumores invasivos mais frequentemente expressavam positividade deste marcador. Tumores triplo positivo são significantemente mais frequentes em presença de invasão linfovascular e têm grau pouco diferenciado quando comparados aos tumores positivos apenas para EGFR e PDGFR- β . **Conclusão:** A positividade dos marcadores imunoistoquímicos, especialmente no grupo triplo positivo, sugere que há correlação com fatores de pior prognóstico. Demonstrada correlação entre o grau de expressão do EGFR e os tumores invasivos, bem como a positividade do PDGFR- β e os tumores invasivos. Os dados encontrados sugerem suporte para futuros estudos com uso de drogas alvo moleculares, com possibilidade de alterar o prognóstico das pacientes portadoras de câncer de colo uterino ou ajudar a separar as pacientes com tumores com pior prognóstico, que necessitem de uma abordagem terapêutica mais agressiva.

Descritores: fator de crescimento vascular endotelial; receptor do fator de crescimento epidérmico; receptor beta do fator de crescimento derivado de plaquetas; angiogênese; câncer de colo uterino; imunoistoquímica.

ABSTRACT

Introduction: The cervical cancer is a major public health problem worldwide, the third cause of cancer death in women. The membrane receptors with intrinsic tyrosine kinase activity control cellular functions such as cell proliferation and differentiation through activation of intracellular signal transduction, correlating with angiogenesis that plays a crucial role in promoting tumor growth and metastasis. **Objectives:** To identify histopathological characteristics of samples of cervical cancer; verify the expression and the degree of expression of immunohistochemical markers VEGF (vascular endothelial growth factor), PDGFR- β (β platelet-derived growth factor receptor), EGFR (epidermal growth factor receptor) to describe the association between histological and immunohistochemical profile. **Methods:** Cross sectional, retrospective study. Data collection in the Laboratory Romualdo Lins, Caruaru, Pernambuco, between September 2010 and June 2011. 31 paraffin blocks of specimens exclusive of carcinoma of the cervix obtained only by hysterectomy. Deleted: specimens obtained by biopsy or conization; the assigned for review in another laboratory and not returned; lack of material or the presence of wear affecting performance of histology and immunohistochemistry. Data organized in Excel[®] spreadsheet and analyzed using SPSS[®] version 17.0. Reviews performed histopathological and immunohistochemical reactions for markers VEGF, EGFR and PDGFR- β . For data analysis, we used chi-square test, Fisher's exact test, Student's t test or Mann-Whitney test, considering a significance level of 0.05 for rejecting the null hypothesis, as frequency distribution obeyed the rules Cochran. **Results:** Mean age was 46.74 years. 6 (19.35%) microinvasive tumors (tumor-free margins and no lymphovascular involvement in 100% of specimens) and 25 (80.65%) invasive tumors. Invasive tumors predominated as poorly differentiated. Tumors were more often negative for PDGFR- β and positive for VEGF. Concerning the degree of positivity, prevalent tumors with minimal expression of PDGFR- β , decreasing moderate and strong expressions, differing from the other two markers. For VEGF, the tumors most often had moderate expression, EGFR, strong expression. All these differences reached statistical significance. For EGFR, significant difference ($p = 0.010$) between expression and minimal expressions moderate / strong, predominantly lower expression in in microinvasive tumors and strong expression in invasive tumors. In PDGFR- β , identified a significant difference ($p = 0.043$) in the order to PDGFR- β positive, given that more often invasive tumors expressed positivity of this marker. Triple positive tumors are significantly more frequent in the presence of lymphovascular invasion and have poorly differentiated tumors degree compared to only positive for EGFR and PDGFR- β . **Conclusion:** The positivity of immunohistochemical markers, especially in triple-positive group, suggests that there are factors correlated with poor prognosis. Demonstrated a correlation between the degree of EGFR expression and invasive tumors, as well as positive PDGFR- β and invasive tumors. The results suggest support for future studies with molecular targeted drugs, with the possibility to change the prognosis of patients with cervical cancer or help to separate the patients with tumors with poor prognosis, requiring a more aggressive therapeutic approach.

Keywords: vascular endothelial growth factor, epidermal growth factor receptor, beta growth factor derived from platelets receptor, angiogenesis, cancer of the cervix; immunohistochemistry.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1 – Cascata de reações desencadeadas pela ativação do EGFR 27

Figura 2 – Diagrama da cascata de síntese e liberação de sinais intercelulares do processo de angiogênese promovido pelo VEGFR 32

MÉTODO

Figura 3 – Representação dos resultados das expressões das reações imunoistoquímicas, mostrando casos sem expressão (A), expressão fraca (B), expressão moderada (C) e forte expressão (D) (× 200). 51

RESULTADOS

Figura 1 – Distribuição de 31 espécimes segundo reações imunoistoquímicas e características epidemiológicas e histológicas tumorais – Caruaru, 2010/2011 62

LISTA DE TABELAS E QUADROS

REVISÃO DA LITERATURA

Quadro 1 – Classificação morfológica de tumores de colo de útero pelo sistema TNM	35
Quadro 2 – Classificação TNM do câncer de colo uterino	36
Tabela 1 - Estudos que analisaram a correlação da expressão e do grau de expressão do VEGF (<i>vascular endothelial growth factor</i>) com prognóstico no câncer de colo uterino.	41

MÉTODO

Quadro 3 – Categorização das variáveis de estudo	47
Quadro 4 – Técnica de recuperação antigênica e reação imunoistoquímica para os marcadores EGFR, VEGF e PDGFR- β	50

RESULTADOS

Quadro 1 – Categorização das variáveis de estudo	57
Quadro 2 – Técnica de recuperação antigênica e reação imunoistoquímica para os marcadores EGFR, VEGF e PDGFR- β	58
Tabela 1 – Comparação entre as características dos tumores microinvasivos e invasivos em relação às variáveis idade, grau histológico, margens cirúrgicas e invasão linfovascular – Caruaru, 2010-2011	59
Tabela 2 – Distribuição dos graus de expressão de reação imunoistoquímica de 31 espécimes para os marcadores – Caruaru, 2010-2011	60
Tabela 3 – Distribuição dos graus de expressão da reação imunoistoquímica para os marcadores entre os tumores microinvasivos e invasivos de câncer de colo uterino entre 31 espécimes – Caruaru, 2010-2011	61
Tabela 4 – Distribuição das características tumorais segundo positividade dos marcadores biológicos (EGFR, VEGF, PDGFR- β) – Caruaru, 2010-2011	63

LISTA DE GRÁFICOS

RESULTADOS

Gráfico 1 – Distribuição dos resultados das reações imunoistoquímicas de 31 espécimes para os marcadores PDGFR- β , VEGF e EGFR – Caruaru, 2010-2011

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	Ácido Dextrorribonucleico
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
EGFR	Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay</i>
ERK	<i>Extracellular-Signal-Regulated-Kinases</i>
FISH	<i>Fluorescent in Situ Hybridization</i>
GDP	Guanina-Difosfato
GIST	<i>Gastrointestinal Stromal Tumor</i>
GRB2	<i>Growth Factor Receptor-Bound Protein 2</i>
GTP	Guanina-Trifosfato
HE	Hematoxilina-Eosina
HER-2/neu	Fator de Crescimento Epidérmico Humano-2
HPV	Papilomavírus Humano
MAP	<i>Mitogen Activated Protein</i>
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
PDGFR- β	Receptor beta do Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
RAF	<i>Proto-Oncogen Serine/Threonine-Protein Kinase</i>
RAS	Proteínas <i>Rat Sarcoma Virus</i>
SOS	<i>Son of Sevenless</i>
SSCP	<i>Single-Strand Conformational Polyorphism</i>
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
TGF- α	<i>Transforming Growth Factor-Alpha</i>
TNM	Classificação de Tumores Malignos
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
VEGFR	Receptor do Fator de Crescimento Endotelial Vascular

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO.....	14
1.1 Apresentação.....	15
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1 Epidemiologia.....	19
2.2 História natural do câncer de colo uterino.....	20
2.3 Mecanismos da carcinogênese: transdução de sinal celular.....	21
2.4 Angiogênese.....	23
2.5 Receptores de membrana com atividade intrínseca tirosina quinase...	25
2.5.1 Receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR)	25
2.5.2 Receptor do fator de crescimento epidérmico humano-2 (HER-2/neu)	28
2.5.3 Receptor do fator de crescimento vascular endotelial (VEGFR).....	30
2.5.4 Receptor do fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGFR)..	32
2.6 Estadiamento	34
2.7 Artigo de revisão.....	37
3 MÉTODO.....	45
3.1 Área de estudo.....	46
3.2 Período de referência	46
3.3 Desenho do estudo	46
3.4 Critérios de seleção da amostra	46
3.4.1 Critérios de inclusão.....	46
3.4.2 Critérios de exclusão.....	47
3.5 Definição das variáveis	47
3.6 Método de coleta de dados	48
3.6.1 Silanização das lâminas	48
3.6.2 Preparação e marcação dos cortes histológicos	49
3.6.3 Interpretação da imunoistoquímica	51
3.7 Método de análise de dados	52
3.8 Considerações éticas.....	52
4 RESULTADOS.....	53
4.1 Artigo Original 1.....	54

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	68
5.1 Considerações finais.....	69
REFERÊNCIAS.....	71
APÊNDICES.....	80
APÊNDICE A - Formulário de coleta de dados.....	81
ANEXOS.....	82
ANEXO A – Carta de anuência do orientador.....	83
ANEXO B – Carta de solicitação ao laboratório.....	84
ANEXO C – Carta de anuência do laboratório declaração.....	85
ANEXO D – Normas e instruções aos autores da Revista Paraense de Medicina.....	86
ANEXO E – Normas e instruções aos autores do Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial.....	90
ANEXO F – Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE	99

1.1 Apresentação

O câncer de colo uterino representa doença de grande importância devido a sua alta incidência e mortalidade nos países em desenvolvimento. Vários fatores prognósticos clínicos e anatomopatológicos vêm sendo estudados e correlacionados com a sobrevida das pacientes portadoras de carcinoma do colo uterino (NOVIK, 2003).

Entre as técnicas de biologia molecular empregadas no dia-a-dia do diagnóstico do câncer estão a imunoistoquímica (HELLBERG; TOT; STENDAHL, 2009) e a técnica de FISH (*Fluorescent In Situ Hybridization*). A imunoistoquímica é baseada no reconhecimento de proteínas específicas (anticorpos de antígeno tecido), presentes no tecido tumoral, por meio do uso de anticorpos monoclonais contra essas proteínas. Isso permite, por exemplo, a detecção da expressão tecidual de receptores e enzimas de interesse em espécimes tumorais (SAAD, 2010b).

A imunoistoquímica foi desenvolvida inicialmente por Coons, em 1940, como técnica de imunofluorescência de investigação para detecção de antígenos em cortes de tecido congelado (COONS; CREECH; JONES, 1941). Os avanços técnicos ao longo das últimas três décadas associados ao desenvolvimento de técnicas para a fabricação de anticorpos monoclonais altamente específicos expandiram muito o arsenal de testes que pode atingir praticamente qualquer marcador imunogênico (TAYLOR et al., 2002), daí a imunoistoquímica estar na vanguarda diagnóstica (CHAN, 2000).

A detecção imunoistoquímica de marcadores tumorais tem se tornado método amplamente utilizado em pesquisas e na rotina. Numerosos estudos têm sido realizados para avaliar a significância diagnóstica, prognóstica e terapêutica destas proteínas celulares (LIU et al., 2007; HELLBERG; TOT; STENDAHL, 2009).

Com a adaptação da técnica de tecidos fixados em solução de formol 10% e embebidos em parafina, a imunoistoquímica agora é compatível com os procedimentos padrão para processamento de tecidos e pode até mesmo ser realizada *a posteriori* sobre blocos de tecido arquivados por muitos anos, sendo usada rotineiramente para tratar importantes questões de diagnóstico (WICK; RITTER; SWANSON, 1999).

O exame clínico associado à análise histológica dos tumores de colo uterino, e em alguns casos, a exames de imagem, tem sido determinantes para a indicação correta do tratamento. Atualmente, o tratamento envolve, sumariamente, cirurgia, quimioterapia

associada à radioterapia, seguida ou não por cirurgia ou quimioterapia isolada, não havendo ainda subsídios científicos que indiquem o uso de drogas alvo molecular.

O padrão atual de tratamento do câncer de colo uterino não cura, pelo menos, 15% dos casos de tumores volumosos no estadio IB e 45% das pacientes no estadio IIIB. Além disso, o tratamento multimodal integrando quimioterapia, cirurgia e radioterapia mesmo quando adequado, é pouco provável aumentar substancialmente a taxa de cura (McCLUGGAGE, 2007).

Nos últimos anos tem havido rápida expansão da literatura para investigar o valor da imunoistoquímica como auxílio diagnóstico em patologia ginecológica em geral. No entanto, no campo da patologia cervical, ainda há um número reduzido de estudos (KURAMOTO et al., 2008).

O desenvolvimento da identificação de marcadores biológicos por imunoistoquímica tem permitido a incorporação crescente de drogas de alvo molecular (MAURO et al., 2002) ao arsenal terapêutico contra tumores sólidos e neoplasias hematológicas, o que se constitui em mudança de paradigma em oncologia clínica (SAAD, 2010a).

Terapias moleculares específicas estão sendo testadas atualmente em uma variedade de tipos de tumor, com resultados promissores (CHAVEZ-BLANCO et al., 2004).

O estudo de marcadores moleculares no carcinoma invasor do colo uterino é promissor, mas, até o momento, não apresenta aplicação na prática clínica (SILVA-FILHO, 2009). Devido a isso, o passo lógico a seguir é o desenvolvimento de estudos que investiguem mais profundamente a expressão de marcadores biológicos para dar lugar aos testes de terapias alvo molecular tentando melhorar o prognóstico de pacientes com câncer do colo do útero (CHAVEZ-BLANCO et al., 2004).

Este trabalho teve como objetivo geral correlacionar as características histopatológicas e imunoistoquímicas nas amostras de pacientes com câncer de colo uterino. Os objetivos específicos deste estudo foram: identificar as características histopatológicas de amostras de pacientes com câncer de colo uterino (tipo histológico, tamanho do tumor, grau histológico, margens cirúrgicas, presença de invasão linfovascular ou angiolinfática, mensuração da invasão estromal, mensuração da extensão da invasão e análise linfonodal); verificar a expressão e o grau de expressão dos marcadores imunoistoquímicos VEGF, PDGFR- β , EGFR nas amostras de pacientes com câncer de colo uterino; investigar a associação entre as características histopatológicas e o perfil imunoistoquímico de amostras de pacientes com câncer de colo uterino.

O estudo foi do tipo transversal, retrospectivo. Um grupo com câncer de colo uterino microinvasivo (tumores com profundidade da invasão estromal menor ou igual a 5 mm ou extensão horizontal menor ou igual a 7 mm) e outro invasivo (tumores com profundidade da invasão estromal maior que 5 mm ou extensão horizontal maior que 7 mm), submetidos à análise imunoistoquímica para os marcadores biológicos VEGF, EGFR, PDGFR- β , atendidos em laboratório de referência em imunoistoquímica na cidade de Caruaru/PE.

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE e registrado sob CAAE número 3353.0.000.172-10 (ANEXO F), sendo iniciada após a referida aprovação e teve como orientador o Professor Dr. Ademar Afonso de Amorim Júnior.

O desenvolvimento dessa dissertação resultou na elaboração de dois artigos. O primeiro intitulado **“Expressão do receptor do fator de crescimento vascular endotelial no câncer de colo uterino: uma revisão sistemática”**, enviado para publicação na qualidade de artigo de revisão para a Revista Paraense de Medicina, estrato B4 na área de MEDICINA II. Teve como principal objetivo rever de forma sistemática a expressão do receptor do fator de crescimento vascular endotelial e sua correlação com o prognóstico em pacientes com câncer de colo uterino através de uma revisão sistemática em base de dados eletrônica.

O segundo artigo, **“Expressão do fator de crescimento vascular endotelial, receptor beta do fator de crescimento derivado de plaquetas e receptor do fator de crescimento epidérmico no câncer de colo uterino”**, será submetido na qualidade de artigo original para apreciação do Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, estrato B4 na área de MEDICINA II. Teve como objetivo avaliar a correlação entre as características histológicas e a expressão dos marcadores biológicos fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e receptor beta do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR- β).

Os artigos foram elaborados de acordo com as normas para publicação específica de cada revista (ANEXOS D e E) e, posteriormente, enviados para submissão via e-mail ou via correios a depender dos critérios de cada periódico.

2.1 Epidemiologia

O câncer de colo uterino é a segunda ou terceira causa mais comum de câncer entre mulheres no mundo (BRAY et al, 2005; MARTINS; THULER; VALENTE, 2005; PARKIN et al, 2005; KAMANGAR; DORES; ANDERSON, 2006; PEREZ et al, 2006; CHOI et al, 2008; SILVA-FILHO, 2009). Há aproximadamente 500 mil casos novos por ano, no mundo, e aproximadamente 230 mil óbitos dessas mulheres por ano (BRITO; VIANA; PEREIRA, 2007; BRASIL, 2009; MINAGUCHI; YOSHIKAWA, 2010).

Há estimativa de diagnóstico de 12.710 novos casos de câncer de colo uterino, nos Estados Unidos, em 2011, com 4.294 mortes decorrentes dessa doença (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2011). Apesar do declínio substancial na incidência e mortalidade do câncer de colo uterino em países desenvolvidos resultante do *screening* efetivo (MA et al., 2004; MARTINS; THULER; VALENTE, 2005), a incidência entre mulheres hispânicas e latinas continua alta (SHERMAN et al., 2005; HOWE et al., 2006).

Aproximadamente 78% a 80% dos casos ocorrem em países em desenvolvimento (BRITO; VIANA; PEREIRA, 2007; MACHADO et al., 2005), onde o câncer de colo uterino é a segunda causa mais frequente de morte entre mulheres (MARTINS; THULER; VALENTE, 2005; PÉREZ et al., 2006; CHOI et al., 2008; MINAGUCHI; YOSHIKAWA, 2010), especialmente em idade reprodutiva (CHAVEZ-BLANCO et al, 2004; GOLIJOW et al., 2005; PÉREZ et al., 2006; BRASIL, 2009).

Para o Brasil, no ano de 2012, esperam-se 17.540 casos novos de câncer do colo do útero, sendo considerado um importante problema de saúde pública no mundo, com risco estimado de 17 casos a cada 100 mil mulheres (BRASIL, 2011).

A incidência de câncer do colo do útero evidencia-se na faixa etária de 20 a 29 anos e o risco aumenta rapidamente até atingir seu pico, geralmente na faixa etária de 45 a 49 anos (MENDONÇA et al., 2008). Ao mesmo tempo, com exceção do câncer de pele, é esse câncer que apresenta o maior potencial de prevenção e cura quando diagnosticado precocemente (MA et al., 2004; MARTINS; THULER; VALENTE, 2005; BRASIL, 2009).

A média mundial de sobrevida em cinco anos é estimada em 49% (BRASIL, 2009). Em países desenvolvidos, a sobrevida média estimada em cinco anos varia de 51% a 66% contrapondo-se ao que ocorre nos países em desenvolvimento, onde os casos são

diagnosticados em estadios relativamente avançados. Consequentemente a sobrevida média é menor, igualando-se a 41% após cinco anos (CHOI et al., 2008).

2.2 História natural do câncer de colo uterino

O câncer do colo do útero, também denominado cervical, demora muitos anos para se desenvolver. É considerado de bom prognóstico, se diagnosticado e tratado precocemente (MENDONÇA et al., 2008; THULER; MENDONÇA, 2005; THULER, 2008). No entanto os resultados do tratamento da doença localmente avançada são insatisfatórios (CHAVEZ-BLANCO et al., 2004), além de implicarem em maior taxa de recorrência da doença e menor sobrevida, quando comparado com aqueles diagnosticados e tratados em estadios iniciais (VIEIRA et al., 2009). Daí decorre que o estadiamento representa o fator prognóstico mais importante no carcinoma invasor do colo uterino, refletindo sua disseminação local e à distância (DENNY et al., 2006; QUINN et al., 2006; THULER, 2008).

Embora o tipo histológico não defina o planejamento terapêutico, isoladamente (DENNY et al., 2006), a identificação das alterações celulares que podem desencadear o câncer permitem diagnóstico precoce, além de tratamento adequado e menos invasivo. Essas células são descobertas facilmente no exame preventivo do câncer de colo uterino (conhecido também como teste de Papanicolaou), cuja realização deve ser periódica, buscando alterações na junção escamo colunar, tanto do epitélio escamoso como do epitélio colunar, principais sítios de sua origem (MA et al., 2004; MARTINS; THULER; VALENTE, 2005; SALCEDO; SILVEIRA; ZETLER, 2008; THULER, 2008).

São reconhecidas três principais categorias de carcinomas invasores da cérvix: carcinoma de células escamosas ou epidermóide (representando cerca de 80% dos casos), adenocarcinoma (respondendo por 10% dos casos) (JHINGRAN et al., 2008; BRASIL, 2009) e carcinoma adenoescamoso (JHINGRAN et al., 2008). Essa classificação é importante dado que os tumores não epidermóides, ou seja, originados do epitélio glandular da endocérnix, apresentam pior prognóstico em comparação ao carcinoma de células escamosas (SINGH, ARIF, 2004; QUINN et al., 2006).

Dentre os agentes causais do câncer cervical, a infecção pelo papilomavírus humano, o HPV, está comprovadamente relacionada a tumores malignos, especialmente em presença de subtipos de alto risco (BOSCH et al., 2002; zur HAUSEN, 2002; KRUSE et al., 2004; GOLIJOW et al., 2005; THULER; VALENTE, 2005; APPLEBY et al., 2006; ELEUTÉRIO-JÚNIOR; GIRALDO; GONÇALVES, 2006; PÉREZ et al., 2006; ZEFERINO; DERCHAIN, 2006; BRITO; VIANA; PEREIRA, 2007; BRASIL, 2009; HANDISURYA; SCHELLENBACHER; KIRNBAUER, 2009; ROSA et al., 2009; MINAGUCHI, YOSHIKAWA, 2010). Assim carcinogênese cervical é um processo multifatorial e envolve fatores genéticos, ambientais, hormonais e fatores imunológicos, além de HPV (JAYSHREE et al., 2009).

2.3 Mecanismos da carcinogênese: transdução de sinal celular

No ciclo celular, ocorrem mudanças na sequência normal da molécula do ácido desoxirribonucleico (DNA), ao longo do tempo, causadas por erros de replicação do DNA ou por mutações hereditárias, resultando em translocações, perdas ou ampliações de genes, proto-oncogenes e genes supressores de tumor, que podem alterar as funções e as propriedades de crescimento celular (TELLES, 1999; KRUSE et al., 2004; NOGUEIRA et al., 2006; SJÖBLOM et al., 2006).

Para realização dos processos básicos da transcrição e replicação do DNA, necessária à sobrevivência celular e também à manutenção da estabilidade genômica, evitando o desenvolvimento de neoplasias malignas, a célula promove reparação do DNA e morte celular programada, denominada apoptose (LOEB; LOEB; ANDERSON, 2003). A apoptose permite eliminação espontânea das células anormais ou malignas, quando a reparação do DNA não ocorre de forma eficiente (ZHIVOTOVSKY; ORRENIUS, 2006).

Daí, decorre definir-se o câncer como o crescimento tecidual resultante do desequilíbrio entre proliferação celular e apoptose, a qual impediria a progressão tumoral (ZHIVOTOVSKY; ORRENIUS, 2006), bem como admitir que ele é doença genética causada pelo acúmulo de alterações na sequência normal do DNA. O desequilíbrio entre proliferação celular e apoptose é secundário a uma série de alterações genéticas ou epigenéticas, a maioria delas de natureza somática (adquirida) (MINAGUCHI; YOSHIKAWA, 2010),

embora a suscetibilidade ao câncer possa também ser afetada por fatores ambientais e pela ação de genes modificadores múltiplos de baixa penetrância (LOEB; LOEB; ANDERSON, 2003).

Pelo fato das alterações na sequência normal do DNA, em quase todos os cânceres, serem originárias de uma única célula progenitora, em vez de um grupo de células, admite-se que o câncer tem origem clonal. No entanto, é relevante ressaltar que essas explicações são didáticas, porque, para os cânceres mais comuns, múltiplos eventos genéticos ocorrem em muitos genes diferentes durante o processo de carcinogênese (KRUSE et al., 2004; NOGUEIRA et al., 2006; SJÖBLOM et al., 2006). Um exemplo dessa afirmação é o fato da tetraploidia e da instabilidade cromossômica serem implicadas como eventos precoces na carcinogênese cervical (OLAHASKI et al., 2006).

As alterações na molécula de DNA não comprometem apenas o ciclo celular, mas promovem também modificações na comunicação das células e, portanto, na homeostase celular.

A comunicação entre duas ou mais células é mediada por moléculas que atuam em células-alvo, localizadas à distância (comunicação endócrina) ou na sua vizinhança (comunicação parácrina), podendo, em alguns casos, a mesma célula ser a emissora e a receptora do sinal bioquímico (comunicação autócrina). Além dos processos extracelulares de comunicação, inúmeros processos intracelulares, coletivamente denominados “transdução de sinal” ou “vias de sinalização”, são desencadeados pela interação entre moléculas mensageiras (ligantes) e receptores específicos, localizados na célula-alvo (SAAD, 2010b).

Pelo exposto, decorre ampliar o conceito de câncer para uma doença genética, de origem focal, derivada de alterações moleculares no DNA, que promovem modificação do ciclo proliferativo e da transdução de sinal, da reparação do dano ao DNA e das relações entre a célula neoplásica e as células vizinhas ou a matriz extracelular, associadas ao desequilíbrio entre proliferação celular e apoptose (RAK et al., 2002).

Para atender aos objetivos desta pesquisa, cabe detalhar a carcinogênese no que se refere à transdução de sinal celular. Diversos processos de transdução de sinal são caracterizados pela adição de fosfato a substratos proteicos ou lipídicos, sendo essa reação catalisada por enzimas denominadas quinases. As quinases que fosforilam proteínas em resíduos específicos do aminoácido tirosina são denominadas tirosina quinases. Os receptores de membrana com atividade intrínseca de tirosina quinase controlam funções celulares de

especial interesse para a oncologia, como proliferação e diferenciação celular (GSCHWIND; FISCHER; ULLRICH, 2004).

Existem atualmente mais de 60 receptores de tirosina quinase, agrupados em 20 famílias, das quais as mais importantes são as famílias do receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR), do receptor do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR), do receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR) e do receptor para o fator de célula tronco (*stem cell factor* - c-Kit), os quais exercem funções distintas, mas partir de um mecanismo comum (SAAD, 2010a; SAAD, 2010b).

O mecanismo genérico de funcionamento dos receptores de membrana envolve a interação entre a porção extracelular do receptor e seu respectivo ligante; a dimerização do receptor com mudanças na sua conformação estrutural; autofosforilação em resíduos de tirosina localizados na porção intracelular do receptor e, conseqüentemente, a ativação de vias intracelulares de transdução de sinal (GSCHWIND; FISCHER; ULLRICH, 2004).

A síntese dos receptores de tirosina quinase é mantida extremamente controlada em células normais. No entanto, nas células tumorais, essa síntese está aumentada, ou seja, o processo neoplásico acompanha-se de aumento da expressão gênica ou proteica desses receptores com atividade intrínseca de tirosina quinase, os quais passam a ser classificados como oncogenes, ou seja, como moléculas com capacidade de promover a mutação de células normais a células neoplásicas, com maior capacidade de resistência à hipóxia e ao estresse oxidativo, portanto resistentes à apoptose (RAK et al., 2002; LEVITZKI, 2002).

Outro aspecto importante dos receptores tirosina quinase é sua relação com o crescimento tumoral. Na medida em que as células tumorais se reproduzem, passam a necessitar de suprimento de nutrientes maior e mais rápido, já que o consumo proteico está exacerbado (RAK et al., 2002).

2.4 Angiogênese

A angiogênese, processo de formação de novos vasos sanguíneos, desempenha um papel crucial em muitas condições normais e patológicas (CHUNG; LEE; FERRARA, 2010; RAICA; CIMPEAN, 2010). É essencial ao crescimento tumoral, sobrevivência, invasão (PRESS; LENZ, 2007), facilita também o acesso das células tumorais à corrente

circulatória, promovendo metástases (FOLKMAN, 2002; KANDA et al., 2005; SOUFLA et al., 2005).

Na fase tumoral inicial, as células neoplásicas obtêm nutrientes e fatores de crescimento por difusão, a partir da linfa e dos tecidos adjacentes, especialmente quando constituem tumor sólido, até 1-2 mm³, para continuarem a crescer (STARLING; CUNNINGAGHAM, 2004) os focos tumorais necessitam de suprimento sanguíneo próprio para assegurar a manutenção da reprodução celular acelerada e irregular. Para isso, as células tumorais sintetizam concentrações maiores de fatores de crescimento e dos receptores de membrana tirosina quinase, os quais promovem a formação de novos vasos, num processo denominado angiogênese (CHOI et al., 2008; SAAD, 2010b).

Na carcinogênese, há a ativação dos oncogenes mutados, promovendo aumento da síntese de fatores de crescimento da vasculatura, acompanhada da perda da ação de genes supressores de tumor, o que contribui e promove a aquisição do fenótipo angiogênico pelos clones de células tumorais. Dessa forma, como a angiogênese tumoral deriva do desequilíbrio entre os mecanismos estimuladores e inibidores da neoformação vascular, com predomínio dos primeiros, e este desequilíbrio tem origem na alteração molecular do DNA, admite-se que a angiogênese tumoral é geneticamente determinada (RAK et al., 2002).

Admite-se, então, modernamente, que a angiogênese é a forma pela qual as alterações genéticas nas células cancerosas transcendem os limites celulares e asseguram o mecanismo de suporte externo, dependente do hospedeiro, para a sobrevivência das células tumorais. Essa afirmação tem sido comprovada pela observação de que, quando a microvasculatura tumoral é comprometida, as células tumorais padecem e entram em apoptose, principalmente como resultado de hipóxia e estresse metabólico. Em resumo, as alterações no DNA promovem a proliferação celular desordenada, o desequilíbrio da transdução de sinal celular pela alteração dos receptores de tirosina quinase e a angiogênese, como fenômenos intimamente interligados e sequenciais (PRESS; LENZ, 2007).

Essas evidências promoveram a busca de melhor compreensão da ação dos receptores de membrana de tirosina quinase, quer como alvo de terapia antineoplásica (CARMELIET, 2003), quer como marcadores biológicos do processo neoplásico, admitindo que possam auxiliar no diagnóstico, bem como em tratamentos mais específicos e com melhores resultados.

2.5 Receptores de membrana com atividade intrínseca tirosina quinase

Os receptores de membrana com atividade intrínseca tirosina quinase são glicoproteínas ligadas à membrana celular, as quais possuem domínio extracelular (para contato com os ligantes), porção transmembrana e domínio intracelular. Após interação com o ligante, duas moléculas do receptor se aproximam e formam dímeros. O domínio intracelular possui locais para autofosforilação em resíduos de tirosina, o que promove ativação da proteína *growth factor receptor-bound protein 2* (Grb2), do grupo de genes denominados *son of sevenless* (SOS), as proteínas *rat sarcoma vírus* (Ras) e o proto-oncogene *serine/threonine-protein kinase* (Raf), com consequente ativação das *mitogen-activated protein kinases* (MAP-quinases), catalisadas pela proteína ativadora da MAP-quinase (Mek). Essa cascata ativa as *extracellular-signal-regulated kinases* (Erk). Como resultado, ocorre ativação dos genes Jun, Fos e Myc que ativam fatores de transcrição, que se ligam aos promotores de genes que codificam proteínas importantes para os processos de proliferação, motilidade e invasão celular (SAAD, 2010a).

2.5.1 Receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR)

O receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), uma glicoproteína transmembrana (PRESS; LENZ, 2007; SAAD, 2010a), é o receptor de membrana para ligantes como fator de crescimento epidérmico (EGF) e *transforming growth factor-alpha* (TGF- α) e está envolvido na transmissão de mensagens necessárias à sobrevivência e à proliferação de células normais e neoplásicas (SAAD, 2010a; SOONTHORNTHUM et al., 2011).

Na Figura 1, observa-se o mecanismo de ação do receptor EGFR. A ativação de receptores ligados à tirosina quinase pelo acoplamento de ligantes na porção extracelular da membrana plasmática desencadeia a cascata de reações de ativação. Assim, o receptor tirosina quinase ativado liga-se, na porção extracelular ao fator de crescimento epidérmico (EGF) ativando o domínio citoplasmático da tirosina quinase, do que resulta a fosforilação dos resíduos de tirosina intracelulares. Essa ativação promove a ligação do domínio SH2 da

proteína GRB2 aos resíduos fosforilados da tirosina, a qual se liga ao fator SOS, por dois domínios SH3 da CRB2. O acoplamento do complexo GRB2-SOS à porção fosforilada do EGFR promove a ativação da proteína SOS, a qual remove a guanina-difosfato (GDP) da proteína RAS, o que permite que esta se ligue à guanina-trifosfato (GTP), ativando-se. Ativa, a RAS pode se ligar a outras proteínas que estimulam a via MAP-quinase e transmitindo a informação recebida do receptor até o interior do núcleo para estimular a proliferação e diferenciação celular. A atividade de RAS é terminada pela hidrólise de GTP, que é estimulada por proteínas ativadoras de GTPase (GAPs), quando a proteína volta ao seu estado inativo. As mutações de genes RAS em câncer de humanos têm efeito de inibir a hidrólise de GTP pelas proteínas RAS. Assim, essas proteínas RAS mutadas permanecem continuamente na forma ativa ligada à GTP, conduzindo a proliferação desordenada das células cancerosas mesmo na ausência de estimulação de fator de crescimento (WORTZEL; SEGER, 2011).

Pelo fato de o receptor EGFR mutado comportar-se como oncogene no comprometimento do colo do útero, promovendo proliferação celular tumoral e induzindo neovascularização, facilitando metástase tumoral, essa molécula tem sido alvo de estudos para sua identificação no tecido neoplásico e para desenvolvimento de drogas antineoplásicas (LAGRANGE et al., 1993; CIARDIELLO; TORTORA, 2008; NOORDHUIS et al., 2009; IIDA et al., 2011; SOONTHORNTHUM et al., 2011).

Dentre os métodos de determinação da expressão do EFGR no câncer do colo uterino estão marcação com radioligantes, imunoabsorção (ELISA), citometria de fluxo, FISH e imunoistoquímica, cujos resultados variam de 6% a 100%, devido à grande variedade de técnicas e à falta de padronização de reagentes e métodos (SOONTHORNTHUM et al., 2011).

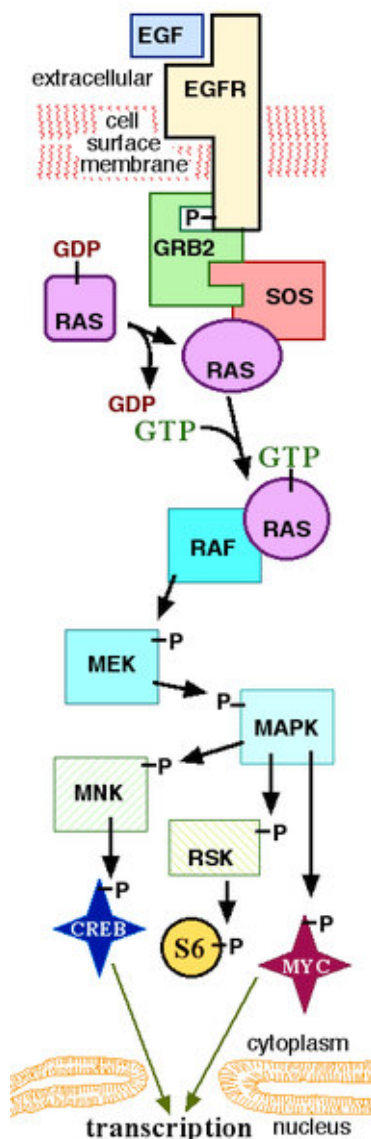


Figura 1 – Cascata de reações desencadeadas pela ativação do EGFR

Fonte: http://www.thefullwiki.org/Cell_signaling

Iida et al. (2011), com o objetivo de investigar os padrões de EGFR, sua hiperexpressão, a amplificação gênica e a presença de mutações ativas no domínio tirosina quinase desse gene, analisaram 59 casos de carcinoma escamoso e 52 casos de adenocarcinoma ou carcinoma adenoescamoso. Utilizaram as técnicas de FISH, imunoistoquímica e rastreamento de mutações do EGFR por *single-strand conformational polymorphism* (PCR-SSCP), cujos resultados foram correlacionados com dados clínicos. Na imunoistoquímica, 38% dos 59 casos de carcinoma escamoso foram positivos, contra 2% dos casos de adenocarcinoma ou carcinoma adenoescamoso, diferença esta com significância estatística. Os autores identificaram amplificação do gene EFGR exclusivamente em

carcinomas escamosos e consideraram o achado relevante para diagnóstico, prognóstico e avaliação da resistência terapêutica, uma vez que a sobrevida dessas pacientes foi menor que a daquelas nas quais a amplificação estava ausente. Recomendaram que as pesquisas com imunoistoquímica devam prosseguir por ser um método de menor custo operacional, rápido e que pode ser incorporado à rotina anatomopatológica.

Quanto ao emprego de drogas antineoplásicas dirigidas às ações do EGFR, os resultados de estudo ainda são controversos. Essas drogas empregam anticorpos monoclonais anti-EGFR ou inibidores dos resíduos de tirosina quinase na molécula do EGFR. Os anticorpos monoclonais anti-EGFR ligam-se à porção extracelular do receptor impedindo sua dimerização pela oclusão da região ligante. Consequentemente essas drogas inibem a proliferação celular, a angiogênese pelo bloqueio da síntese de VEGFR e potencializam a atividade antitumoral das drogas citotóxicas e da radioterapia. Integram esse grupo o cetuximabe e o panitumumabe. As drogas que bloqueiam os resíduos de tirosina quinase atuam impedindo a fosforilação do EGFR e, portanto, o desencadeamento da cascata proteica, do que derivam os mesmos efeitos celulares dos anticorpos anti-EGFR, tal como o fazem o erlotinibe e o gefitinibe (CIARDIELLO; TORTORA, 2008; LONGATTO-FILHO et al., 2009; NOGUEIRA-RODRIGUES et al., 2009; TACERVA, 2011).

2.5.2 Receptor do fator de crescimento epidérmico humano-2 (HER-2/neu)

A família de receptores do fator de crescimento epidérmico (EGFR) compreende quatro receptores transmembrana estruturalmente relacionados, incluindo EGFR (HER1 ou erbB-1), ErbB2 (HER2), ErbB3 (HER3) e ErbB4 (HER4), os quais contêm uma região citoplasmática, com exceção do HER3 e todos, com exceção do HER2, apresentam ligantes específicos em domínios extracelulares. Essa característica diferencial do HER2 explica o fato de todos os receptores da família dimerizarem preferencialmente com o HER2 (FISZMAN; JASNIS, 2011).

A ativação dos receptores HER, em condições fisiológicas normais, é controlada espacialmente e temporalmente por seus ligantes, membros da família de fatores de crescimento EGF. Após homo e heterodimerizações dos receptores, ocorre fosforilação dos

resíduos de tirosina quinase intracelulares, o que desencadeia a cascata de moléculas sinalizadoras citoplasmáticas para transdução de sinal com o núcleo (CARNEY, 2007).

A dimerização de receptores com o receptor do fator de crescimento epidérmico humano-2 (HER-2/neu, também conhecido como c-erbB-2) promove transdução de sinal para ativar mobilidade, sobrevivência e proliferação celular, assim como resistência à apoptose. Daí decorre que a mutação ou hiperatividade do HER-2/neu promove alterações em todos esses processos celulares, propiciando condições para o crescimento tumoral. Adicionalmente a mutação concomitante do EGFR e da HER-2/neu favorece o aumento da síntese do receptor do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR), aumentando a angiogênese e fornecendo melhores condições para o crescimento tumoral (CIARDELLO; TORTORA, 2008).

As pesquisas sobre o valor diagnóstico, prognóstico e de resposta terapêutica envolvendo o HER-2/neu apresentam resultados controversos, conforme o tipo de câncer e sua localização. Há estudos que indicam que a expressão da oncoproteína HER2/neu e sua amplificação gênica global são eventos raros em neoplasia cervical, fornecendo evidências de que HER2/neu não desempenha qualquer papel importante no desenvolvimento e progressão da neoplasia cervical (ROSTY et al., 2004; LESNIKOVA et al., 2009); todavia a amplificação de HER-2 foi encontrada com relação direta com o grau das lesões cervicais (PROTRKA et al., 2007), alguns estudos mostrando revelando uma relação inversa da expressão do HER2/neu e o estadió clínico (LEE et al., 2004), bem como sua hiperexpressão mostrou-se associada com pior prognóstico, potencial metastático e comportamento biológico agressivo no câncer de colo uterino (CHAVEZ-BLANCO et al., 2004; GUPTA et al., 2009).

Diferente da controvérsia relatada em diversas pesquisas sobre o valor diagnóstico e prognóstico do HER-2/neu em neoplasias malignas do colo do útero, no câncer da mama sua superexpressão e significado prognóstico conduziram à elaboração e aprovação do uso do trastuzumabe, um anticorpo monoclonal para HER-2/neu (CHAVEZ-BLANCO et al., 2004), bem como ao uso desse marcador na prática clínica, havendo implicância no prognóstico e na decisão clínica sobre a terapêutica a ser utilizada. O uso de trastuzumabe, um anticorpo específico contra ErbB-2, está indicado apenas a pacientes com hiperexpressão do HER-2/ErbB-2/neu (ZIDAN et al., 2005).

2.5.3 Receptor do fator de crescimento vascular endotelial (VEGFR)

Os VEGFR são receptores de membrana para ligantes como os fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF), que constituem uma família de proteínas diméricas, incluindo VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e VEGF-E, assim como os fatores de crescimento placentário (PIGF-1 e 2) (MATHUR et al., 2005; HICKLIN; ELLIS, 2006). Os membros da família VEGF são importantes nos processos angiogênicos fisiológicos em adultos, tais como cicatrização de feridas, ovulação e gravidez, bem como em condições patológicas como o câncer (HICKLIN, ELLIS, 2006).

A síntese dos VEGF é induzida pela hipóxia tissular. Quando a célula está deficiente em oxigênio, sintetiza e libera os fatores induzidos por hipóxia (HIF1 α e HIF1 β), o qual transduz o sinal para a liberação de moléculas de VEGF, como também modula a síntese e liberação de eritropoetina renal. As moléculas de VEGF então se ligam aos receptores VEGFR localizados na membrana de células endoteliais, desencadeando a cascata de síntese e liberação de moléculas de transdução de sinal, culminando com a angiogênese, dentre outros processos fisiológicos (HICKLIN; ELLIS, 2006; CHOI et al, 2008).

Os fatores HIF1 α e HIF1 β são constantemente sintetizados pelas células, mas como o fator HIF1 α é altamente lábil em concentrações adequadas de oxigênio, ele se degrada e não desencadeia a síntese de VEGF. No entanto, em hipóxia, o fator HIF1 α não se degrada e forma o complexo HIF1 α - β , estimulando a liberação de VEGF (CHOI et al, 2008).

Semelhante ao que ocorre com o EGFR e o Her-2/neu, os três receptores dos fatores de crescimento vascular endotelial (VEGFR) têm uma porção extracelular (formada por sete domínios semelhantes à imunoglobulina), uma porção transmembrana e uma porção intracelular, contendo domínios de resíduos de tirosina quinase. Cada receptor liga-se a um tipo diferente de fator de crescimento vascular endotelial. Assim, o VEGF, o VEGF-B e o PIGF-1,2 ligam-se ao VEGFR-1, promovendo o recrutamento de células endoteliais e a migração de monócitos. O VEGFR-2, também denominado KDR/Flk-1 se expressa praticamente em todas as células endoteliais e liga-se às proteínas VEGF, VEGF-c, VEGF-D e VEGF-E para regular a proliferação, a migração e a sobrevivência de células endoteliais, enquanto que o receptor VEGFR-3 atua exclusivamente no endotélio linfático, apesar de se expressar nos vasos sanguíneos associados a tumores. Além da ação dos VEGFR sobre a angiogênese, a linfangiogênese (BRESLIN et al., 2007) e a migração de monócitos no sítio de hipóxia,

favorecendo reações imunológicas, a cascata de transdução de sinal inclui a ativação dos sistemas Ras, Raf e MAP, portanto favorecendo os processos relacionados à multiplicação celular (NILSSON; HEYMACH, 2006) (Figura 2).

Daí decorre que o aumento da concentração de VEGF e dos receptores VEGFR (por superexpressão gênica) serem implicados em pior prognóstico do câncer, favorecendo maior agressividade tumoral e metástase, com redução do tempo de vida total e de sobrevida livre de doença.

Desde o início dos estudos experimentais, o VEGF foi pensado para ser um alvo promissor para a terapia antiangiogênica e o anticorpo humanizado contra o VEGF, bevacizumabe, foi a primeira droga antiangiogênica introduzida na prática clínica (FERRARA; KERBEL, 2005).

Diversos tumores sólidos apresentam superexpressão de VEGF, responsável por contribuir para maior potencial metastático nesses casos (SAAD, 2010a). GAFFNEY et al. (2003) estudaram cinco marcadores tumorais e observaram que a expressão do VEGFR só se correlacionou com a sobrevida em análises multivariadas. Há estudos que tentam avaliar a correlação entre a hiperexpressão do VEGFR e outros marcadores (NO et al., 2009).

A positividade VEGFR pode ser um preditor independente de má resposta ao tratamento, além de uma taxa de sobrevivência livre de progressão significativamente menor, portanto a avaliação da expressão do VEGFR antes do tratamento pode fornecer informações adicionais para a identificação de pacientes com câncer cervical que terão uma baixa probabilidade de resposta à quimioterapia neoadjuvante e com um prognóstico desfavorável (CHOI et al., 2008).

Compreende-se, dessa forma, a hipótese de que essas moléculas podem ser biomarcadores de diagnóstico, prognóstico, bem como de eficácia terapêutica (MATHUR et al., 2005). A expressão do VEGFR pode ser um potencial alvo molecular para estratégias de tratamento antiangiogênico do câncer de colo uterino (HAMMES et al., 2008).

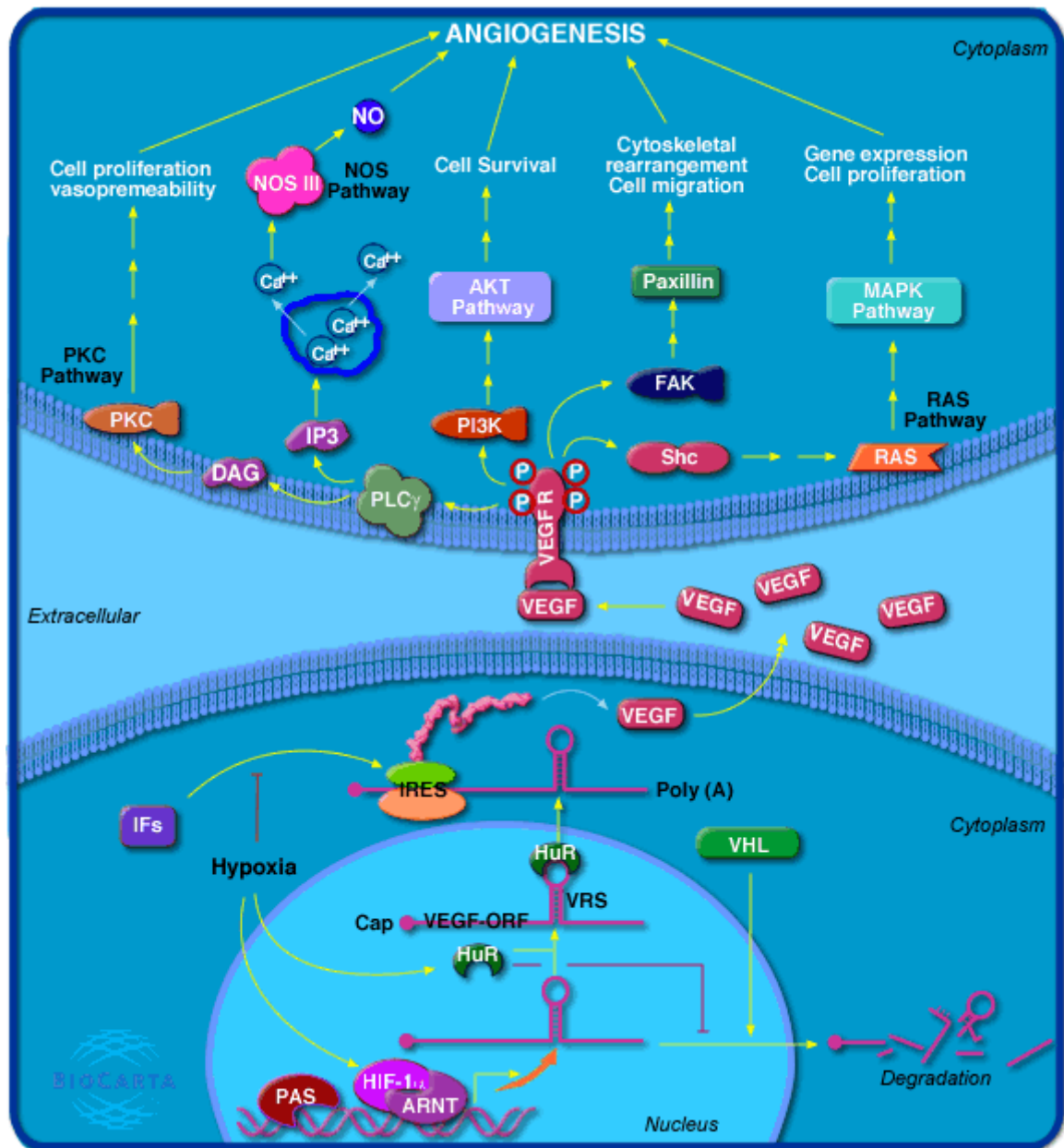


Figura 2 – Diagrama da cascata de síntese e liberação de sinais intercelulares do processo de angiogênese promovido pelo VEGFR

Fonte: Nilsson; Heymach, 2006

2.5.4 Receptor do fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGFR)

A desorganização tecidual observada nos cânceres envolve também a transdução de sinal entre as células tumorais e as células normais circunjacentes, ou seja, entre as células

estromais. O estroma contém células endoteliais, pericitos (os quais estão em contato com a superfície externa dos vasos sanguíneos), fibroblastos associados ao câncer e algumas células do sistema imunológico. Juntas, estas células estromais contribuem com a angiogênese, produzindo fatores que estimulam o crescimento tumoral e facilitam a invasão dos tecidos circunjacentes pelas células tumorais (WU et al., 2008), tal como ocorre no câncer de colo do útero.

Além da ação dos receptores VEGFR na angiogênese, mais recentemente as pesquisas indicaram que as células tumorais sintetizam concentrações altas do receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR) e de seus fatores ligantes (PDGF), bem como há a ação do fator de crescimento fibroblasto-*like* (FGF) no estroma tumoral.

O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) é o principal agente mitógeno de células mesenquimais e consiste de uma família de polipeptídeos A, B, C e D que promovem migração, proliferação e sobrevivência celular, após se ligarem a seus receptores tirosina quinase PDGFR- α e PDGFR- β , formando homodímeros (PDGFR- $\alpha\alpha$, PDGFR- $\beta\beta$) ou heterodímeros (PDGFR- $\alpha\beta$) (TAJA-CHAYEB et al., 2006). A ativação dos receptores PDGFR pelas proteínas ligantes PDGF desencadeia a cascata de reações mediadas pela transdução de sinal, aumentando a expressão de fatores que direta ou indiretamente estimulam o crescimento das células tumorais e a angiogênese (RAICA; CIAMPEAN, 2010).

O envolvimento da fração PDGF- β no desenvolvimento vascular ocorre precocemente e se dá pela estimulação da diferenciação das células-tronco embrionárias em células endoteliais, mediada por compostos oxigênio reativos e pelo íon cálcio. O PDGF não estimula apenas a proliferação das células endoteliais, mas também a síntese de VEGF, facilitando assim a neoformação vascular. O PDGF- β e o PDGFR-B, sintetizados pelas células endoteliais e pelos pericitos expressam-se no desenvolvimento da vasculatura normal e patológica. No entanto, quando a sinalização parácrina é desequilibrada, as células perivasculares não são recrutadas e as células endoteliais proliferam desordenadamente, dando origem à angiogênese tumoral. Em resumo, o crescimento tumoral pode decorrer de estimulação autócrina da síntese de PDGF pelas células tumorais, de hiperexpressão ou hiperativação dos receptores PDGFR, ou ainda do aumento da angiogênese, derivada da ação da PDGF no tumor (WU et al., 2008; RAICA; CIMPEAN, 2010).

A partir da constatação de que a terapêutica deve buscar a inibição do crescimento tumoral pela inativação dos sinais de PDGF e PDGFR, três mecanismos têm sido investigados: redução das células estromais nas quais a transdução de sinal de PDGF estiver

ativa; inibição indireta do tumor buscando ação sobre os pericitos, para bloquear a angiogênese tumoral independente da ação da PDGF. Para tanto é necessário o desenvolvimento de testes de identificação desses compostos em tecidos tumorais, permitindo avaliar objetivamente a eficácia terapêutica (WU et al., 2008).

Um inibidor de PGFR, o mesilato de imatinibe, tem beneficiado pacientes com *myeloid malignancies*, GIST (*gastrointestinal stromal tumor*) (JONES; CROSS, 2004), pelo efeito inibitório do crescimento. Trata-se de um potente e específico inibidor de tirosina quinase que tem demonstrado interesse pelo potencial alvo terapêutico para diversas neoplasias. Os dados mais recentes da literatura sugerem que o bloqueio do PDGFR seria de valor terapêutico no câncer de colo uterino (TAJA-CHAYEB et al., 2006).

2.6 Estadiamento

A compreensão da carcinogênese e da angiogênese corroborou a importância da realização do estadiamento oncológico, uma vez que ele tem implicações na escolha do tratamento correto a ser feito. O exame clínico, associado à análise histológica, e, em algumas situações, aos exames de imagem, fornece a informação necessária para o completo estadiamento das pacientes com câncer de colo uterino. Esse estadiamento considera o tamanho do tumor, o comprometimento linfonodal e a informação sobre sítio de metástase, completando a classificação de neoplasias malignas (TNM) (EDGE et al. 2010).

O Sistema TNM foi idealizado nos anos 1940 e assumido pela União Internacional Contra o Câncer nos anos 1950. Desde então vem sendo continuamente revisado e divulgado (Brasil, 2004). Em praticamente todas as localizações topográficas e tipos morfológicos de tumores, o estadiamento pode ser restrito aos seguintes estadios: I, II, III e IV. Estadio 0 - carcinoma *in situ*; Estadio I - invasão local inicial; Estadio II - tumor primário limitado ou invasão linfática regional mínima; Estadio III - tumor local extenso ou invasão linfática regional extensa; Estadio IV – tumor localmente avançado ou, como é quase o critério geral de classificação, presença de metástases à distância (GADELHA; COSTA; ALMEIDA, 2005) (Quadro 1).

Quadro 1 – Classificação morfológica de tumores de colo de útero pelo sistema TNM

<i>Tipo morfológico</i>	<i>Classificação</i>	<i>Comprometimento linfonodal</i>	<i>Metástase</i>
-	Tis	N0	M0
IA	T1a	N0	M0
IA1	T1a1	N0	M0
IA2	T1a2	N0	M0
IB	T1b	N0	M0
IB1	T1b1	N0	M0
IB2	T1b2	N0	M0
IIA	T2a	N0	M0
IIB	T2b	N0	M0
IIIA	T3a	N0	M0
IIB	T1, T2, T3a	N1	M0
	T3b	Qualquer N	M0
IVA	T4	Qualquer N	M0
IVB	Qualquer T	Qualquer N	M1

Fonte: EDGE et al., 2010

O Sistema TNM admite duas classificações: a clínica (TNM ou cTNM), estabelecida antes que qualquer terapêutica tenha sido empregada, e a patológica (pTNM), a partir da análise da peça cirúrgica. O pTNM se aplica aos casos operados, podendo, ou não, coincidir com o cTNM. O estágio em que uma neoplasia maligna é diagnosticada é dependente de variáveis tumorais (tipo histopatológico, localização anatômica, velocidade de crescimento e potencial de invasão e disseminação), das condições de resistência imunológica do organismo e da acessibilidade e qualidade dos serviços de saúde.

A utilização de um sistema de classificação de tumores malignos padronizado permite inferir sobre o comportamento biológico do tumor, escolher condutas terapêuticas, prever complicações, estimar prognósticos, organizar a avaliação dos resultados terapêuticos, padronizar a publicação desses resultados, facilitar a troca de informações entre os especialistas e contribuir para a pesquisa oncológica. Todavia, o principal objetivo refere-se à comparação entre os resultados terapêuticos, por estágio, obtidos nos diversos centros de tratamento do câncer, nacionais e internacionais (GADELHA, 1996; BRASIL, 2003; BRASIL, 2004) (Quadro 2).

Quadro 2 - Classificação TNM do câncer de colo uterino

<i>Categorias TNM</i>	<i>Estádios da FIGO</i>	<i>Definição</i>
TX	-	Tumor primário não pode ser avaliado
T0	-	Sem evidência de tumor primário
Tis ⁽¹⁾	-	Carcinoma <i>in situ</i> (carcinoma pré-invasor)
T1	I	Carcinoma da cérvix confinado ao útero (extensão ao corpo deve ser desconsiderada)
T1a ⁽²⁾	IA	Carcinoma invasor, diagnosticado somente pela microscopia
T1a1	IA1	Invasão estromal de até 3 mm ou menos em profundidade e 7 mm ou menos de extensão horizontal
T1a2	IA2	Invasão estromal maior que 3 mm e até 5 mm em profundidade com uma extensão horizontal de 7mm ou menos
T1b	IB	Lesão clinicamente visível, limitada ao colo, ou lesão microscópica maior que T1a2/IA2*
T1b1	IB1	Lesão clinicamente visível com 4 cm ou menos em sua maior dimensão
T1b2	IB2	Lesão clinicamente visível com mais de 4 cm em sua maior dimensão
T2	II	Tumor que invade além do útero, mas não atinge a parede pélvica ou o terço inferior da vagina
T2a	IIA	Sem invasão do paramétrio
T2a1	IIA1	Lesão clinicamente visível de 4 cm ou menos na maior dimensão
T2a2	IIA2	Lesão clinicamente visível maior que 4 cm na maior dimensão
T2b	IIB	Com invasão do paramétrio
T3	III	Tumor que se estende à parede pélvica e/ou envolve o terço inferior da vagina e/ou causa hidronefrose e/ou exclusão renal
T3a	IIIA	Tumor que compromete o terço inferior da vagina, sem extensão à parede pélvica
T3b	IIIB	Tumor que se estende à parede pélvica e/ou causa hidronefrose ou exclusão renal
T4**	IVA	Tumor que invade a mucosa vesical ou retal e/ou que se estende além da pélvis verdadeira
Linfonodos regionais		
NX	-	Linfonodos não pode ser avaliado
N0	-	Sem metástase linfonodal regional
N1	IIIB	Metástase linfonodal metastática
Linfonodo regional inclui paracervical, parametrial, hipogástrico (obturador), ilíaco comum, externo e interno, pressacral, e sacral		
Metástase à distância		
M0	-	Sem metástase à distância
M1	IVB	Metástase à distância (inclui disseminação peritoneal, envolvimento de linfonodo supraclavicular, mediastinal ou para-aórtico, pulmão, fígado ou ossos.

Notas:

1 - A FIGO (Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia) não inclui mais o estágio 0 (Tis)

2 – Todas as lesões visíveis macroscopicamente, mesmo com invasão superficial, são classificadas como T1b/IB

* - Todas as lesões visíveis macroscopicamente, mesmo com invasão superficial, são classificadas como IB. A profundidade da invasão não deve ser maior do que 5 mm e a extensão horizontal não deve ser maior do que 7 mm. A profundidade da invasão não deve ser maior do que 5 mm, medida a partir da base do epitélio, superficial ou glandular, do qual se origina. A profundidade da invasão é definida como a medida do tumor, desde a junção epitelial-estromal da papila epitelial adjacente mais superficial até o ponto mais profundo da invasão. O envolvimento do espaço vascular, venoso ou linfático, não altera a classificação.

** - A presença de edema bolhoso não é suficiente para classificar o tumor como T4.

Fonte: EDGE et al., 2010

2.7 ARTIGO DE REVISÃO

EXPRESSÃO DO RECEPTOR DO FATOR DE CRESCIMENTO VASCULAR ENDOTELIAL NO CÂNCER DE COLO UTERINO: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA¹

VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR RECEPTOR EXPRESSION IN CERVIX CANCER: A SYSTEMATIC REVIEW

Guacyra Magalhães PIRES², Ademar Afonso de AMORIM JÚNIOR³, Maria Julliana Galvão NUNES², Darley de Lima FERREIRA FILHO², Nicodemos Teles de PONTES-FILHO⁴

RESUMO

Objetivo: identificar através da revisão sistemática a expressão do receptor do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) nos diferentes graus de expressão e sua correlação com o prognóstico em portadores de câncer de colo uterino. **Método:** revisão sistemática de pesquisa nas bases de dados: PubMed, MedLine Old, MedLine, LILACS, SciELO e Science Direct. **Resultados:** foram encontrados 107 publicações, sendo 9 na PubMed, 80 na MedLine, 2 na MedLine Old, 16 na Science Direct e nenhuma no LILACS e SciELO. Apenas 13 artigos foram selecionados baseados nos critérios de inclusão e exclusão. **Conclusão:** apesar da escassez de estudos envolvendo a expressão do VEGF no câncer de colo uterino, há a possibilidade de correlacionar a expressão com pior prognóstico.

Descritores: fator de crescimento vascular endotelial, angiogênese, câncer de colo uterino, imunoistoquímica, revisão sistemática

INTRODUÇÃO

O câncer de colo uterino representa doença de grande importância devido a sua alta incidência e mortalidade nos países em desenvolvimento. Há aproximadamente 500 mil casos novos por ano no mundo^{1,2,3}, sendo responsável pelo óbito de, aproximadamente, 230 mil mulheres por ano, sendo a principal causa de óbito por câncer em mulheres em vários países em desenvolvimento^{2,4,5}.

Focos tumorais maiores que 1 a 2 mm em diâmetro necessitam de um suprimento sanguíneo garantido para que continuem a crescer, então, as células tumorais passam a produzir fatores de crescimento, como o VEGF (*vascular endothelial growth factor*). O VEGF tem um papel fundamental na

angiogênese do tumor⁶ promovendo a formação de novos vasos^{6,7}, fenômeno essencial ao crescimento tumoral, também importante para que o tumor possa ganhar acesso à circulação e causar metástases^{8,9,10}, através do aumento da permeabilidade vascular e proliferação das células endoteliais vasculares, considerado um fator crítico envolvido no desenvolvimento e progressão do câncer¹¹. Diversos tumores sólidos apresentam expressão (quantidade) aumentada de VEGF, que contribui para maior potencial metastático nesses casos⁷.

O bloqueio à formação de novos vasos leva à redução do suprimento sanguíneo ao tumor. A expressão do VEGFR pode ser um potencial alvo molecular para estudos de prevenção e tratamento do câncer de colo uterino¹² e já está sendo explorado em uma ampla variedade de neoplasias¹³.

1 Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

2 Mestrando em Patologia do Programa de Pós-Graduação em Patologia da UFPE

3 Doutor em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres pela Universidade de São Paulo (USP)

4 Doutor em Nutrição pela Universidade Federal de Pernambuco

O estudo se justifica pela escassez de artigos que estudem o perfil imunoistoquímico do câncer de colo uterino em nosso país¹⁴ e mundialmente, por conseguinte, poucos estudos que envolvam o uso de drogas alvo molecular no combate à doença.

O objetivo dessa pesquisa é realizar uma revisão sistemática que contemple a expressão e o grau de expressão do fator de crescimento vascular endotelial em indivíduos portadores de câncer de colo uterino e sua correlação com o prognóstico.

MÉTODOS

Revisão sistemática realizada de setembro até outubro de 2010, a partir da base de dados *online*: PubMed (U.S. National Library of Medicine), MedLine (Literatura Internacional em Ciências da Saúde – 1997 - 2010), MedLine Old (Literatura Internacional em Ciências da Saúde – 1966 – 1996), LILACS (Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde), SciELO (Scientific Electronic Library Online) e Science Direct, sem delimitação do ano de publicação.

Foram utilizados os descritores (DeCs) na língua inglesa: *cervix cancer*, *vascular endothelial growth factor*; recorreu-se ao operador lógico “AND” para combinação dos descritores para rastreamento das publicações. Critérios de exclusão de artigos: (a) teses, dissertações, monografias, artigos de revisão e relatos de caso; (b) artigos escritos em outras línguas que não o inglês, francês, português ou espanhol; (c) os artigos com indivíduos portadores do HIV; (d) avaliação imunocitoquímica ou imunoistoquímica realizada em outra topografia que não o colo uterino; (e) trabalhos que façam subtipagem do VEGF. Critérios de inclusão de artigos: (a) apenas artigos referentes ao câncer de colo uterino invasivo; (b) artigo original de pesquisa

com seres humanos; (c) estudo com pacientes portadoras dos tipos histológicos escamoso e/ou adenocarcinoma e/ou adenoescamoso; (d) trabalhos com análise imunoistoquímica do marcador fator de crescimento endotelial vascular. Foram também pesquisadas as referências dos artigos incluídos. O estadió clínico e a classificação histológica foram baseados nos critérios de classificação da FIGO¹⁵ (Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia) e na *World Health Organization*¹⁶, respectivamente.

RESULTADOS

Inicialmente foram identificadas 107 publicações, sendo 9 na PubMed, 80 na MedLine, 2 na MedLine Old, 16 na Science Direct e nenhuma no LILACS e SciELO. Foram excluídos pela leitura do título, leitura do resumo, leitura do artigo na íntegra ou por repetição 94 artigos. Ao final, apenas 13 artigos foram selecionados baseados nos critérios de inclusão e exclusão. Para apresentação dos resultados, optou-se por considerar a apresentação das seguintes variáveis: autor/ano, amostra, método, resultado, conforme descrito na Tabela 1.

DISCUSSÃO

A heterogeneidade dos artigos não permitiu a aplicação de tratamento estatístico (metanálise). Há grande dificuldade para avaliar estudos sobre marcadores tumorais e comparar seus resultados¹⁷. As diversidades que dificultam a avaliação vão desde a escolha de anticorpos de diferentes laboratórios; método de avaliação da expressão do marcador; subjetividade da avaliação da expressão do marcador dada pelo observador¹⁰; escore de expressão do marcador para cada estudo; a inclusão de casos de carcinoma *in situ* misturados ao carcinoma invasor¹⁸; a heterogeneidade de parâmetros estudados, como a ausência de análise da relação entre a expressão do VEGF e o status linfonodal e a invasão parametrial¹⁹.

Um fato interessante encontrado foi o período de publicação dos artigos selecionados, pois mesmo não estipulado limite de período de publicação a partir dos

critérios de inclusão e de exclusão, verificou-se que só foram encontrados artigos com data de publicação a partir de 1999, apesar do método imunoistoquímico já ser utilizado na patologia cirúrgica desde 1974²⁰ e do fator de crescimento vascular endotelial ter sido isolado e clonado a primeira vez em 1989²¹. Essa situação pode ser decorrente do interesse pela investigação da correlação de marcadores biológicos e prognóstico no câncer de colo uterino, além da possibilidade de direcionar o uso de terapias antiangiogênicas apenas mais recentemente, posteriormente à demonstração em outros tumores malignos, como da mama.

Os estudos tiveram amostragens que variaram de 28-165 casos, então estudos com amostragem pequena dificultam ou até mesmo impedem o estabelecimento de correlação da expressão do marcador biológico, VEGF, e diversos parâmetros propostos. Mesmo em estudos maiores, com 100¹⁹ e 152 pacientes¹⁸, não foi demonstrada associação entre a forte expressão do VEGF e o estadiamento da FIGO¹⁵, talvez pelo número reduzido de pacientes em cada estadio.

Os tipos histológicos mais estudados foram o escamoso, adenocarcinoma, e menos frequentemente, o adenoescamoso. Houve diminuição de todas as correlações significativas ao incluir ambos, carcinoma espinocelular (escamoso) e adenocarcinoma, para análise estatística¹⁷. Houve também estudo em que não ocorreu correlação entre quaisquer parâmetros por ter ocorrido análise apenas de adenocarcinoma e adenoescamoso²², onde já se sabe que a expressão do VEGF é significativamente mais forte que em carcinoma escamoso²³.

A análise da correlação entre a expressão do VEGF e a idade foi estudada na quase totalidade dos artigos

selecionados, exceto em 3 estudos^{12,13,22}, porém não foi demonstrada correlação em nenhum dos estudos. Acreditamos que a média de idade semelhante entre os estudos possa ter tido influência na inexistência de correlação entre a expressão do VEGF e a idade. Alguns estudos demonstraram não haver correlação também com o grau, subtipo histológico ou com controle local da doença^{22,24}.

Em relação ao método, houve grande heterogeneidade quanto à forma de analisar a expressão do VEGF. Artigos que utilizaram um escore em graus de expressão diferenciados por percentual de expressão^{13,17,18}, outros com escore relacionado com grau de expressão do tipo mínimo/moderado/intenso^{13,19}, outros com percentual de corte para considerar a expressão positiva ou negativa^{22,24,25}. Consideramos tal diversidade, fator contribuinte para impossibilitar comparação de resultados entre os estudos.

Diversos estudos estabeleceram uma correlação entre a profundidade de invasão no estroma e a expressão do VEGF^{10,26}, demonstrando que a expressão do VEGF está relacionada com um pior prognóstico. Já a correlação da expressão do VEGF e o envolvimento linfonodal pelo câncer de colo uterino foi demonstrada e revelou ainda correlação com invasão parametrial²⁵. Tais correlações implicam em pior prognóstico, também demonstrado mais claramente em outros estudos^{13,17,18,19}.

Alguns estudos envolveram indivíduos que foram submetidos a tratamento cirúrgico, outros à radioterapia e/ou quimioterapia ou ainda aqueles com combinação de cirurgia seguida por radioterapia e/ou quimioterapia, com poucos analisando a influência da expressão do VEGF no resultado de tratamento específico, com exceção de um único estudo¹⁹ que considerou a expressão do VEGF um fator altamente significativo e independente de prognóstico para pacientes com carcinoma do colo uterino tratados com radioterapia. Portanto, a submissão das pacientes a diversos protocolos terapêuticos não analisados de forma separada em relação

à expressão do VEGF impede a avaliação do resultado do tratamento.

Diversos estudos demonstraram, em análise multivariada, que a expressão do VEGF está relacionada com pior prognóstico^{13,17,25}, além de menor sobrevida global e sobrevida livre de doença¹³. Em análise univariada, apenas dois estudos tiveram relação com pior prognóstico quando da expressão do VEGF^{19,26}.

Outro problema encontrado foi a forma que foi feito o estadiamento das pacientes, como por exemplo, no estudo em que as pacientes foram submetidas apenas a tratamento com radioterapia e com estadiamento feito com exame clínico da pelve e ressonância magnética nuclear da pelve, sem análise do espécime cirúrgico para confirmação patológica²⁶.

Hellberg; Tot; Stendahl (2009) perceberam que a impossibilidade de analisar os estadios clínicos separadamente, a falta de ajuste para a expressão de marcadores tumorais relevantes concorrentes e a inclusão de diferentes subtipos histológicos no mesmo grupo de estudo pode levar a conclusões falsas sobre o significado dos marcadores tumorais de prognóstico.

CONCLUSÕES

Há escassos estudos que envolvam a expressão imunoistoquímica do VEGF no câncer de colo uterino, gerando subsídio científico, talvez, insuficiente para a realização de estudos com drogas alvo que bloqueiem a via da angiogênese.

Acreditamos que a expressão do VEGF é um fator prognóstico para o câncer de colo uterino, porém novos estudos, com maior número de pacientes, com avaliação individualizada por estadiamento, tamanho de tumor, modalidade terapêutica utilizada (cirurgia, quimioterapia, radioterapia ou a

combinação), estudos em países em desenvolvimento, onde os casos são encontrados em estadios relativamente avançados e, conseqüentemente, a sobrevida média é menor, cerca de 41% após cinco anos⁶, poderiam ajudar a entender melhor a influência do VEGF dentro de nossa realidade.

Declaração de conflitos de interesse:

Os autores não têm conflitos de interesse a declarar.

Tabela 1 – Estudos que analisaram a correlação da expressão e do grau de expressão do VEGF (*vascular endothelial growth factor*) com prognóstico no câncer de colo uterino.

AUTOR/ ANO	AMOSTRA DE CARCINOMA INVASOR	ESTADIO	MÉTODOS	RESULTADOS
Hellberg; Tot; Stendahl, 2009 ¹⁷	n: 165. Hist.: 129 escamoso, 29 adenocarcinoma, 7 outras histologias. Trat.: radioterapia.	Ib = 54 IIa = 14 IIb = 18 III = 35 IV = 7	Imunoistoquímica. Escore em 4 graus: 0, ausência de expressão do marcador; 1, expressão em 1–19% das células cancerígenas; 2, em 20–49%; 3, em 50% ou mais.	VEGF $\geq 50\%$ (n=87): IB-IIA, 53 (77,9%), IIB-IV, 34 (59,7%) p (0.03) Correlação com prognóstico em análise multivariada.
Hammes et al, 2008 ¹²	n: 28 Hist.: escamoso Trat. SI	SI	Imunoistoquímica.	Expressão positiva em 75% (p < 0.001) aumenta de forma paralela com a severidade da lesão, do epitélio normal para o carcinoma escamoso.
Kang; Hong, 2004 ²⁶	n: 42 Hist.: escamoso Trat.: radioterapia.	IB = 13 II = 23 III e IV = 6	Imunoistoquímica. VEGF positivo: quando mais de 10% das células tumorais de 500 células contadas estavam coradas.	Expressão positiva em 21/42 (50%), sendo significativamente maior em tumores > 4 cm que em tumores menores (65% vs. 31%, p=0.031). Sobrevida em 5 anos significativamente maior no grupo VEGF negativo (89% vs. 47%, p=0.02). Estadio (p=0.007), tamanho do tumor (p=0.025), duração da radioterapia externa (p=0.006) foram fatores prognósticos significativos para SG apenas em análise univariada.
Gaffney et al, 2003 ¹³	n: 55 Hist.: 48 escamoso, 5 adenocarcinoma, 2 adenoescamoso Trat.: radioterapia.	Ib = 12 II = 22 III = 17 IV = 4	Imunoistoquímica. Escore: 0, sem expressão; 1, <10% de células tumorais positivas; 2, 10%–50%; e 3, > 50%. Intensidade da expressão: 0, sem expressão; 1, expressão mínima; 2, moderada; e 3, forte.	O aumento da expressão do VEGF, em análise multivariada para SG e SLD, teve significância.
Ryu et al, 2003 ²²	n: 47 Hist.: 33 adenocarcinoma, 14 adenoescamoso Trat.: radioterapia.	I, II = 19 III, IV = 28	Imunoistoquímica. VEGF positivo: expressão > 50% e intensidade da expressão moderada.	Expressão positiva em 27/47 pacientes (57,4%), p não significante. Sem correlação com idade, grau histológico, subtipo histológico ou com controle local.
Lee, IJ et al, 2002 ¹⁰	n: 117 pacientes Hist.: 102 escamoso, 10 adenocarcinoma, 5 adenoescamoso Trat.: cirurgia $\pm$ radioterapia e/ou quimioterapia	Ib	Imunoistoquímica. Escore da intensidade da expressão: 0 (negativo); +; ++; e +++. Área de expressão: 0, negativo; +, $\leq 25\%$ intensidade na área do tumor; ++, 26–50%; e +++, 51–100%. Outro escore: grau 0–++, baixa expressão; grau +++, forte expressão em intensidade e área.	A intensidade de expressão do VEGF foi significativamente associada com profundidade da invasão estromal (p=0.01) e metástase para linfonodos pélvicos (p=0.03); também o único preditor significativo para recorrência pélvica (p=0.001) e o mais importante para recorrência à distância (p=0.001); em análise multivariada, foi fator prognóstico para SG e SLD (p=0.009 e p=0.001, respectivamente). A área de expressão do VEGF foi significativamente associada com tamanho do tumor (p=0.002),

porém não foi um fator prognóstico para SG e SLD, ou seja, sem correlação com prognóstico, bem como para recorrência pélvica ($p=0.14$) e à distância ($p=0.06$).

Lee, JS et al, 2002 ²⁴	n: 37 Hist.: adenocarcinoma Trat.: cirurgia ± radioterapia / quimioterapia	Ia = 7 Ib = 25 IIa = 3 IIb = 2	Imunoistoquímica. Definido como positivo se mais de 10% da membrana ou do citoplasma estiverem marcados.	Expressão positiva em 31 (83.8%). A avaliação estatística da expressão do VEGF de acordo com a idade, tipo histológico, grau de diferenciação, invasão linfovascular, <i>status</i> linfonodal e estadio revelou nenhuma diferença significativa em nenhum destes parâmetros.
Tjalma et al, 2000 ¹⁸	n: 152 Hist.: 104 escamoso, 12 adenocarcinoma, 10 adenoescamoso, 4 outras histologias	0=22, Ia=22, Ib=39, IIa=37, IIb=9, IIIa=5, IIIb=10, IVa=4, IVb=4	Imunoistoquímica. Inclusão de carcinoma <i>in situ</i> . Escore: 25% das células do tumor positivas, fraca expressão; 25–50%, moderada; e ≥50%, forte expressão.	30/152 (20%) tinham expressão ≥ 50%. Expressão do VEGF: sem valor prognóstico.
Loncaster et al, 2000 ¹⁹	n: 100 pacientes Hist.: 94 escamoso, 5 adenocarcinoma, 1 adenoescamoso Trat.: radioterapia.	I = 35 II = 36 III = 29	Imunoistoquímica. Escore da intensidade da expressão: 0, sem expressão; 1, expressão mínima; 2, expressão moderada; e 3, forte expressão.	A expressão de VEGF foi o fator prognóstico mais potente em análise multivariada para diminuição da sobrevida, além de aumento da taxa de metástases à distância, mas não para o controle local. Em análise univariada, apenas a expressão de VEGF e radiosensibilidade foram preditores dos resultados do tratamento.
Cheng et al, 1999 ²⁵	n: 104 Hist.: 79 escamoso, 20 adenocarcinoma, 5 adenoescamoso Trat.: cirúrgico	I = 87 II = 17	Imunoistoquímica. Escore da concentração: 0 - 75% (0–750 pg/mg da proteína) como expressão normal; > 75% (mais que 750 pg/mg) como hiperexpressão. $p < 0.05$	Tumores com hiperexpressão do VEGF tiveram maior incidência de invasão estromal profunda, invasão de paramétrio e metástase linfonodal. No mesmo estadio, o tamanho do tumor afeta a concentração e expressão do VEGF no estudo imunoistoquímico, demonstrando que haver correlação (pior prognóstico).

Fonte: PubMed, MedLine, MedLine Old, Science Direct, LILACS e SciELO, 2010.

Abreviações: E: estadio; Hist.: histologia; Trat.: tratamento; SI: sem informação; VEGF: *vascular endothelial growth factor* (fator de crescimento vascular endotelial); SG: sobrevida global; SLD: sobrevida livre de doença; FIGO: Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia

SUMMARY

VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR RECEPTOR EXPRESSION IN CERVIX CANCER: A SYSTEMATIC REVIEW

Guacyra Magalhães PIRES, Ademar Afonso de AMORIM JÚNIOR, Maria Julliana Galvão NUNES, Darley de Lima FERREIRA FILHO, Nicodemos Teles de PONTES-FILHO

Objective: to identify through a systematic review the expression of vascular endothelial growth factor in different degrees of expression and its correlation with prognosis in patients with cervix cancer.

Method: the systematic review was realized through research on databases: PubMed, MedLine Old, MedLine, LILACS, SciELO and Science Direct. **Results:** 107 publications were found, which 9 in PubMed, 80 in Medline, 2 in Old Medline, 16 in Science Direct and none in LILACS and SciELO. Only 13 articles were selected based on inclusion and exclusion criteria. **Conclusion:** despite the scarcity of studies involving the expression of VEGF in cervical cancer, it is possible to correlate the expression with worse prognosis.

Keywords: vascular endothelial growth factor, angiogenesis, cervical cancer, immunohistochemistry, systematic review.

REFERÊNCIAS

- BRITO, NMB; VIANA, WO; PEREIRA, PC. Carcinoma espinocelular moderadamente diferenciado em paciente sem fatores de risco para a doença, *Rev. Par. Med.* 2007, 21(1): 43-46
- BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, p. 32-34, 2009. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/index.asp?link=conteudo_view.asp&ID=5> Acessado em: 10/10/2010
- MINAGUCHI, T; YOSHIKAWA, H. - Molecular mechanism of cervical carcinogenesis, *Gan. To. Kagaku. Ryoho.* 2010, 37(1): 18-22
- GOLIJOW, CD; ABBA, MC; MOURÓN, SA; LAGUENS, RM; DULOUT, FN; SMITH, JS. - Chlamydia trachomatis and human papillomavirus infections in cervical disease in Argentine women, *Gynecol. Oncol.* 2005, 96(1): 181-186
- PÉREZ, LO; BARBISAN, G; ABBA, MC; LAGUENS, RM; DULOUT, FN; GOLIJOW, CD. -Herpes simplex virus and human papillomavirus infection in cervical disease in Argentine women, *Int. J. Gynecol. Pathol.* 2006, 25(1): 42-47
- CHOI, CH; SONG, SY; CHOI, JJ; PARK, YA; KANG, H; KIM, TJ; LEE, JW; KIM, BG; LEE, JH; BAE, DS. - Prognostic significance of VEGF expression in patients with bulky cervical carcinoma undergoing neoadjuvant chemotherapy, *B.M.C. Cancer.* 2008, 8: 295
- SAAD, E.D. – Bases Teóricas. O que o oncologista precisa saber sobre biologia molecular? Disponível em: <<http://www.dendrix.com.br/novosite/nibsemabs/?secao=8&pai=46&subsecao=95>> Acessado em: 10/10/2010.
- KANDA, K; UEDA, M; FUTAKUCHI, H; YAMAGUCHI, H; MORI, K; TERA, Y; UEKI, M. - Transcriptional expression of the genes implicated in angiogenesis and tumor invasion in cervical carcinomas, *Gynecol. Oncol.* 2005, 98: 453-461
- SOUFLA, G; SIFAKISB, S; BARITAKIA, S; ZAFIROPOULOSA, A; KOUMANTAKISB, E; SPANDIDOSA, DA. - VEGF, FGF2, TGFB1 and TGFBR1 mRNA expression levels correlate with the malignant transformation of the uterine cervix, *Cancer Letters.* 2005, 221: 105–118
- LEE, IJ; PARK, KR; LEE, KK; SONG, JS; LEE, KG; LEE, JY; CHA, DS; CHOI, HI; KIM, DH; DEUNG, YK. - Prognostic value of vascular endothelial growth factor in Stage IB carcinoma of the uterine cervix, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2002, 54(3):768-779

11. NO, JH; JO, H; KIM, SH; PARK, IA; KANG, D; HAN, SS; KIM, JW; PARK, NH; KANG, SB; SONG, YS. - Expression of vascular endothelial growth factor and hypoxia inducible factor-1alpha in cervical neoplasia, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2009, 1171:105-110
12. HAMMES, LS; TEKMAL, RR; NAUD, P; EDELWEISS, MI; KIRMA, N; VALENTE, PT; SYRJÄNEN, KJ; CUNHA-FILHO, JS. - Up-regulation of VEGF, c-fms and COX-2 expression correlates with severity of cervical cancer precursor (CIN) lesions and invasive disease, *Gynecol. Oncol.* 2008, 110(3): 445-451
13. GAFFNEY, DK; HASLAM, D; TSODIKOV, A; HAMMOND, E; SEAMAN, J; HOLDEN, J; LEE, RJ; ZEMPOLICH, K; DODSON, M. - Epidermal growth factor receptor (EGFR) and vascular endothelial growth factor (VEGF) negatively affect overall survival in carcinoma of the cervix treated with radiotherapy, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2003, 56(4):922-8
14. SALCEDO, MMBP; SILVEIRA, GPG; ZETTLER, CG. - A expressão da proteína p16 e herpes simples vírus tipo 2 em lesões pré-neoplásicas e neoplásicas do colo do útero, *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* 2008, 30 (2): 61-66
15. HAN, JJ; KOHN, EC. - The new FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, endometrium, and sarcomas. Disponível em: <<http://www.medscape.com/viewarticle/722721>>Acessado em: 10/10/2010.
16. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). International histological classification of tumours. Geneva: World Health Organization, 1969–1981, 2nd ed. Berlin: Springer-Verlag; 1988
17. HELLBERG, D; TOT, T; STENDAHL, U. - Pitfalls in immunohistochemical validation of tumor marker expression—exemplified in invasive cancer of the uterine cervix, *Gynecol. Oncol.* 2009, 112(1):235-240
18. TJALMA W; WEYLER J; WEYN B; VAN MARCK E; VAN DAELE A; VAN DAM P; GOOVAERTS G; BUYTAERT P. - The association between vascular endothelial growth factor, microvessel density and clinicopathological features in invasive cervical cancer, *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2000, 92(2):251-257
19. LONCASTER, JA; COOPER, RA; LOGUE, JP; DAVIDSON, SE; HUNTER, RD; WEST, CM. - Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression is a prognostic factor for radiotherapy outcome in advanced carcinoma of the cervix, *Br. J. Cancer* 2000, 83(5):620-625
20. WERNER, B; CAMPOS, AC; NADJI, M; TORRES, LF. - Uso prático da imuno-histoquímica em patologia cirúrgica, *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 2005, 41(5):353-364
21. FERRARA, N; HENZEL, WJ. - Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989, 161(2):851-858
22. RYU, SY; OKA, K; TSUJII, H; SUZUKI, Y; NAKANO, T. - Platelet-derived endothelial cell growth factor as a prognostic factor for radiotherapy outcome in patients with adenocarcinoma of the uterine cervix, *Gynecol. Oncol.* 2003, 89(3):414-419
23. TOKUMO, K; KODAMA, J; SEKI, N; et al. - Different angiogenic pathways in human cervical cancer, *Gynecol. Oncol.* 1998, 68:38–44
24. LEE, JS; KIM, HS; JUNG, JJ; LEE, MC; PARK, CS. - Expression of vascular endothelial growth factor in adenocarcinomas of the uterine cervix and its relation to angiogenesis and p53 and c-erbB-2 protein expression, *Gynecol. Oncol.* 2002, 85(3):469-475
25. CHENG, WF; CHEN, CA; LEE, CN; CHEN, TM; HSIEH, FJ; HSIEH, CY. - Vascular endothelial growth factor in cervical carcinoma, *Obstet. Gynecol.* 1999, 93(5 Pt 1):761-765
26. KANG, JO; HONG, SE. - The prognostic effect of VEGF expression in squamous cell carcinoma of the cervix treated with radiation therapy alone, *J. Korean. Med. Sci.* 2004, 19(5):693-697

Endereço para correspondência:

Universidade Federal de Pernambuco Centro de Ciências da Saúde - Pós-Graduação em Patologia
 Prédio da Pós-Graduação do Centro de Ciências da Saúde (CCS) – Térreo Av. Prof. Moraes Rego 1235
 Cidade Universitária - CEP: 50670-901 - Recife – PE
 guacyrapires@hotmail.com

3 MÉTODO

3.1 Área de estudo

A pesquisa foi realizada no Laboratório Romualdo Lins, situado na cidade de Caruaru/PE/Brasil. Trata-se de instituição privada em funcionamento desde 1983, atendendo a casos de patologia cirúrgica e citopatologia, além de realização de imunoistoquímica por profissionais especialistas.

3.2 Período de referência

O estudo foi realizado no período de setembro de 2010 a junho de 2011.

3.3 Desenho do estudo

O estudo foi do tipo transversal, retrospectivo.

3.4 Critérios de seleção da amostra

Para seleção dos blocos de parafina constantes do arquivo do laboratório, local do estudo, admitiram-se os seguintes critérios:

3.4.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos blocos de parafina, obtidos exclusivamente por histerectomia de pacientes com diagnóstico prévio de câncer de colo uterino.

3.4.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos os blocos de parafina: de espécimes obtidos por biópsia ou conização; os que foram cedidos para revisão em outro laboratório e não devolvidos; insuficiência de material ou presença de desgaste comprometendo a realização de revisão histológica, bem como a realização da imunoistoquímica para os marcadores biológicos propostos no estudo.

3.5 Definição das variáveis

As variáveis estudadas foram idade, tipo histológico, tamanho do tumor, grau histológico, margens cirúrgicas, presença de invasão linfovascular (ou angiolinfática), análise linfonodal, expressão dos marcadores VEGF, PDGFR- β , EGFR e estadiamento patológico, firmado a partir da mensuração tumoral, da extensão da invasão estromal, do comprometimento linfonodal, obedecidos os critérios classificatórios da Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia de 2010 (EDGE et al., 2010).

A categorização das variáveis está exposta no Quadro 3.

Quadro 3 – Categorização das variáveis de estudo

<i>Variáveis</i>	<i>Categorização</i>
Idade	Menor ou igual a 45 anos e maior que 45 anos
Tipo histológico	Escamoso, adenocarcinoma, adenoescamoso
Tamanho do tumor	Aferição em milímetros (mm)
Grau histológico	Grau 1 (bem diferenciado) Grau 2 (moderadamente diferenciado) Grau 3 (pouco diferenciado)
Margens cirúrgicas	Livres ou comprometidas
Invasão linfovascular	Presente ou ausente
Estadiamento patológico	Microinvasivo – com profundidade da invasão estromal menor ou igual a 5 mm ou extensão horizontal menor ou igual a 7 mm Invasivo - com profundidade da invasão estromal maior que 5 mm ou extensão horizontal maior que 7 mm
Status linfonodal	Negativo ou positivo, especificando o número de linfonodos comprometidos
Reação imunoistoquímica dos receptores de tirosina quinase VEGF, PDGFR- β , EGFR	Negativo Positivo, segundo os graus de expressão: 1 – mínima; 2 – moderada, 3 – forte expressão

3.6 Método de coleta de dados

Inicialmente, no período de setembro de 2010 a junho de 2011, no arquivo do laboratório, local do estudo, foram identificados os casos de câncer de colo uterino que obedeciam aos critérios de inclusão. Todos os espécimes, previamente fixados em solução aquosa de formol 10% e incluídos em parafina, foram localizados. Os blocos de parafina foram seccionados na espessura de 3 μ m, empregando micrótomo horizontal *American Optical 820*[®]. Os fragmentos foram montados em lâminas histológicas, previamente identificadas com a numeração constante do arquivo, de acordo com a rotina de procedimentos do laboratório, e submetidos à coloração com hematoxilina-eosina (HE). Cada uma das lâminas foi submetida à revisão histopatológica por dois patologistas, desconhecedores do diagnóstico constante do arquivo, para que firmassem, de forma independente, diagnóstico de câncer de colo uterino, empregando microscópio óptico (*Olympus CX31*[®]) para avaliar: tipo histológico, tamanho do tumor, grau histológico, situação das margens cirúrgicas, presença de invasão linfovascular (ou angiolinfática), extensão tumoral e invasão estromal, bem como presença e comprometimento linfonodal por neoplasia.

Os espécimes de 31 casos com diagnóstico exclusivo de câncer de colo uterino confirmado pelos dois patologistas foram submetidos a novos cortes histológicos, no mesmo micrótomo, para pesquisa imunoistoquímica dos marcadores biológicos VEGF, PDGFR- β , EGFR, a qual compreendeu silanização das lâminas, fixação dos espécimes nas lâminas silanizadas, recuperação antigênica, reação imunoistoquímica, coloração e montagem.

3.6.1 Silanização das lâminas

A técnica de silanização das lâminas de vidro consistiu nos seguintes passos:

- a) Mergulhar as lâminas em solução detergente neutro 10% por 2 horas;
- b) Lavar em água corrente até retirar todo excesso;
- c) Imergir sequencialmente.

- 1ª cuba: acetona para análise (PA)¹;
 - 2ª cuba: solução de silano² (3-aminopropiltriethoxysilano) a 6% em acetona PA;
 - 3ª cuba: três imersões em acetona P.A.
 - 4ª cuba: Imergir três vezes em acetona PA;
 - 5ª cuba: Deixar escorrer por 1 minuto;
- d) Secar em estufa por 10 minutos.

3.6.2 Preparação e marcação dos cortes histológicos

- a) Colocação dos cortes histológicos de três µm de espessura em lâminas silanizadas por 12 horas e depois em estufa a 60°C por 1 hora;
- b) Desparaafinar os cortes em banho de xilol³ por dois a três minutos (dois banhos, trocando o xilol);
- c) Retirar excesso;
- d) Hidratar em soluções decrescentes de álcool⁴:
 - a. Retirar excesso e mergulhar em xilol 1:1 em etanol absoluto, por três minutos;
 - b. Retirar excesso e mergulhar em etanol absoluto por dois a três minutos;
 - c. Retirar excesso e mergulhar em etanol a 95% por três minutos;
 - d. Retirar excesso e mergulhar em etanol a 70% por três minutos;
 - e. Retirar excesso e mergulhar em etanol a 50% por três minutos;
 - f. Lavar gentilmente com água destilada corrente por 30 segundos;
- e) Proceder à recuperação antigênica e reação imunoistoquímica empregando técnica própria a cada marcador, conforme Quadro 4.

¹ Vetec Química Fina LTDA, Duque de Caxias, RJ, Brasil

² Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA

³ Miyako do Brasil – indústria e comércio LTDA, Guarulhos, SP, Brasil

⁴ Indústria Farmacêutica Bioquímica LTDA, São José do Rio Preto, SP, Brasil

Quadro 4 – Técnica de recuperação antigênica e reação imunoistoquímica para os marcadores EGFR, VEGF e PDGFR- β

<i>Fase</i>	<i>Anti-EGFR*</i>	<i>Anti-VEGF**</i>	<i>Anti-PDGFR-β***</i>
Recuperação antigênica	Incubar as lâminas silanizadas contendo espécime em tampão citrato de sódio 10 mM pH 6,0, por 20 min, em panela a vapor a 60°C; deixar esfriar	Incubar as lâminas silanizadas contendo espécime em Tris/EDTA 1 mM pH 9,0, por 20 min, em panela a vapor a 60°C; deixar esfriar	Incubar as lâminas silanizadas contendo espécime em tampão citrato de sódio 10 mM pH 6,0, por 1 h, e tampão Tris/EDTA 1 mM pH 9,0, por 1 h, em panela a vapor a 60°C; deixar esfriar
Reação imunoistoquímica	Lavar com PBS TWEEN ⁶ e PBS ⁷ , pH 7,4, cinco vezes	Lavar com PBS TWEEN ⁶ e PBS ⁷ , pH 7,4, cinco vezes	Lavar com PBS TWEEN ⁶ e PBS ⁷ , pH 7,4, cinco vezes
	Bloquear a peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio ⁸ a 3%, diluído em PBS pH 7,4, por dois tempos de 10 min	Bloquear a peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio ⁸ a 3%, diluído em PBS pH 7,4, por dois tempos de 10 min	Bloquear a peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio ⁸ a 3%, diluído em PBS pH 7,4, por dois tempos de 10 min
	Lavar uma vez com PBS TWEEN e uma vez com PBS pH 7,4	Lavar uma vez com PBS TWEEN e uma vez com PBS pH 7,4	Lavar uma vez com PBS TWEEN e uma vez com PBS pH 7,4
	Bloquear possíveis marcações proteicas inespecíficas, imergindo as lâminas em solução de leite em pó desnatado a 5% em PBS pH 7,4, por 20 min	Bloquear possíveis marcações proteicas inespecíficas, imergindo as lâminas em solução de leite em pó desnatado a 5% em PBS pH 7,4, por 20 min	-
	Aspirar o excesso	Aspirar o excesso	-
	Marcar com anticorpo primário, anti-EGFR, na diluição de 1:200 em solução de BSA com PBS pH 7,4, por 20 min	Marcar com anticorpo primário, anti-VEGF, na diluição de 1:100 em solução de BSA com PBS pH 7,4, por 20 min	Marcar com anticorpo primário, anti-PDGFR- β , na diluição de 1:50 com diluente universal por 60 min
	Lavar com PBS TWEEN e PBS pH 7,4, por cinco vezes	Lavar com PBS TWEEN e PBS pH 7,4, por cinco vezes	Lavar com PBS TWEEN e PBS pH 7,4, por cinco vezes
	Adicionar anticorpo pós-primário, incubando por 30 min	Adicionar anticorpo pós-primário, incubando por 30 min	Adicionar anticorpo pós-primário, incubando por 30 min
	Lavar com PBS TWEEN e PBS pH 7,4 por cinco vezes	Lavar com PBS TWEEN e PBS pH 7,4 por cinco vezes	Aspirar excesso
	Adicionar anticorpo secundário e incubar por 30 min	Adicionar anticorpo secundário e incubar por 30 min	Adicionar anticorpo secundário e incubar por 30 min
	Lavar com PBS TWEEN e PBS pH 7,4 por cinco vezes	Lavar com PBS TWEEN e PBS pH 7,4 por cinco vezes	Lavar com PBS TWEEN e PBS pH 7,4 por cinco vezes
	Revelar com solução de diaminobenzidina (DAB ⁵) (50 μ l diluídos em 1ml de tampão DAB substrato ⁶) por 1 min	Revelar com solução de diaminobenzidina (DAB ⁷) (50 μ l diluídos em 1ml de tampão DAB substrato ⁸) por 1 min	Revelar com solução de diaminobenzidina (DAB ⁹) (50 μ l diluídos em 1ml de tampão DAB substrato ¹⁰) por 1 min
	Lavar com água destilada	Lavar com água destilada	Lavar com água destilada
	Corar com hematoxilina de Harris por 1 min	Corar com hematoxilina de Harris por 1 min	Corar com hematoxilina de Harris por 1 min

⁵ Sigma, St Louis, MO, EUA

⁶ Sigma, St Louis, MO, EUA

⁷ Sigma, St Louis, MO, EUA

⁸ Sigma, St Louis, MO, EUA

⁹ Sigma, St Louis, MO, EUA

¹⁰ Sigma, St Louis, MO, EUA

Fase	Anti-EGFR*	Anti-VEGF**	Anti-PDGFR- β***
	Lavar com água destilada	Lavar com água destilada	Lavar com água destilada
	Adicionar peróxido de hidrogênio a 0,3%	Adicionar peróxido de hidrogênio a 0,3%	Adicionar peróxido de hidrogênio a 0,3%
	Lavar com água destilada	Lavar com água destilada	Lavar com água destilada
	Desidratar em bateria de etanol (80%; 90%; absoluto) (10 mergulhos em cada bateria) + xilol (três baterias – 10 mergulhos em cada bateria)	Desidratar em bateria de etanol (80%; 90%; absoluto) (10 mergulhos em cada bateria) + xilol (três baterias – 10 mergulhos em cada bateria)	Desidratar em bateria de etanol (80%; 90%; absoluto) (10 mergulhos em cada bateria) + xilol (três baterias – 10 mergulhos em cada bateria)
	Montar lâminas em bálsamo do Canadá	Montar lâminas em bálsamo do Canadá	Montar lâminas em bálsamo do Canadá

Nota:

*Anti-EGFR: anticorpo monoclonal, clone SP9, Spring Bioscience, Pleasanton, CA.

** Anti-VEGF: anticorpo policlonal, Spring Bioscience, Pleasanton, CA.

*** Anti-PDGFR- β : anticorpo policlonal, Spring Bioscience, Pleasanton, CA.

3.6.3 Interpretação da imunoistoquímica

Para interpretação dos resultados da análise imunoistoquímica do EGFR, VEGF e PDGFR- β foram considerados negativos os tumores que apresentaram coloração ausente ou inferior a 10%. Os tumores positivos foram graduados em escores: + (1 - expressão mínima), ++ (2 - expressão moderada), +++ (3 - forte expressão) (Figura 3).

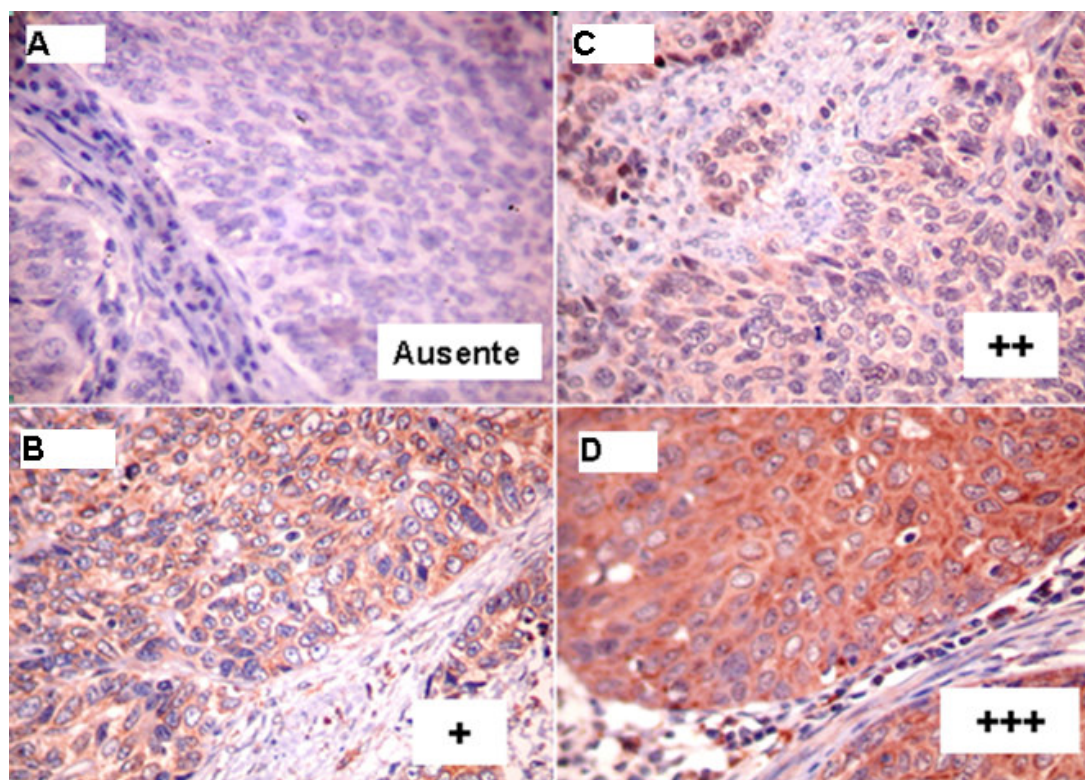


Figura 3 - Representação dos resultados das expressões das reações imunoistoquímicas, mostrando casos sem expressão (A), expressão fraca (B), expressão moderada (C) e forte expressão (D) ($\times 200$).

3.7 Método de análise de dados

Todos os dados histológicos e de imunoistoquímica foram registrados no formulário elaborado exclusivamente para coleta de dados da pesquisa (Apêndice A), sendo construído um banco de dados com o programa *Microsoft Excel*.

Com o programa *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) versão 17.0, foram calculadas as estatísticas: média, erro padrão da média, mediana e moda das variáveis quantitativas. As variáveis qualitativas foram expressas como distribuição de frequências absolutas e relativas. Para avaliar a homogeneidade do grupo microinvasivo em relação ao invasivo, foram utilizados o teste Qui-quadrado, teste exato de Fisher, teste t de Student ou teste de Mann-Whitney, considerando nível de significância de 0,05 para rejeição da hipótese nula, conforme a distribuição de frequência obedecesse às Regras de Cochran.

3.8 Considerações éticas

A Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, que regulamenta as diretrizes de pesquisa envolvendo seres humanos, foi seguida. No presente estudo, não foi necessário o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, pois as informações foram obtidas em blocos de parafina já arquivados. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE e registrado sob CAAE número 3353.0.000.172-10 (ANEXO F), sendo iniciada após a referida aprovação.

4.1 Artigo original

EXPRESSÃO DO FATOR DE CRESCIMENTO VASCULAR ENDOTELIAL, RECEPTOR BETA DO FATOR DE CRESCIMENTO DERIVADO DE PLAQUETAS E RECEPTOR DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO NO CÂNCER DE COLO UTERINO¹

Guacyra Magalhães PIRES², Ademar Afonso de AMORIM JÚNIOR³, Maria Julliana Galvão NUNES², Darley de Lima FERREIRA FILHO², Karlus LEITE MENDONÇA⁴

1 Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

2 Mestrando em Patologia do Programa de Pós-Graduação em Patologia da UFPE

3 Doutor em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres pela Universidade de São Paulo (USP)

4 Mestre em Neuropsiquiatria pela Universidade Federal de Pernambuco

RESUMO

Objetivos: avaliar a correlação entre as características histológicas e a expressão dos marcadores biológicos fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e receptor beta do fator de crescimento derivado de plaquetas no câncer de colo uterino. **Método:** revisão histológica e realização de imunoistoquímica com os marcadores anti-VEGF, anti-EGFR e anti-PDGFR- β no câncer de colo uterino. **Resultados:** média de idade de 46,74 anos. 6 (19,35%) tumores microinvasivos (margens livres e ausência de comprometimento linfovascular em 100% dos espécimes) e 25 (80,65%) tumores invasivos. Tumores invasivos predominaram como pouco diferenciados. Para EGFR, houve diferença significativa ($p=0,010$) entre expressão mínima e expressões moderada/forte, predominando menor expressão nos tumores microinvasivos e forte expressão nos tumores invasivos. Para PDGFR- β , identificou-se diferença significativa ($p=0,043$) na positividade, dado que tumores invasivos mais frequentemente expressavam positividade deste marcador. Tumores triplo positivo são significativamente mais frequentes em presença de invasão linfovascular e têm grau pouco diferenciado quando comparados aos tumores positivos apenas para EGFR e PDGFR- β . **Conclusão:** A positividade dos marcadores imunoistoquímicos, especialmente no grupo triplo positivo, sugere que há correlação com fatores de pior prognóstico. Demonstrada correlação entre o grau de expressão do EGFR e os tumores invasivos, bem como a positividade do PDGFR- β e os tumores invasivos. Os dados encontrados sugerem suporte para futuros estudos com uso de drogas alvo moleculares, com possibilidade de alterar o prognóstico das pacientes portadoras de câncer de colo uterino ou ajudar a separar as pacientes com tumores com pior prognóstico, que necessitem de uma abordagem terapêutica mais agressiva.

Descritores: fator de crescimento vascular endotelial; receptor do fator de crescimento epidérmico; receptor beta do fator de crescimento derivado de plaquetas; angiogênese; câncer de colo uterino; imunoistoquímica.

ABSTRACT

Objectives: To evaluate the correlation between histological features and expression of biological markers of vascular endothelial growth factor (VEGF) epidermal growth factor receptor (EGFR) and beta platelet-derived growth factor receptor in cancer of the cervix. **Method:** histology and immunohistochemistry with implementation of the markers anti-VEGF, anti-EGFR and anti-PDGFR- β cancer of the cervix. **Results:** mean age of 46.74 years. 6 (19.35%) microinvasive tumors (tumor-free margins and no lymphovascular involvement in 100% of specimens) and 25 (80.65%) invasive tumors. Invasive tumors predominated as poorly differentiated. For EGFR, significant difference ($p = 0.010$) between expression and minimal expressions moderate / strong, predominantly lower expression in microinvasive tumors and strong expression in invasive tumors. In PDGFR- β , identified a significant difference ($p = 0.043$) in the order to PDGFR- positive, given that more often invasive tumors expressed positivity of this marker. Triple positive tumors are significantly more frequent in the presence of lymphovascular invasion and have poorly differentiated tumors degree compared to only positive for EGFR and PDGFR- β . **Conclusion:** The positivity of immunohistochemical markers, especially in triple-positive group, suggests that there are factors correlated with poor prognosis. Demonstrated a correlation between the degree of EGFR expression and invasive tumors, as well as positive PDGFR- β and invasive tumors. The results suggest support for future studies with molecular targeted drugs, with the possibility to change the prognosis of patients with cervical cancer or help to separate the patients with tumors with poor prognosis, requiring a more aggressive therapeutic approach.

Keywords: vascular endothelial growth factor, epidermal growth factor receptor, beta platelet-derived growth factor receptor, angiogenesis, cancer of the cervix; immunohistochemistry.

INTRODUÇÃO

Para o Brasil, no ano de 2012, esperam-se 17.540 casos novos de câncer do colo do útero, sendo considerado um importante problema de saúde pública no mundo (BRASIL, 2011). É a terceira causa de morte em mulheres no mundo (PARKIN *et al.* 2005; KAMANGAR; DORES; ANDERSON, 2006), 78% dos casos ocorrem em países em desenvolvimento, onde é a segunda causa mais frequente de morte em mulheres (NCCN, 2012). O estadiamento representa o fator prognóstico mais importante no carcinoma invasor do colo uterino, refletindo sua disseminação local e à distância (DENNY *et al.*, 2006; QUINN *et al.*, 2006; THULER, 2008).

Os receptores de membrana com atividade intrínseca de tirosina quinase controlam funções celulares de especial interesse para a oncologia, como proliferação e diferenciação celular (GSCHWIND; FISCHER; ULLRICH, 2004), através da ativação de vias

intracelulares de transdução de sinal (GSCHWIND; FISCHER; ULLRICH, 2004). O processo neoplásico acompanha-se de aumento da expressão gênica ou proteica desses receptores que passam a ser classificados como oncogenes, ou seja, como moléculas com capacidade de promover a mutação de células normais a células neoplásicas, com maior capacidade de resistência à hipóxia e ao estresse oxidativo, portanto resistentes à apoptose (LEVITZKI, 2002; JAYSHREE *et al.*, 2009). Tais receptores se relacionam com o crescimento tumoral, na medida em que as células tumorais se reproduzem, passam a necessitar de suprimento de nutrientes maior e mais rápido, já que o consumo proteico está exacerbado (RAK *et al.*, 2002).

A angiogênese, processo de formação de novos vasos sanguíneos, desempenha um papel crucial em muitas condições normais e patológicas (RAICA; CIMPEAN, 2010), sendo essencial ao crescimento tumoral, facilita também o acesso das células tumorais à corrente circulatória, promovendo metástases (KANDA *et al.*, 2005, SOUFLA *et al.*, 2005).

Essas evidências promoveram a busca de melhor compreensão da ação dos receptores de membrana de tirosina quinase, quer como alvo de terapia antineoplásica, quer como marcadores biológicos do processo neoplásico, admitindo que possam auxiliar no diagnóstico, bem como em tratamentos mais específicos e com melhores resultados.

OBJETIVOS

Identificar as características histopatológicas de amostras de pacientes com câncer de colo uterino; verificar a expressão e o grau de expressão dos marcadores imunoistoquímicos VEGF (fator de crescimento vascular endotelial), PDGFR- β (receptor do fator β de crescimento derivado de plaquetas) e EGFR (receptor do fator de crescimento epidérmico); descrever a associação entre as características histopatológicas e o perfil imunoistoquímico.

MATERIAL E MÉTODO

Foram estudados 31 blocos de parafinas de espécimes exclusivos de carcinomas de colo uterino obtidos unicamente por histerectomia e arquivados no período de janeiro de 2006 a junho de 2011 no Laboratório Romualdo Lins, Caruaru (Pernambuco). Coleta de dados realizada de setembro de 2010 a junho de 2011. Excluídos: espécimes obtidos por biópsia ou

conização; os que foram cedidos para revisão em outro laboratório e não devolvidos; insuficiência de material ou presença de desgaste comprometendo a realização de revisão histológica, bem como a realização da imunoistoquímica para os marcadores biológicos propostos. A amostra usada no estudo foi o total encontrado.

O estudo foi do tipo transversal, retrospectivo. Obedecidos os critérios classificatórios da Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia de 2010 (EDGE *et al*, 2010). A categorização das variáveis está exposta no Quadro 1.

Quadro 1 – Categorização das variáveis de estudo

<i>Variáveis</i>	<i>Categorização</i>
Idade	Menor ou igual a 45 anos e maior que 45 anos
Tipo histológico	Escamoso, adenocarcinoma, adenoescamoso
Tamanho do tumor	Aferição em milímetros (mm)
Grau histológico	Grau 1 (bem diferenciado) Grau 2 (moderadamente diferenciado) Grau 3 (pouco diferenciado)
Margens cirúrgicas	Livres ou comprometidas
Invasão linfovascular	Presente ou ausente
Estadiamento patológico	Microinvasivo – com profundidade da invasão estromal menor ou igual a 5 mm ou extensão horizontal menor ou igual a 7 mm Invasivo - com profundidade da invasão estromal maior que 5 mm ou extensão horizontal maior que 7 mm
Status linfonodal	Negativo ou positivo, especificando o número de linfonodos comprometidos
Reação imunoistoquímica para os marcadores VEGF, PDGFR- β , EGFR	Negativo Positivo, segundo os graus de expressão: 1 – mínima; 2 – moderada, 3 – forte expressão

Todos os espécimes, previamente fixados em solução aquosa de formol 10% e incluídos em parafina, foram localizados, seccionados na espessura de três μ m. Foram montados em lâminas histológicas, submetidos à coloração com hematoxilina-eosina (HE). Cada lâmina foi submetida à revisão histopatológica por dois patologistas, desconhecedores do diagnóstico constante do arquivo, para que firmassem, de forma independente, diagnóstico de câncer de colo uterino, empregando microscópio óptico para avaliar as variáveis propostas (Quadro 1).

Novos cortes histológicos foram feitos e colocados em lâminas silanizadas, por 12 horas em estufa a 60°C, para pesquisa imunoistoquímica dos marcadores biológicos VEGF, PDGFR- β e EGFR; cortes desparafinados em banho de xilol¹ por dois a três minutos (dois banhos, trocando o xilol); retirado o excesso; hidratação em soluções decrescentes de álcool² (retirado excesso e mergulho em xilol 1:1 em etanol absoluto, por três minutos; o mesmo em

¹ Miyako do Brasil – indústria e comércio LTDA, Guarulhos, SP, Brasil

² Indústria Farmacêutica Bioquímica LTDA, São José do Rio Preto, SP, Brasil

etanol absoluto por dois a três minutos; em etanol a 95% por três minutos; em etanol a 70% por três minutos; em etanol a 50% por três minutos; lavagem gentil com água destilada corrente por 30 segundos).

A recuperação antigênica e reação imunoistoquímica foram realizadas empregando técnica própria a cada marcador, conforme Quadro 2.

Quadro 2 – Técnica de recuperação antigênica e reação imunoistoquímica para os marcadores EGFR, VEGF e PDGFR- β

<i>Fase</i>	<i>Anti-EGFR</i>	<i>Anti-VEGF</i>	<i>Anti-PDGFR-β</i>
Recuperação antigênica	Incubar as lâminas silanizadas contendo espécime em tampão citrato de sódio 10 mM pH 6,0, por 20 min, em panela a vapor a 60°C; deixar esfriar	Incubar as lâminas silanizadas contendo espécime em Tris/EDTA 1 mM pH 9,0, por 20 min, em panela a vapor a 60°C; deixar esfriar	Incubar as lâminas silanizadas contendo espécime em tampão citrato de sódio 10 mM pH 6,0, por 1 h, e tampão Tris/EDTA 1 mM pH 9,0, por 1 h, em panela a vapor a 60°C; deixar esfriar
Reação imunoistoquímica	Em conformidade com a bula do anti-EGFR (anticorpo monoclonal, clone SP9), Spring, Bioscience, Pleasanton, CA.	Em conformidade com a bula do anti-VEGF (anticorpo policlonal), Spring, Bioscience, Pleasanton, CA.	Em conformidade com a bula do anti-PDGFR- β (anticorpo policlonal), Spring, Bioscience, Pleasanton, CA.

Para interpretação dos resultados da análise imunoistoquímica do EGFR, VEGF e PDGFR- β foram considerados negativos os tumores que apresentaram coloração ausente ou inferior a 10%. Os tumores positivos foram graduados em escores: + (1 - expressão mínima), ++ (2 - expressão moderada), +++ (3 - forte expressão).

Todos os dados histológicos e de imunoistoquímica foram registrados no formulário elaborado exclusivamente para coleta de dados da pesquisa, sendo construído banco de dados com o programa *Microsoft Excel*. Com o programa *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) versão 17.0, foram calculadas as estatísticas. As variáveis qualitativas foram expressas como distribuição de frequências absolutas e relativas. Para avaliar a homogeneidade do grupo microinvasivo em relação ao invasivo, foram utilizados o teste Qui-quadrado, teste exato de Fisher, teste t de Student ou teste de Mann-Whitney, considerando nível de significância de 0,05 para rejeição da hipótese nula, conforme a distribuição de frequência obedecesse às Regras de Cochran.

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Federal de Pernambuco e registrado sob CAAE número

3353.0.000.172-10, sendo iniciada após a referida aprovação.

RESULTADOS

Foram analisados 31 espécimes de câncer de colo uterino, nos quais foi diagnosticado carcinoma epidermóide em todos os casos, obtidos por histerectomia realizada em pacientes com média de idade igual a $46,74 \pm 2,14$ anos, mediana igual a 46 anos, moda igual a 40 anos e variação entre 32 e 76 anos.

Só houve dissecação linfonodal em apenas um caso, cuja análise revelou comprometimento neoplásico. Foram diagnosticados 6 (19,35%) tumores microinvasivos e 25 (80,65%) tumores invasivos. Os tumores microinvasivos se caracterizaram por margens livres e ausência de comprometimento linfovascular em 100% dos espécimes, diferindo dos tumores invasivos, onde 18 (72%) tinham margens livres e 19 (76%), ausência de invasão linfovascular. Esses tumores diferiram quanto à idade da paciente e grau histológico, visto que os tumores invasivos predominaram em pacientes com mais de 45 anos de idade e eram pouco diferenciados, sendo esta última, a única diferença com significância estatística, quando comparada à incidência de tumores microinvasivos, moderadamente diferenciados (Tabela 1).

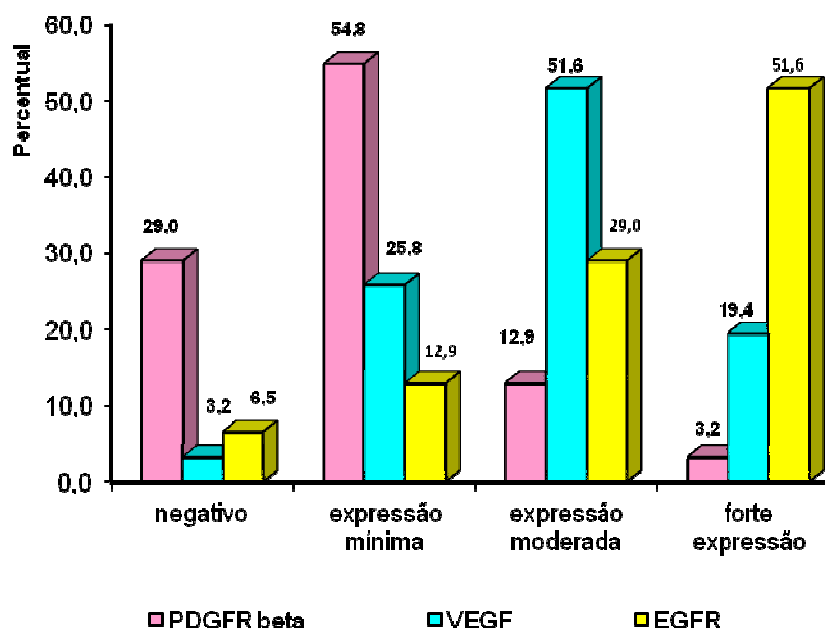
Tabela 1 – Comparação entre as características dos tumores microinvasivos e invasivos em relação às variáveis idade, grau histológico, margens cirúrgicas e invasão linfovascular – Caruaru, 2010-2011

Variáveis	Invasão Tumoral				Valor de p*
	Microinvasivo		Invasivo		
	N	%	N	%	
Idade (anos)					0,295
≤ 45	4	66,67	11	44,00	
> 45	2	33,33	14	56,00	
Grau histológico	6	19,35	25	80,65	0,004**
Bem diferenciado	1	16,67	1	4,00	
Moderadamente diferenciado	5	83,33	6	24,00	
Pouco diferenciado	-	-	18	72,00	
Margens cirúrgicas					0,183
Livres	6	100,00	18	72,00	
Comprometidas	-	-	7	28,00	
Invasão linfovascular					0,241
Presente	-	-	6	24,00	
Ausente	6	100,00	19	76,00	

Notas: *valores de p calculados com o teste exato de Fisher
diferenciado e os graus moderadamente e pouco diferenciado

**valor de p para comparação entre o grau histológico bem

Gráfico 1 – Distribuição dos resultados das reações imunoistoquímicas de 31 espécimes para os marcadores PDGFR- β , VEGF e EGFR – Caruaru, 2010-2011



No Gráfico 1, estão representados os resultados da análise imunoistoquímica dos tumores para os marcadores PDGFR- β , VEGF e EGFR. Observa-se que, comparativamente, os tumores mais frequentemente foram negativos para o marcador PDGFR- β e positivos para o VEGF. Em relação ao grau de positividade, predominaram tumores com expressão mínima do PDGFR- β , decrescendo as expressões moderada e forte, diferindo dos outros dois marcadores. Para o VEGF, os tumores mais frequentemente tiveram expressão moderada e para o EGFR, expressão forte. Todas essas diferenças alcançaram significância estatística e estão expressas no Gráfico 1 e na Tabela 2.

Tabela 2 – Distribuição dos graus de expressão de reação imunoistoquímica de 31 espécimes para os marcadores – Caruaru, 2010-2011

<i>Graus de expressão da reação imunoistoquímica</i>	<i>Marcadores</i>			<i>Valor de p*</i>
	<i>VEGF</i> (N=30)	<i>PDGFR-β</i> (N=22)	<i>EGFR</i> (N=29)	
Expressão mínima (n; %)	8 (25,80%)	17 (54,80%)	4 (12,90%)	0,006
Expressão moderada (n; %)	16 (51,6%)	4 (12,90%)	9 (29,00%)	0,017
Forte expressão (n; %)	6 (19,40%)	1 (3,20%)	16 (51,60%)	< 0,001

Nota: * - Valor de p calculado pelo teste t de Student, para diferença de proporções.

Para detalhar essa análise, buscou-se apresentar os resultados das reações imunoistoquímicas dos três marcadores, separando em dois grupos, tumores microinvasivos e tumores invasivos, conforme apresentado na Tabela 3. Ao comparar a positividade dos marcadores, constatou-se ausência de diferença entre os tumores microinvasivos e invasivos para negatividade de VEGF ($p=0,194$) e EGFR ($p=0,355$). Ao comparar a intensidade de expressão do VEGF, também não se verificou diferença significativa entre os tumores microinvasivos e invasivos, dado que houve predomínio de expressão moderada para ambos os tipos. Para o marcador EGFR, houve diferença significativa ($p=0,010$) entre a expressão mínima e as expressões moderada/forte, predominando a menor expressão nos tumores microinvasivos e a forte expressão nos tumores invasivos.

Para o marcador PDGFR- β , identificou-se diferença significativa ($p=0,043$) na positividade, dado que os tumores invasivos mais frequentemente expressavam positividade deste marcador. Apesar disso, não se verificou diferença significativa na intensidade da marcação imunoistoquímica, porque predominou expressão mínima nos dois grupos, tumores microinvasivos e tumores invasivos. Mesmo assim, deve-se ressaltar que apenas os tumores invasivos apresentaram positividade moderada ou forte para este marcador (Tabela 3).

Tabela 3 – Distribuição dos graus de expressão da reação imunoistoquímica para os marcadores entre os tumores microinvasivos e invasivos de câncer de colo uterino entre 31 espécimes – Caruaru, 2010-2011

Tumores microinvasivos e invasivos de câncer de colo uterino entre 51 espécimes - Curitiba, 2010-2011					
Variáveis	Invasão Tumoral				Valor de p*
	Microinvasivo		Invasivo		
	N	%	N	%	
Imunoistoquímica de VEGF					0,194
Negativa	1	16,67	-	-	
Positiva	5	83,33	25	100,00	0,404
Expressão mínima	2	40,00	6	24,00	
Expressão moderada	3	60,00	13	52,00	
Forte expressão	-	-	6	24,00	
Imunoistoquímica de PDGFR-β					0,043
Negativa	4	66,67	5	20,00	
Positiva	2	33,33	20	80,00	
Expressão mínima	2	100,00	15	75,00	
Expressão moderada	-	-	4	20,00	
Forte expressão	-	-	1	5,00	
Imunoistoquímica de EGFR					0,355
Negativa	1	16,67	1	4,00	
Positiva	5	83,33	24	96,00	
Expressão mínima	3	60,00	1	4,17	0,010**
Expressão moderada	1	20,00	8	33,33	
Forte expressão	1	20,00	15	62,50	

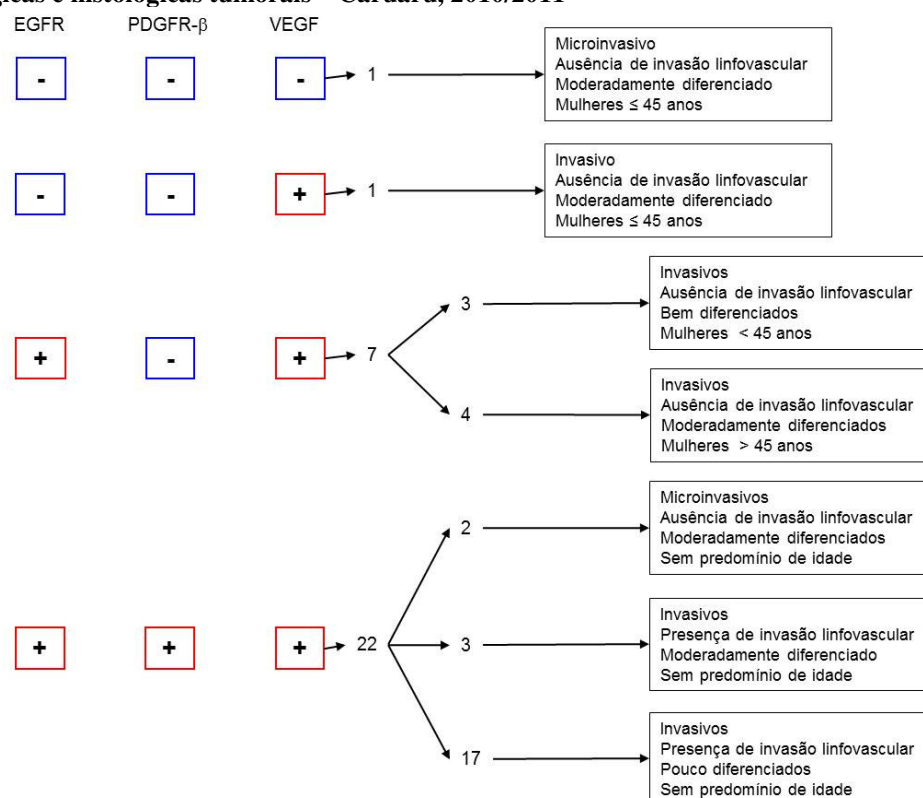
Nota: * valores de p calculados com o teste exato de Fisher. ** valor de p de comparação entre expressão mínima e expressão moderada ou forte

Na Figura 1, observam-se as características histopatológicas dos tumores, segundo resultados conjuntos da reação imunoistoquímica dos três marcadores biológicos estudados (EGFR, VEGF, PDGFR- β), avaliando também a idade das pacientes. Um único caso (3,22%) do grupo dos tumores microinvasivos, moderadamente diferenciado, com ausência de invasão linfovascular, foi negativo para os três marcadores e acometeu mulher com menos de 45 anos de idade. Em um caso (3,22%), positivo apenas para VEGF, do tipo invasivo, moderadamente diferenciado, com ausência de invasão linfovascular, foi diagnosticado em mulher com menos de 45 anos de idade.

Em 29 casos (93,55%), a positividade para o marcador EGFR associou-se à do VEGF, dos quais sete (24,14%) eram negativos para PDGFR- β , invasivos e com ausência de invasão linfovascular. Em três mulheres com menos de 45 anos de idade, os tumores se caracterizavam como bem diferenciados, tendo outros quatro moderadamente diferenciados acometido mulheres com mais de 45 anos de idade.

Dentre os 22 tumores triplo positivo, 20 (90,91%) eram invasivos, predominantemente pouco diferenciados, apresentavam invasão linfovascular, e foram diagnosticados igualmente em mulheres mais jovens e com mais de 45 anos de idade.

Figura 1 – Distribuição de 31 espécimes segundo reações imunoistoquímicas e características epidemiológicas e histológicas tumorais – Caruaru, 2010/2011



Na Tabela 4, são apresentados os resultados dos testes de significância dessas distribuições, na qual se observa que os tumores triplo positivo são significativamente mais frequentes em presença de invasão linfovascular e têm grau pouco diferenciado quando comparados aos tumores positivos apenas para EGFR e VEGF.

Tabela 4 – Distribuição das características tumorais segundo positividade dos marcadores biológicos (EGFR, VEGF, PDGFR- β) – Caruaru, 2010-2011

<i>Características tumorais</i>	<i>Imunoistoquímica</i>		<i>Valor de p*</i>
	<i>EGFR + VEGF + PDGFR- β -</i>	<i>EGFR + VEGF + PDGFR- β +</i>	
Invasão Tumoral			0,569
Microinvasivo	-	2 (9,19)	
Invasivo	7 (100,00)	20 (90,91)	
Grau histológico			0,014**
Bem diferenciado	3 (42,86)	-	
Moderadamente diferenciado	4 (57,14)	6 (27,27)	
Pouco diferenciado	-	16 (72,72)	
Idade (anos)			0,626
≤ 45	3 (42,86)	10 (45,45)	
> 45	4 (57,14)	12 (54,55)	
Invasão linfovascular			< 0,001
Presente	-	20 (90,91)	
Ausente	7 (100,00)	2 (9,19)	

Notas: *valores de p calculados com o teste exato de Fisher **valor de p para comparação entre grau histológico moderadamente e pouco diferenciado

DISCUSSÃO

A idade média de acometimento das pacientes pelo câncer de colo uterino em nosso estudo foi compatível com a literatura que relata pico de incidência na faixa etária de 45-49 anos (MENDONÇA *et al.*, 2008). O tipo histológico epidermóide foi encontrado em 100% dos espécimes estudados, habitualmente a incidência gira em torno de 80-90% para o tipo histológico epidermóide e em 10% para o adenocarcinoma (PECORELLI, 2001).

Existem fatores locais associados a pior prognóstico, tais como o grau de invasão estromal, a presença de invasão linfovascular e o grau histológico do tumor (DELGADO *et al.*, 1990; RAJU; KJORSTAD; ABELER, 1991). Em nosso estudo, verificou-se que os tumores microinvasivos tiveram ausência de invasão linfovascular em 100% dos casos e foram predominantemente moderadamente diferenciados (83,33%), esta última característica encontrada, com significância estatística ($p=0,004$), portanto demonstrando características de doença com melhor prognóstico. Os achados dos tumores invasivos demonstraram

características de pior prognóstico, tais como predominância de tumores pouco diferenciados e com presença de invasão linfovascular em 24% dos casos, demonstrando um perfil mais agressivo.

O VEGF, principal envolvido no fenômeno da angiogênese tumoral, teve sua expressão positiva em 30 espécimes, dos 31 estudados (96,1%), sendo predominante a moderada expressão (51,6%). A positividade para o VEGF em nosso estudo foi superior ao relatado na literatura (TJALMA *et al.*, 2000; LEE *et al.*, 2002; RYU *et al.*, 2003; KANG; HONG, 2004; HAMMES *et al.*, 2008; HELLBERG; TOT; STENDAHL, 2009), podendo sugerir característica própria dos tumores nas pacientes de nossa região. Não houve diferença significativa entre os grupos de tumores microinvasivos e invasivos em relação à negatividade do VEGF e EGFR, bem como em relação aos graus de expressão encontrados para o marcador VEGF. O VEGF é encontrado amplamente em tecidos sãos, participando tanto de processos fisiológicos quanto patológicos, e de nosso interesse, dos processos neoplásicos. A angiogênese é fundamental para o crescimento tumoral e progressão da doença (RAK *et al.*, 2002). O VEGF e seus receptores são conhecidos por terem funções importantes na regulação da angiogênese tumoral (FOLKMAN, 1971; FERRARA, 2002). Mathur *et al.* (2005) sugerem em estudo que os níveis de VEGF-C estão especificamente aumentados na doença cervical avançada. A hiperexpressão do VEGF tem sido associada com a progressão tumoral e um pior prognóstico em diversos tumores (HICKLIN; ELLIS, 2006).

A expressão do EGFR mostrou diferença significativa ($p=0,010$) entre a expressão mínima e a expressão moderada/forte, com predomínio de menor expressão para os tumores microinvasivos e a forte para os tumores invasivos, sugerindo que tumores mais avançados expressem mais fortemente o marcador, implicando em pior prognóstico. A hiperexpressão do EGFR foi associada com comprometimento no prognóstico em relação à sobrevida livre de progressão e à sobrevida global (KIM; PARK; KIM, 2002), como também um fator preditor para pior prognóstico em paciente com estadios iniciais (Estadios I e II) (KERSEMAEKERS *et al.* 1999). A expressão aumentada do EGFR já foi relacionada com tumores mais radiosensíveis (LAGRANGE *et al.*, 1993), porém ainda existe controvérsia, pois há também demonstração de resposta pobre ao tratamento de quimiorradioterapia em tumores com expressão elevada do EGFR (NOORDHUIS *et al.*, 2009).

A positividade para o PDGFR- β mostrou diferença significativa ($p=0.043$), com os tumores invasivos demonstrando mais frequentemente essa positividade, sendo que apenas os

tumores invasivos demonstraram positividade moderada ou forte. Vários estudos relacionam a expressão desse marcador com pior prognóstico e doença mais avançada.

Houve correlação com pior prognóstico para aqueles espécimes que mostraram positividade para os três marcadores biológicos (EGFR, VEGF e PDGFR- β), onde foi demonstrada diferença significativa para graus histológicos menos diferenciados ($p=0.014$), bem como para a presença de invasão linfovascular ($p<0.001$).

CONCLUSÃO

Apesar da escassez de estudos que analisam o perfil imunoistoquímico do câncer de colo uterino, há dados na literatura que corroboram com achados de nossa pesquisa. A positividade dos marcadores imunoistoquímicos, especialmente no grupo triplo positivo, sugere que há correlação com fatores de pior prognóstico. Demonstrada correlação entre o grau de expressão do EGFR e os tumores invasivos, bem como a positividade do PDGFR- β e os tumores invasivos. Os dados encontrados sugerem suporte para futuros estudos com uso de drogas alvo moleculares, com possibilidade de alterar o prognóstico das pacientes portadoras de câncer de colo uterino ou ajudar a separar as pacientes com tumores com pior prognóstico, que necessitem de uma abordagem terapêutica mais agressiva.

Declaração de conflitos de interesse:

Os autores não têm conflitos de interesse a declarar.

REFERÊNCIAS

1. BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil. INCA: Rio de Janeiro, p. 35-37, 2011. 53p. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf>> Acesso em: 27 jan. 2012.
2. DELGADO, G. *et al.* Prospective surgicalpathological study of diseasefree interval in patients with stage IB squamous cell carcinoma of the cervix: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol*, v. 38, p. 352-357, 1990.
3. DENNY, L. *et al.* Staging classifications and clinical practice guidelines for gynaecologic cancers [Internet]. London: International Federation of Gynecology and Obstetrics. Committee on Gynecologic Oncology; 2006 [cited 2009 Jul 19]. Disponível em: <http://www.wvcancerregistry.org/Portals/27/PDFs/staging_booklet_fig0.pdf>. Acesso em: 28 mar. 2010.

4. EDGE, S.B. et al. *AJCC Cancer Staging Manual*, 7th ed. New York, NY, USA: Springer, 2010. p. 395-402.
5. FERRARA, N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer*, v. 2, p. 795–803, 2002.
6. FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*, v. 285, p. 1182–1186, 1971.
7. GSCHWIND, A.; FISCHER, O.M.; ULLRICH, A. The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, v. 4, p. 361-370, May, 2004.
8. HAMMES, LS *et al.* Up-regulation of VEGF, c-fms and COX-2 expression correlates with severity of cervical cancer precursor (CIN) lesions and invasive disease, *Gynecol Oncol*, v. 110, n. 3, p. 445-451, 2008.
9. HELLBERG, D.; TOT, T.; STENDAHL, U. Pitfalls in immunohistochemical validation of tumor marker expression—exemplified in invasive cancer of the uterine cervix, *Gynecol Oncol*, v. 112, n. 1, p. 235-240, 2009.
10. HICKLIN, D.J.; ELLIS, L.M. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol*, v. 23, p. 1011-1027, 2006.
11. JAYSHREE, R.S. *et al.* Cell intrinsic & extrinsic factors in cervical carcinogenesis. *Indian J Med Res*, v. 130, p. 286-295, 2009.
12. KAMANGAR, F.; DORES, G.M.; ANDERSON, W.F. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *J Clin Oncol*, v. 24, p. 2137-2150, 2006.
13. KANDA, K. *et al.* Transcriptional expression of the genes implicated in angiogenesis and tumor invasion in cervical carcinomas. *Gynecol Oncol*, v. 98, p. 453-461, 2005.
14. KANG, J.O.; HONG, S.E. The prognostic effect of VEGF expression in squamous cell carcinoma of the cervix treated with radiation therapy alone, *J Korean Med Sci*, v. 19, n. 5, p. 693-697, 2004.
15. KERSEMAEKERS, A.M. *et al.* Oncogene alterations in carcinomas of the uterine cervix: overexpression of the epidermal growth factor receptor is associated with poor prognosis. *Clin Cancer Res*, v. 5, p. 577-586, 1999.
16. KIM, Y.T.; PARK, S.W.; KIM, J.W. Correlation between expression of EGFR and the prognosis of patients with cervical carcinoma. *Gynecol Oncol*, v. 87, p. 84-89, 2002.
17. LAGRANGE, J.L. *et.* Demonstration and characterization of EGF receptors in cancer of the uterine cervix. *Bull Cancer*, v. 80, n. 3, p. 219-224, Mar., 1993.
18. LEE, J.S. *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor in adenocarcinomas of the uterine cervix and its relation to angiogenesis and p53 and c-erbB-2 protein expression, *Gynecol Oncol*, v. 85, n. 3, p. 469-475, 2002.
19. LEVITZKI, A. Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *Eur J Cancer*, v. 38 (suppl. 5), p. 11-18, 2002.
20. MATHUR, S.P. *et al.* Serum vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) as a specific biomarker for advanced cervical cancer: Relationship to insulin-like growth factor II (IGF-II), IGF binding protein 3 (IGF-BP3) and VEGF-B, *Gynecol Oncol*, v. 98, p. 467-483, 2005.
21. MENDONÇA, V.G. *et al.* Mortalidade por câncer do colo do útero: características sociodemográficas das mulheres residentes na cidade de Recife, Pernambuco. *Rev Bras Ginecol Obstet*, v. 30, n. 5, p. 248-255, 2008.

22. NACIONAL COMPREHENSIVE CANCER NETWORK (NCCN). Clinical Practice Guidelines in Oncology. Cervical Cancer. Version 1.2012. p. 24, 2012. 48p. Disponível em: http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/cervical.pdf. Acesso em: 27 jan. 2012.
23. NOORDHUIS, M.G. *et al.* Expression of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) and Activated EGFR Predict Poor Response to (Chemo)radiation and Survival in Cervical Cancer. *Clin Cancer Res*, v. 15, n. 23, p. 7389-7397, Dec. 1, 2009.
24. PARKIN, D.M. *et al.* Global cancer statistics, 2002. *Cancer J Clin*, v. 55, n. 2, p. 74-108, 2005.
25. PECORELLI, S, editor. FIGO annual report on the results of treatment in gynaecological cancer. *J Epidemiol Biostat*, v. 6, p. 1-184, 2001.
26. QUINN, M.A. *et al.* Carcinoma of the cervix uteri. FIGO 6th Annual Report on the Results of Treatment in Gynecological Cancer. *Int J Gynaecol Obstet*, v. 95, (suppl. 1), p. S43-103, 2006.
27. RAICA, M.; CIMPEAN, A.M. Platelet-derived growth factor (PDGF)/PDGF receptors (PDGFR) axis as target for antitumor and antiangiogenic therapy. *Pharmaceuticals*, v. 4, p. 572-599, 2010.
28. RAK, J. *et al.* What do onco genic mutations have to do with angiogenesis/vascular dependence of tumors? *Cancer Res*, v. 62, p. 1931-1934, 2002.
29. RAJU, K.; KJORSTAD, K.E.; ABELER, V. Prognostic factors in the treatment of stage IB adenocarcinoma of the cervix. *Int J Gynaecol Obstet*, v. 1, p. 69-74, 1991.
30. RYU, S.Y. *et al.* Platelet-derived endothelial cell growth factor as a prognostic factor for radiotherapy outcome in patients with adenocarcinoma of the uterine cervix, *Gynecol Oncol*, v. 89, n. 3, p. 414-419, 2003.
31. SOUFLA, G. *et al.* VEGF, FGF2, TGFB1 and TGFBR1 mRNA expression levels correlate with the malignant transformation of the uterine cervix. *Cancer Letters*, v. 221, p. 105-118, 2005.
32. TJALMA, W. *et al.* The association between vascular endothelial growth factor, microvessel density and clinicopathological features in invasive cervical cancer, *Eur J Obstet Gynecol Reprod Bio*, v. 92, n. 2, p. 251-257, 2000.
33. THULER, L.C.S. Mortalidade por câncer do colo do útero no Brasil. *Rev Bras Ginecol Obstet*, v. 30, n. 5, p. 216-218, 2008.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

5.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com a *revisão sistemática* da literatura, pode-se concluir que:

- Ainda há escassos estudos que envolvam a expressão imunoistoquímica do VEGF no câncer de colo uterino;
- A maioria dos estudos considera a expressão do VEGF como um fator prognóstico para o câncer de colo uterino;
- Há estudos que demonstram não haver correlação entre a expressão do VEGF e a idade, subtipo histológico, grau histológico e controle local da doença;
- Há necessidade de realização de novos com uma amostragem maior, com avaliação individualizada por estadiamento, por modalidade terapêutica utilizada, maior número de estudos em países em desenvolvimento;
- Demonstração da necessidade de padronização dos resultados de imunoistoquímica para comparação entre estudos.

Neste estudo, considerando os *resultados obtidos*, pode-se concluir que:

- Escassos estudos que envolvam a expressão imunoistoquímica do VEGF, EGFR, PDGFR- β no câncer de colo uterino;
- A positividade dos marcadores imunoistoquímicos, especialmente no grupo triplo positivo, sugere que há correlação com fatores de pior prognóstico.
- Demonstrada correlação entre o grau de expressão do marcador EGFR e os tumores invasivos;
- Verificada correlação entre a positividade do PDGFR- β e tumores invasivos;
- Os dados encontrados sugerem suporte para futuros estudos com uso de drogas alvo moleculares, com possibilidade de alterar o prognóstico das pacientes portadoras de câncer de colo uterino;

- O presente estudo ajuda a preencher uma lacuna do conhecimento pelo uso ainda extremamente infrequente da imunoistoquímica para o câncer de colo uterino, especialmente, pelos marcadores propostos para o estudo.

REFERÊNCIAS

1. AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer facts & figures 2011. Atlanta: American Cancer Society, p. 4, 2011. Disponível em: <<http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveillance/documents/document/acspc-029771.pdf>> Acesso em: 26 abr.2011
2. APPLEBY, P. et al. International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer. Carcinoma of the cervix and tobacco smoking: collaborative reanalysis of individual data on 13,541 women with carcinoma of the cervix and 23,017 women without carcinoma of the cervix from 23 epidemiological studies. *Int. J. Cancer*, v. 118, n. 6, p. 1481-1495, 2006.
3. BOSCH, F.X et al. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J. Clin. Pathol.*, v. 55, p. 244-265, 2002.
4. BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Bases Técnicas para Autorização de Procedimentos de Alta Complexidade - APAC - Oncologia. Rio de Janeiro, p. 26, 2003. 53p. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/publicacoes/Manual_APAC_setembro_2003.pdf> Acesso em: 26 abr. 2011.
5. BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, p. 32-34, 2009. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/index.asp?link=conteudo_view.asp&ID=5> Acesso em: 28 mar. 2010.
6. BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil. INCA: Rio de Janeiro, p. 35-37, 2011. 53p. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf>> Acesso em: 27 jan. 2012.
7. BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. *TNM: classificação de tumores malignos*. Tradução de Ana Lúcia Amaral Eisenberg. 6ª ed. Rio de Janeiro: Gráfica ESDEVA, p. 160-164, 2004. 281p.
8. BRAY, F. et al. Trends in Cervical Squamous Cell Carcinoma Incidence in 13 European Countries: Changing Risk and the Effects of Screening. *Cancer. Epidemiol. Biomarkers Prev.*, v. 14, n. 3, p. 677-686, Mar., 2005.
9. BRESLIN, J.W. et al. Vascular endothelial growth factor-C stimulates the lymphatic pump by a VEGF receptor-3-dependent mechanism. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, v. 293, p. 709-718, 2007.

10. BRITO, N.M.B.; VIANA, W.O.; PEREIRA, P.C. Carcinoma espinocelular moderadamente diferenciado em paciente sem fatores de risco para a doença. *Rev. Paraense Med.*, v.21, n. 1, p. 43-46, jan.-mar., 2007.
11. CARMELIET, P. Angiogenesis in health and disease. *Nat. Med.*, v. 9, p. 653, 2003.
12. CARNEY, W.P. Circulating oncoproteins HER/neu, EGFR and CAIX (MN) as novel cancer biomarkers. *Expert Rev. Mol. Diagn.*, v. 7, n. 3, p. 309-319, 2007.
13. CHAN, J.K. Advances in Immunohistochemistry: impact on surgical pathology practice. *Semin. Diagn. Pathol.*, v. 17, n. 3, p. 170-177, Aug., 2000.
14. CHAVEZ-BLANCO, A. et al. HER2 expression in cervical cancer as a potential therapeutic target. *B.M.C. Cancer*, v. 4, p. 59, Sept. 1, 2004.
15. CHOI, C.H. et al. Prognostic significance of VEGF expression in patients with bulky cervical carcinoma undergoing neoadjuvant chemotherapy. *B.M.C. Cancer*, v. 8, p. 295-301, 2008.
16. CHUNG, A.S.; LEE, J.; FERRARA, N. Targeting the tumour vasculature: insights from physiological angiogenesis. *Nat. Rev. Cancer*, v. 10, p. 505-514, 2010.
17. CIARDIELLO, F.; TORTORA, G. EGFR antagonists in cancer treatment. *N. Engl. J. Med.*, v 358, p. 1160-1174, 2008.
18. COONS, A.H.; CREECH, H.J.; JONES, R.N. Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v. 47, p. 200-202, 1941.
19. DENNY, L. et al. Staging classifications and clinical practice guidelines for gynaecologic cancers [Internet]. London: International Federation of Gynecology and Obstetrics. Committee on Gynecologic Oncology; 2006 [cited 2009 Jul 19]. Disponível em:
<http://www.wvcancerregistry.org/Portals/27/PDFs/staging_booklet_fig0.pdf>.
Acesso em: 28 mar. 2010.
20. EDGE, S.B. et al. *AJCC Cancer Staging Manual*, 7th ed. New York, NY, USA: Springer, 2010. p. 395-402.
21. ELEUTÉRIO-JÚNIOR, J.; GIRALDO, P.C.; GONÇALVES, A.K. Marcadores imunoistoquímicos de lesões precursoras do câncer do colo uterino associadas ao HPV: o papel da proteína de supressão tumoral p16INK4a. *DST – J. Bras. Doenças Sex. Transm.*, v. 18, n. 1, p. 62-65, 2006.
22. FERRARA, N.; KERBEL, R.S. – Angiogenesis as a therapeutic target, *Nature Insight*, v. 438, p. 967-974, 2005.
23. FISZMAN, G.L.; JASNIS, M.A. Molecular mechanisms of trastuzumab resistance in HER2 overexpressing breast cancer. *Int. J. Breast Cancer*, v. 2011, p. 1-11, 2011.

24. FOLKMAN, J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin. Oncol.*, v. 29, p. 15, 2002.
25. GADELHA, M.I.P.; COSTA, M.R.; ALMEIDA, R.T. Estadiamento de Tumores Malignos - análise e sugestões a partir de dados da APAC. *Rev. Bras. Cancerol.*, v. 51, n. 3, p. 193-199, 2005.
26. GADELHA, M.I.P. [cartas ao leitor]. *Rev. Bras. Cancerol.*, v. 42, n. 2, p. 85, 1996.
27. GAFFNEY, D.K. et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and vascular endothelial growth factor (VEGF) negatively affect overall survival in carcinoma of the cervix treated with radiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, v. 56, p. 922-928, 2003.
28. GOLIJOW, C.D. et al. Chlamydia trachomatis and human papillomavirus infections in cervical disease in Argentine women. *Gynecol. Oncol.*, v. 96, n. 1, p. 181-186, 2005.
29. GSCHWIND, A.; FISCHER, O.M.; ULLRICH, A. The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer*, v. 4, p. 361-370, May, 2004.
30. GUPTA, N. et al. HER-2/neu expression in lesions of uterine cervix: is it reliable and consistent? *Indian J. Pathol. Microbiol.*, v. 52, n. 4, p. 482-485, Oct.-Dec., 2009.
31. HAMMES, L.S. et al. Up-regulation of VEGF, c-fms and COX-2 expression correlates with severity of cervical cancer precursor (CIN) lesions and invasive disease. *Gynecol Oncol*, v. 110, n. 3, p. 445-451, Sept., 2008.
32. HANDISURYA, A.; SCHELLENBACHER, C.; KIRNBAUER, R. Diseases caused by human papillomaviruses (HPV). *J. Dtsch. Dermatol. Ges.*, v. 7, n. 5, p. 453-466, 2009.
33. HELLBERG, D.; TOT, T.; STENDAHL, U. Pitfalls in immunohistochemical validation of tumor marker expression--exemplified in invasive cancer of the uterine cervix. *Gynecol. Oncol.*, v. 112, n. 1, p. 235-240, Jan., 2009.
34. HICKLIN, D.J.; ELLIS, L.M. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J. Clin. Oncol.*, v. 23, p. 1011-1027, 2006.
35. HOWE, H.L. et al. Annal report to the nation on the status of cancer, 1975-2003, featuring cancer among U.S. Hispanic/Latino populations. *Cancer*, v. 107, n. 8, p. 1711-1742, 2006.
36. IIDA, K. et al. EGFR gene amplification is related to adverse clinical outcomes in cervical squamous cell carcinoma, making the EGFR pathway a novel therapeutic target. *British J. Cancer*, v. 105, p. 420-427, 2011.
37. JAYSHREE, R.S. et al. Cell intrinsic & extrinsic factors in cervical carcinogenesis. *Indian J. Med. Res.*, v. 130, p. 286-295, 2009.

38. JHINGRAN, A. et al. Cancers of the cervix, vulva, and Vagina. In: ABELOFF, M.D. et al. *Abeloff's clinical oncology*. Philadelphia, PA, USA: Churchill Livingstone, 2008. p. 1745-1765.
39. JONES, A.V.; CROSS, N.C. – Oncogenic derivatives of plaquet-derived growth factor recetors. *Cell Mol. Life Sci.*, v. 61, n. 23, p. 2912-2923, 2004.
40. KAMANGAR, F.; DORES, G.M.; ANDERSON, W.F. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *J. Clin. Oncol.*, v. 24, p. 2137-2150, 2006.
41. KANDA, K. et al. Transcriptional expression of the genes implicated in angiogenesis and tumor invasion in cervical carcinomas. *Gynecol. Oncol.*, v.98, p. 453-461, 2005.
42. KRUSE, A.J. et al. Quantitative molecular parameters to identify low-risk and high-risk early CIN lesions: role of markers of proliferative activity and differentiation and Rb availability. *Int. J. Gynecol. Pathol.*, v. 23, n. 2, p. 100-109, 2004.
43. KURAMOTO, H. et al. Immunohistochemical evaluation of insulin-like growth factor I receptor status in cervical cancer specimens. *Acta. Med. Okayama*, v. 62, n. 4, p. 251-259, Aug., 2008.
44. LAGRANGE, J.L. et al. Demonstration and characterization of EGF receptors in cancer of the uterine cervix. *Bull. Cancer*, v. 80, n. 3, p. 219-224, Mar., 1993.
45. LEE, C.M. et al. Expression of HER2neu (c-erbB-2) and epidermal growth factor receptor in cervical cancer: prognostic correlation with clinical characteristics, and comparison of manual and automated imaging analysis. *Gynecol. Oncol.*, v. 93, p. 209-214, 2004.
46. LESNIKOVA, I. et al. HER2/neu (c-erbB-2) gene amplification and protein expression are rare in uterine cervical neoplasia: a tissue microarray study of 814 archival specimens. *APMIS*, v. 117, n. 10, p. 737-745, Oct., 2009.
47. LEVITZKI, A. Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *Eur. J. Cancer*, v. 38 (suppl. 5), p. 11-18, 2002.
48. LIU, R. et al. The prognostic role of a gene signature from tumorigenic breast-cancer cells. *N. Engl. J. Med.*, v. 356, n.3, p. 217–226, 2007.
49. LOEB, L.A.; LOEB, K.R.; ANDERSON, J.P. Multiple mutations and cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 100, n.3, p. 776-781, 2003.
50. LONGATTO-FILHO, A. et al. Molecular characterization of EGFR, PDGFRA and VEGFR2 in cervical adenosquamous carcinoma. *B.M.C. Cancer*, v. 9, p. 212-219, 2009.

51. MA, L. et al. Eosinophilic dysplasia of the cervix: a newly recognized variant of cervical squamous intraepithelial neoplasia. *Am. J. Surg. Pathol.*, v. 28, n. 11, p. 1474-1484, 2004.
52. MACHADO, M.S. et al. Estudo Retrospectivo do Câncer de Colo do Útero das Pacientes Atendidas no Hospital de Base do Distrito Federal. *NewsLab*, v. 73, p. 82-89, 2005.
53. MARTINS, L.F.L.; THULER, L.C.S.; VALENTE, J.G. Cobertura do exame de Papanicolaou no Brasil e seus fatores determinantes: uma revisão sistemática da literatura. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.*, v. 27, n. 8, p. 485-492, 2005.
54. MATHUR, S.P. et al. Serum vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) as a specific biomarker for advanced cervical cancer: Relationship to insulin-like growth factor II (IGF-II), IGF binding protein 3 (IGF-BP3) and VEGF-B. *Gynecol. Oncol.*, v.98, p. 467-483, 2005.
55. MAURO, M.J. et al. STI571: a new paradigm of new agents for cancer therapeutics. *J. Clin. Oncol.*, v. 20, n. 1, p. 325-334, 2002.
56. McCLUGGAGE, W.G. Immunohistochemistry as a diagnostic aid in cervical pathology. *Pathology*, v. 39, n. 1, p. 97-111, Feb., 2007.
57. MENDONÇA, V.G. et al. Mortalidade por câncer do colo do útero: características sociodemográficas das mulheres residentes na cidade de Recife, Pernambuco. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.*, v. 30, n. 5, p. 248-255, 2008.
58. MINAGUCHI, T.; YOSHIKAWA, H. Molecular mechanism of cervical carcinogenesis. *Gan. To. Kagaku. Ryoho.*, v. 37, n. 1, p. 18-22, 2010.
59. NILSSON, M.; HEYMACH, J.V. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) pathway. *J. Thorac. Oncol.*, v. 1, p. 1768-1770, 2006.
60. NO, J.H. et al. Expression of vascular endothelial growth factor and hypoxia inducible factor-1alpha in cervical neoplasia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 1171, p. 105-110, Aug., 2009.
61. NOGUEIRA, M.C. et al. Immunohistochemical expression of p16 and p53 in vulvar intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma of the vulva. *Pathol. Oncol. Res.*, v. 12, n. 3, p. 153-157, 2006.
62. NOGUEIRA-RODRIGUES, A. et al. Phase I trial of erlotinib combined with cisplatin and radiotherapy for patients with locally advanced cervical squamous cell cancer. *Clin. Cancer Res.*, v. 14, p. 6324-6329, 2008.
63. NOORDHUIS, M.G. et al. Expression of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) and Activated EGFR Predict Poor Response to (Chemo)radiation and Survival in Cervical Cancer. *Clin. Cancer Res.*, v. 15, n. 23, p. 7389-7397, Dec. 1, 2009.

64. NOVIK, P.R. Estudo do valor prognóstico da expressão imunoistoquímica de p53 e p16 no carcinoma do colo do útero estadios Ib e IIa. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.*, v.25, n.6, p. 453, July, 2003.
65. OLAHASKI, A.J. et al. Tetraploidy and chromosomal instability are early events during cervical carcinogenesis. *Carcinogenesis*, v. 27, n. 2, p. 337–343, 2006.
66. PARKIN, D.M. et al. Global cancer statistics, 2002. *Cancer J. Clin.*, v. 55, n. 2, p. 74-108, 2005.
67. PÉREZ, L.O. et al. Herpes simplex virus and human papillomavirus infection in cervical disease in Argentine women. *Int. J. Gynecol. Pathol.*, v. 25, n. 1, p. 42-47, 2006.
68. PRESS, M.F.; LENZ, H.J. EGFR, HER2 and VEGF Pathways Validated Targets for Cancer Treatment. *Drugs*, v. 67, n. 14, p. 2045-2075, 2007.
69. PROTRKA, Z. et al. HER-2 expression in uterine cervix carcinogenesis. *J. BUON*, v. 12, n. 1, p. 91-97, Jan.-Mar., 2007.
70. QUINN, M.A. et al. Carcinoma of the cervix uteri. FIGO 6th Annual Report on the Results of Treatment in Gynecological Cancer. *Int. J. Gynaecol. Obstet.*, v. 95, (suppl. 1), p. 43-103, 2006.
71. RAICA, M.; CIMPEAN, A.M. Platelet-derived growth factor (PDGF)/PDGF receptors (PDGFR) axis as target for antitumor and antiangiogenic therapy. *Pharmaceuticals*, v. 4, p. 572-599, 2010.
72. RAK, J. et al. What do onco genic mutations have to do with angiogenesis/vascular dependence of tumors? *Cancer Res.*, v. 62, p. 1931-1934, 2002.
73. ROSA, M.I. et al. Papilomavírus humano e neoplasia cervical. *Cad. Saúde Pública*, v. 25, n. 5, p. 953-964, 2009.
74. ROSTY, C. et al. Overexpression/amplification of HER-2/neu is uncommon in invasive carcinoma of the uterine cervix. *Int. J. Gynecol. Pathol.*, v. 23, n. 1, p. 13-17, Jan., 2004.
75. SAAD, E.D. Apresentação. Disponível em:
<<http://www.dendrix.com.br/novosite/nibsemabs/>> Acesso em: 28 mar. 2010a.
76. SAAD, E.D. O que o oncologista precisa saber sobre biologia molecular? Disponível em:
<<http://www.dendrix.com/novosite/nibsemabs/?secao=8&pai=46&subsecao=95>>. Acesso em: 28 mar. 2010b.
77. SALCEDO, M.M.B.P.; SILVEIRA, G.P.G.; ZETTLER, C.G. A expressão da proteína p16 e herpes simples vírus tipo 2 em lesões pré-neoplásicas e neoplásicas do colo do útero. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.*, v. 30, n. 2, p. 61-66, 2008.

78. SHERMAN, M.E. et al. Mortality trends for cervical squamous and Adenocarcinoma in the United States. Relation to incidence and survival. *Cancer*, v. 103, p. 1258-1264, 2005.
79. SILVA-FILHO, A.L. Use of the prognosis markers in the treatment for the invasive cervical carcinoma. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.*, v. 31, n. 9, p. 468-473, 2009.
80. SINGH, N.; ARIF, S. Histopathologic parameters of prognosis in cervical cancer-a review. *Int. J. Gynecol. Cancer*, v. 14, n. 5, p. 741-750, 2004.
81. SJÖBLOM, T. et al. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science*, v. 314, p. 268-274, 2006.
82. SOONTHORNTHUM, T. et al. Epidermal growth factor receptor as a biomarker for cervical cancer. *Ann. Oncol.*, v. 22, n. 10, p. 2166-2178, 2011.
83. STARLING, N.; CUNNINGHAM, D. Monoclonal antibodies against vascular endothelial growth factor and epidermal growth factor receptor in advanced colorectal cancers: present and future directions. *Curr. Opin. Oncol.*, v. 16, p. 385-390, 2004.
84. SOUFLA, G. et al. VEGF, FGF2, TGF β 1 and TGF β R1 mRNA expression levels correlate with the malignant transformation of the uterine cervix. *Cancer Letters*, v. 221, p. 105–118, 2005.
85. TACERVA: cloridrato de erlotinibe. Guilherme N. Ferreira. Basileia, Suíça: F. Hoffmann-La Roche Ltd., 2011. Bula de remédio.
86. TAJA-CHAYEB, L. et al. Expression of platelet derived growth factor family members and the potential role of imatinib mesylate for cervical cancer. *Cancer Cell Int.*, v. 6, p. 22, Oct. 2, 2006.
87. TAYLOR, C.R. et al. Techniques of immunohistochemistry: principles, pitfalls, and standardization. In: DABBS, D.J. *Diagnostic Immunohistochemistry*, New York: Churchill Livingstone, 2002. p. 3-43.
88. TELLES, O.S. Carcinogênese – Biomolecular em Cancerologia. *J. Biomolec. Med. Free. Rad.*, v. 5, n. 2, p. 44-52, 1999.
89. THULER, L.C.S.; MENDONÇA, G.A. Estadiamento inicial dos casos de câncer de mama e colo do útero em mulheres brasileiras. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.*, v. 27, n. 11, p. 302-306, 2005.
90. THULER, L.C.S. Mortalidade por câncer do colo do útero no Brasil. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.*, v. 30, n. 5, p. 216-218, 2008.
91. VIEIRA, S.C. et al. Exenteração pélvica para câncer do colo uterino recidivado pós-radioterapia: experiência de um centro terciário do Nordeste brasileiro. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.*, v. 31, n. 1, p. 22-27, 2009.

92. WICK, M.R.; RITTER, J.H.; SWANSON, P.E. The impact of diagnostic immunohistochemistry on patient outcomes. *Clin. Lab. Med.*, v. 19, n.4, p. 797-814, vi, 1999.
93. WORTZEL, I.; SEGER, R. The ERK cascade: distinct functions within various subcellular organelles. *Genes Cancer*, v. 2, n. 3, p. 195-209, 2011.
94. WU, E. et al. Comprehensive dissection of PDGF-PDGFR signaling pathways in PDGFR genetically defined cells. *PLoS ONE*, v. 3, n. 11, p. 3794-3807, 2008.
95. ZEFERINO, L.C.; DERCHAIN, S.F. Cervical cancer in the developing world. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.*, v. 20, n. 3, p. 339-354, 2006.
96. ZHIVOTOVSKY, B.; ORRENIUS, S. Carcinogenesis and apoptosis: paradigms and paradoxes. *Carcinogenesis*, v. 27, n. 10, p. 1939–1945, 2006.
97. ZIDAN, J. et al. Comparison of HER-2 overexpression in primary breast cancer and metastatic sites its effect on biological targeting therapy of metastatic disease. *Br. J. Cancer*, v. 93, p. 552-556, 2005.
98. zur HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat. Rev. Cancer*, v. 2, n. 5, p. 342-350, May, 2002.

APÊNDICE A - Formulário de coleta de dados



**Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Patologia**

**PERFIL IMUNOISTOQUÍMICO DO CÂNCER DE COLO UTERINO
MESTRANDA: GUACYRA MAGALHÃES PIRES**

FORMULÁRIO DE COLETA DE DADOS

CASO (NUMERAÇÃO DO MESTRADO): _____

REGISTRO NO LABORATÓRIO: _____ DATA: ____/____/____

PATOLOGISTA: _____

PACIENTE: _____ IDADE: _____

•ANÁLISE HISTOLÓGICA:

AMOSTRA PROVENIENTE DE: ☐ Biopsia ☐ Conização ☐ Cirurgia: _____

TIPO HISTOLÓGICO: ☐ Escamoso ☐ Adenocarcinoma ☐ Adenoescamoso ☐ Outro: _____

TAMANHO DO TUMOR (> DIMENSÃO): _____

GRAU HISTOLÓGICO:

☐ Bem diferenciado ☐ Moderadamente diferenciado ☐ Pouco diferenciado

MARGENS: ☐ Livres ☐ Comprometidas

INVASÃO LINFOVASCULAR: ☐ sim ☐ não

INVASÃO ESTROMAL (PROFUNDIDADE DE INVASÃO): _____

EXTENSÃO DA INVASÃO: _____ ou ☐ > 7mm

LINFONODOS EXAMINADOS (LINFADENECTOMIA): ☐ sim ☐ não

se sim (linfonodos na amostra): ☐ número examinados: _____ quantos comprometidos: _____

•ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA:

VEGF ☐ negativo ☐ positivo

Escore da intensidade da expressão: ☐ +(1- expressão mínima) ☐ ++ (2- expressão moderada)
☐ +++ (3, forte expressão)

PDGFR-β ☐ negativo ☐ positivo

Escore da intensidade da expressão: ☐ +(1- expressão mínima) ☐ ++ (2- expressão moderada)
☐ +++ (3, forte expressão)

EGFR ☐ negativo ☐ positivo

Escore da intensidade da expressão: ☐ +(1- expressão mínima) ☐ ++ (2- expressão moderada)
☐ +++ (3, forte expressão)

OBS.: _____

ANEXO A - Carta de anuência do orientador

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ANATOMIA

Recife, 15/06/2010

CARTA DE ANUÊNCIA

Declaro, para os devidos fins, que **GUACYRA MAGALHÃES PIRES** irá realizar o projeto de dissertação de mestrado no Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Pernambuco durante o período de março/2010 até março 2012.

A mestranda será orientada por mim durante o desenvolvimento do projeto de pesquisa sob o título de “Perfil Imunoistoquímico do Câncer de Colo Uterino”.

Atenciosamente,

Prof. Dr Ademar Afonso de Amorim Júnior

ANEXO B- Carta de solicitação ao laboratório

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

CARTA DE SOLICITAÇÃO AO LABORATÓRIO

Mestranda: Guacyra Magalhães Pires

Orientador: Prof Dr Ademar Afonso de Amorim Júnior

Ao: Laboratório Romualdo Lins LTDA, Caruaru/PE Recife, 15/06/2010

SOLICITAÇÃO

Eu, Guacyra Magalhães Pires, mestranda do Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Pernambuco, solicito a permissão para realização de revisão de histológica, bem como de imunoistoquímica de casos de câncer de colo uterino arquivados em blocos de parafina, no período de 2006-2010 no Laboratório Romualdo Lins, como parte fundamental do projeto de dissertação de mestrado do referido Programa de Pós-Graduação. Comprometo-me a manter todas as informações em caráter sigiloso, usando-as apenas para fins científicos. A coleta de dados só será iniciada após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa. A metodologia empregada será a descrita no Projeto de Pesquisa sob o título de “Perfil Imunoistoquímico do Câncer de Colo Uterino”, entregue anexo a esta solicitação.

Atenciosamente,

Mestranda Guacyra Magalhães Pires

ANEXO C- Carta de anuência do laboratório

Dr. Gustavo Henrique T. Sales Barbosa CREMEPE - 12702

Título de Especialista em Patologia pela Sociedade Brasileira de Patologia e Associação Médica Brasileira
Membro Efetivo da Sociedade Brasileira de Patologia
Residência Médica em Anatomia Patológica na USP - Ribeirão Preto



LABORATÓRIO MÉDICO
Dr. Romualdo Lins
BIÓPSIAS - CITOLOGIA
CONGELAÇÃO - IMUNOISTOQUÍMICA

Dr. Romualdo Correia Lins Filho CREMEPE - 7318

Título de Especialista em Patologia pela Sociedade Brasileira de Patologia e Associação Médica Brasileira
Membro Efetivo da Sociedade Brasileira de Patologia
Ex-Professor do Centro de Ciências da Saúde da UFPB e da Universidade Regional do Nordeste

Inscrito no Programa de Incentivo ao Controle de Qualidade da Sociedade Brasileira de Patologia

Caruaru/PE, 16/06/2010

CARTA DE ANUÊNCIA DO LABORATÓRIO DECLARAÇÃO

Declaramos, para os devidos fins, que estamos cientes e de acordo com a realização da pesquisa sob o título "Perfil Imunoistoquímico do Câncer de Colo Uterino" que será desenvolvido pela mestrandia do Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Pernambuco, Guacyra Magalhães Pires. Disponibilizamos nosso banco de dados para realização de revisão histológica, bem como a imunoistoquímica de casos de câncer de colo uterino arquivados em blocos de parafina, no período de 2006-2010 em nosso laboratório, para fins de sua dissertação de mestrado, mantendo as informações em caráter sigiloso, com início da pesquisa após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.

Atenciosamente,

Dr. Gustavo Henrique T. Sales Barbosa
CREMEPE - 12702

Dr. Romualdo Correia Lins Filho
CREMEPE - 7318

ANEXO D -Normas e instruções aos autores da Revista Paraense de Medicina

Orientações gerais

A Revista Paraense de Medicina aceita para publicação, trabalhos científico-culturais da área de saúde, sob forma de: Artigo original; Atualização/Revisão; Relato de caso; Artigos especiais e sobre a linguagem médica; Nota prévia e Carta ao editor.

Os artigos devem ser enviados em CD-RW Rewritable 1X-12X 700MB ou disquete 3 ½ polegadas, com dois textos originais, impressos em papel A4, digitados no Windows 98 e Microsoft Word versão 2000 XP, com espaço simples, fonte TNR-12 e duas colunas. O SUMMARY, fonte 11 e referências fonte 10, em uma coluna.

As tabelas e quadros, incluídas no texto, devem possuir legenda na parte superior, fonte TNR 10, identificados com números romanos, indicando o que, onde e quando do tema, com nota de rodapé TNR 9. Os gráficos, fotos, esquemas, etc. são considerados como figuras, recebendo identificação inferior, TNR 10, seqüencial único em algarismos arábicos.

Fotografias deverão ser enviadas em tamanho 9x13cm, preto e branco com boa qualidade e com as estruturas a serem identificadas. As figuras de anatomia, histopatologia e endoscopia poderão ser coloridas.

Os autores são responsáveis pelos conceitos emitidos e devem atentar à seriedade e qualidade dos trabalhos, cujos dados devem receber tratamento estatístico, sempre que indicados.

Encaminhar, aos editores da RPM, os artigos com carta modelo, com timbre da Instituição e assinada pelos autores para devida avaliação pelo Conselho Editorial.

Todo trabalho com investigação humana e pesquisa animal deve ser acompanhado da aprovação prévia da Comissão de Ética em Pesquisa da instituição, onde se realizou o trabalho, conforme recomenda a Declaração de Helsinki (de 1975 e revisada em 1983) e as Normas Internacionais de Proteção aos Animais e a Resolução nº 196/96, do Ministério da Saúde, sobre pesquisa em seres humanos.

Os artigos enviados à RPM não podem ser publicados em outras revistas biomédicas.

Formatação dos artigos

Editorial

É o artigo inicial de um periódico. Comenta assunto atual de interesse à área de saúde, editoração, metodologia científica ou temas afins.

Artigo original

Aborda temas de pesquisa observacional ou experimental, transversal (incidência ou prevalência), horizontal ou longitudinal (retrospectiva ou prospectiva), estudo randomizado ou duplo cego, máximo de 6 a 10 laudas. A pesquisa bibliográfica acompanha todo trabalho biomédico.

1) Título e subtítulo (se houver), em português, TNR fonte 12, com tradução para o inglês, fonte 11, centralizados.

2) Nome completo dos autores, máximo de 6, com sobrenome em letras maiúsculas, TNR 11, também, centralizados.

3) No rodapé da 1ª página, citar a instituição onde foi realizado o trabalho e titulação dos autores, TNR 10, numerada conforme a sequência dos autores.

4) O resumo deve ser escrito em parágrafo único, itálico, TNR 12, contendo: objetivo, método (casuística e procedimento), resultados (somente os significantes) e conclusão ou considerações finais.

5) Descritores: citar no máximo 5 e em ordem de importância para o trabalho, conforme relação do Index Medicus.

6) Introdução: mostra a hipótese formulada, atualiza o leitor na relevância do tema sem divagação e termina com o objetivo do trabalho.

7) Método: descreve a casuística, amostra ou material e procedimentos utilizados para o trabalho.

8) Resultados: constituído por, no máximo, 6 tabelas numeradas, com legenda superior (TNR 10) e fonte de informação abaixo (TNR 9), acompanhadas ou não de gráficos. Não fazer comentários, reservando-os para o item Discussão.

9) Discussão: compara os resultados da pesquisa com os da literatura referenciada, de maneira clara e sucinta.

10) Conclusões ou considerações finais sobre os resultados da pesquisa ou estudo, de forma concisa e coerente com o tema.

11) Summary: versão do resumo do trabalho para a língua inglesa, TNR 11, itálico. Deve constar o título, nomes dos autores e os itens superpostos.

12) Key words: segundo o DECS e na língua inglesa.

13) Referências: devem ser atualizadas, (TNR 10), obedecendo o estilo Vancouver, em ordem numérica conforme a citação no texto, máximo de 30 citações.

Exemplificando

Artigos:

TEIXEIRA, JRM .- Efeitos analgésicos da *Maytenus guianensis*: estudo experimental, *Rev. Par. Med.* 2001, 15(1): 17-21

O nome do periódico é de forma itálica.

Livro e monografia:

COUSER, WG – Distúrbios glomerulares. In:CECIL – *Tratado de Medicina Interna*, 19 ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara, p. 477-560, 1993

Internet:

MOKADDEM, A (e colaboradores). Pacemaker infections, 2002. Disponível em <http://www.pubmed.com.br> – Acessado em

As qualidades básicas da redação científica são: concisão, coerência, objetividade, linguagem correta e clareza.

Atualização/revisão

Obedece o mesmo padrão do artigo original, dispensando o item RESULTADOS, máximo, máximo de 5 a 6 laudas.

Relato de caso

Deve ter relevância científica, conciso, máximo de 3 laudas, esquemático e didático; o método é o próprio relato do caso e dispensa resultados.

Nota prévia

Descrição de pesquisa inédita ou de inovação técnica, de maneira sucinta e objetiva, máximo de 2 laudas.

Solicitamos aos autores e colaboradores da RPM que sigam as normas referidas e encaminhem os artigos após revisão e correção gramatical, inclusive o disquete.

No final de cada artigo, anotar o endereço completo com CEP , telefone para contato e endereço eletrônico (e-mail).

Endereço para correspondência

REVISTA PARAENSE DE MEDICINA

Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará

Rua Oliveira Bello, 395 - Umarizal

CEP: 66.050-380 Belém - Pará

Fone: (0xx91) 4009-2213/4009-9022

Fax: (0xx91) 4009-2299

e-mail: borinfor@amazon.com.br

ANEXO E – Normas e instruções aos autores do Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial



ISSN 1676-2444 *versão impressa*

ISSN 1678-4774 *versão online*

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

O Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial (JBPML), continuação do Jornal Brasileiro de Patologia, de periodicidade bimestral (fevereiro, abril, junho, agosto, outubro e dezembro), é o órgão oficial da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML), da Sociedade Brasileira de Patologia (SBP) e da Sociedade Brasileira de Citopatologia (SBC). É indexado no Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS), no Periódica e no Chemical Abstracts e é integrante da base de dados Scientific Electronic Library Online (SciELO). Destina-se à publicação de trabalhos científicos que contribuam para o desenvolvimento da área de Medicina Laboratorial e aceita as seguintes categorias: artigos originais, de revisão, de atualização, experimentais, relatos de caso, comunicações breves e cartas aos editores. Os trabalhos podem ser submetidos nos idiomas português, inglês ou espanhol.

Análise dos trabalhos

O manuscrito recebido será enviado para, pelo menos, dois avaliadores independentes, pares científicos, de renome e com conhecimento específico na área contemplada pelo artigo. Após análise pelos avaliadores, o editor-chefe do JBPML entrará em contato com o autor principal comunicando os passos a serem seguidos na aceitação do trabalho para publicação ou sua eventual rejeição.

Direitos autorais

Os autores devem enviar um termo de responsabilidade, assumindo formalmente a autoria do trabalho e oficializando a transferência de direitos autorais (copyright transfer statement). O Sistema de Gestão de Publicações (SGP) do JBPML possui o modelo desse documento e as instruções para preenchê-lo e enviá-lo.

Ética

Estudos realizados com seres humanos, incluindo órgãos e/ou tecidos isoladamente, bem como prontuários clínicos ou resultados de exames clínicos, deverão estar de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (<http://www.bioetica.ufrgs.br/res19696.htm>). O trabalho a ser publicado deverá ser acompanhado de certificado de aprovação do Comitê de Ética da Instituição onde foi realizada a pesquisa, em consonância com a Declaração de Helsinki, 1989 (<http://www.bioetica.ufrgs.br/helsin4.htm>).

Nos trabalhos experimentais envolvendo animais, devem ser respeitados os princípios éticos de experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e as normas estabelecidas no Guide for Care and Use of Laboratory Animals (Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council, Washington, D.C., 1996). As drogas e substâncias químicas eventualmente utilizadas na realização do trabalho devem ser identificadas com precisão. Não devem ser utilizados nomes ou iniciais do paciente nem informados nomes comerciais, de empresas e/ou registros de hospitais.

Resumos e unitermos

Independentemente do idioma no qual o trabalho foi escrito, devem constar dois resumos: um em português (Resumo) e outro em inglês (Abstract). Os resumos devem identificar os objetivos, os procedimentos e as conclusões do trabalho (máximo de 250 palavras para artigos originais, artigos de revisão e artigos de atualização; e máximo de 100 palavras para relatos de caso e comunicações breves). Caso o trabalho tenha sido escrito em espanhol, deverá haver um resumo também nesse idioma.

Os unitermos, palavras que representam o assunto tratado no trabalho, devem ser em número de três a seis, utilizando o vocabulário controlado Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) da BIREME, acrescidos de outros termos, quando necessário. Devem ser apresentados em português e inglês. Caso o trabalho tenha sido escrito em espanhol, deverá haver descritores também nesse idioma.

Agradecimentos

Devem ser breves, diretos e dirigidos apenas à pessoa ou à instituição que contribuiu substancialmente para a elaboração do trabalho. Devem ser incluídos após as conclusões e antes das referências bibliográficas.

Estrutura do texto

Artigos originais

São contribuições destinadas a divulgar resultados de pesquisa original, inédita, que possam ser replicados ou generalizados. Os artigos podem conter até 4 mil palavras. A sua estrutura formal deve seguir o esquema de apresentação do texto para esse tipo de artigo: Introdução, Objetivos, Material e Método, Resultados, Discussão, Conclusões e Referências Bibliográficas.

O uso de subtítulos é recomendado, particularmente na Discussão. Implicações clínicas e limitações do estudo devem ser claramente apontadas. Sugere-se o detalhamento do tópico Material e Método. Para esses artigos, exige-se a apresentação de resumos estruturados em português e inglês, com cabeçalhos obedecendo à apresentação formal do artigo: Introdução, Objetivos, Material e método, Resultados, Discussão, Conclusões e Referências. O Abstract (resumo em inglês) deve ser precedido pelo título em inglês. As referências bibliográficas devem aparecer no final do texto, obedecendo às normas especificadas a seguir.

Comunicações breves

São relatos curtos que devem apresentar: 1) dados de estudos preliminares com achados sugestivos que garantam uma investigação mais definitiva; 2) estudos de replicação; e 3) estudos negativos de tópicos importantes. Esses artigos devem ter até 1.500 palavras, incluir resumo não-estruturado e, no máximo, uma tabela ou figura, além das referências bibliográficas.

Artigos de revisão

Serão aceitos apenas mediante convite. Avaliações críticas sistematizadas da literatura sobre determinado assunto, devem incluir conclusões e ter até 5 mil palavras. A organização do texto, com exceção de Introdução, Discussão e Conclusão, fica a critério do autor. Para esses

artigos, exige-se um resumo estruturado no idioma do texto e outro em inglês. Uma lista extensa de referências bibliográficas deve aparecer no final do texto.

Artigos de atualização

São trabalhos descritivos e interpretativos baseados na literatura recente sobre a situação global em que se encontra determinado assunto. Devem conter até 3 mil palavras. A estrutura do texto fica a critério do autor, mas deve haver um resumo não-estruturado no idioma do texto e outro em inglês, além de referências bibliográficas.

Relatos de caso

São trabalhos de observações clinicolaboratoriais originais, acompanhados de análise e discussão. Devem conter até 1.500 palavras. A estrutura deve apresentar, no mínimo, os seguintes tópicos: Introdução, Relato(s) dos(s) caso(s) e Discussão. Incluir um resumo não-estruturado no idioma do texto e outro em inglês.

Cartas aos editores

Inclui cartas que visam a discutir artigos recentes publicados na revista ou a relatar pesquisas originais ou achados científicos significativos. Cartas breves, com no máximo 500 palavras (incluindo referências, sem tabelas ou figuras), serão consideradas se estiver explícita a frase "para publicação".

Referências

As referências bibliográficas devem aparecer no final do artigo, em ordem alfabética numerada. Devem seguir as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) - NBR-6023 (agosto 2000). Os títulos dos periódicos deverão ser referidos na forma abreviada de acordo com o Index Medicus (List of Journals Indexed in Index Medicus). Se a lista de referências não seguir a norma adotada, os trabalhos serão imediatamente rejeitados, sem revisão de conteúdo.

Os autores devem certificar-se de que as referências citadas no texto constam da lista de referências com datas exatas e nomes de autores corretamente grafados. A exatidão das referências bibliográficas é de responsabilidade dos autores. Comunicações pessoais, trabalhos inéditos ou em andamento poderão ser citados, quando absolutamente necessários,

mas não devem ser incluídos na lista de referências bibliográficas; apenas mencionados no texto ou em nota de rodapé. A lista de referências deve seguir o estilo dos exemplos abaixo.

Exemplos:

- Artigos de periódicos (um só autor)
COTRIM, F. L. S. Coleta de sangue para dosagem de triglicerídeos. *J Bras Patol*, v. 33, n. 4, p. 201-02, 1997.
- Artigos de periódicos (mais de três autores)
ABREU, E. S. *et al.* Doença de Hodgkin infanto-juvenil no estado do Ceará e sua relação com o vírus Epstein-Barr: parâmetros clínicos e análise morfológica imuno-histoquímica e por hibridização in situ. *J Bras Patol*, v. 33, n. 4, p. 178-84, 1998.
- Artigo de periódico *on-line*
YAZLE, J. S. R. *et al.* Assistência hospitalar como indicador da desigualdade social. *Rev Saúde Publ*, São Paulo, v. 31, n. 5, 1997. Disponível em: <http://www.fsp.usp.br/rsp>. Acesso em: 23 mar. 1998.
- Livros no todo (dois autores)
RINGSVEN, M. K.; BOND, D. *Gerontology and leadership skills for nurses*. Albany, N.Y.: Delmar Publishers, 1996.
- Capítulos ou parte de livro editado por outro autor
SCIVOLETO, R. Sistema nervoso autônomo. In: ZANINI, A. C.; OGA, S. *Farmacologia aplicada*. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1989. Cap. 9; p. 97-141.
- Parte de livro em meio eletrônico
SÃO PAULO (Estado). Secretaria do Meio Ambiente. Tratados e organizações ambientais em matéria de meio ambiente. In: _____. *Entendendo o meio ambiente*. São Paulo, 1999. v. 1. Disponível em: <http://www.bdt.org/sma/entendendo/atual/htm>. Acesso em: 8 mar.1999.
- Evento em meio eletrônico
SILVA, R. N.; OLIVEIRA, R. Os limites pedagógicos do paradigma da qualidade total da educação. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFPE, 4., 1996, Recife. *Anais eletrônicos...* Recife: UFPe, 1996. Disponível em: <http://www.propesq.ufpe.br/anais/educ/ce04.htm>. Acesso em: 21 jan.1997.
- Tese ou dissertação

OLIVEIRA, C. M. *Isolamento e caracterização de estreptococos de placa dental*. Rio de Janeiro, 1974. Tese (doutoramento) - Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Citações no texto

Devem ser identificadas por algarismos arábicos (números-índice). Podem também ser acrescentados o nome do autor e o ano. As referências com mais de um autor devem conter o sobrenome do autor seguido da expressão *et al.*, como, por exemplo, Higashi *et al.*

Tabelas e figuras

As tabelas deverão ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos e encabeçadas por seu título, recomendando-se a não-repetição dos mesmos dados em gráficos. Na montagem das tabelas, seguir as normas de apresentação tabular estabelecidas pelo Conselho Nacional de Estatística e publicadas pela Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 1993).

As ilustrações (gráficos, fotografias, desenhos etc.) deverão ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos e citadas como figuras. Devem ser suficientemente claras para permitir sua produção. Os gráficos deverão vir preparados em programa processador de gráficos. Deverão ser indicados os locais aproximados no texto onde as ilustrações serão intercaladas como figuras.

O SGP aceita a importação de tabelas, imagens e gráficos em arquivo eletrônico nos seguintes formatos: jpg, gif, psd, tif e png.

Abreviações e nomes de medicamentos

As abreviações devem ser indicadas no texto no momento de sua primeira utilização. Empregar o nome genérico de medicamentos e indicar a fonte de componentes não-disponíveis para prescrição.

As unidades de medida, inclusive suas abreviaturas, devem ser expressas no sistema métrico decimal e, quando o autor assim o desejar, também no Sistema Internacional (SI) entre parênteses.

Contato com a secretaria do JBPML

Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial

Tel.: (21) 3077-1400

e-mail: jbpml@sbpc.org.br

Como submeter um artigo ao JPBML

Como submeter um artigo ao JPBML

1. Entre em www.jbpml.org.br.
2. Se você já é cadastrado, digite seu login e sua senha e clique no botão "Entrar no SGP". Se ainda não é cadastrado, clique em "Quero me Cadastrar".
3. Primeiro passo: no campo "Informe seu Email", cadastre o e-mail que será usado para receber os avisos e informações do Sistema de Gestão de Publicações (SGP). Clique em "Continuar cadastro".
4. Segundo passo: preencha os campos do cadastro. Atenção: os campos marcados com * são obrigatórios. Clique em "Continuar cadastro". Aparecerá a mensagem "Seu cadastro no SGP foi concluído com sucesso". Um e-mail com o login e a senha informados será enviado para seu endereço cadastrado. Nesta mesma página, clique em "Voltar".
5. Você será encaminhado à página inicial do SGP, com login e senha. Nesta página, digite o login e a senha que você cadastrou e clique em "Entrar no SGP". Obs.: o login e a senha estão no e-mail que o SGP lhe enviou no final do seu cadastro.
6. Na página de abertura do SGP aparece uma mensagem informando ser esta a primeira vez que você acessa o sistema. Caso contrário, a mensagem informa quantas vezes já o acessou, data e hora do último acesso e que você tem acesso com nível de autor.
7. Observe o menu do lado esquerdo da tela. Se você ainda não submeteu nenhum artigo pelo SGP, todos os itens do menu estão indicados com quantidade "zero".
8. Para submeter um artigo, clique em "Submeter novo artigo para Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial".
9. Janela "Passo 1": informar a classificação do artigo (manuscrito):
 - Artigo de revisão
 - Artigo original
 - Carta ao editor

- Comunicação breve
- Relato de caso

Clique na opção correspondente à classificação do artigo. Por exemplo: Artigo original.

10. Janela "Passo 2": anexar imagens e/ou gráficos usados no artigo. Todas as imagens e/ou gráficos devem estar em um dos seguintes formatos: jpg, gif, png, pdf ou tif. Após anexar imagens/gráficos, clique em "Enviar imagens". Caso o artigo não tenha imagens, clique em "Não necessito enviar imagens".

11. Nesta janela o autor pode conferir as imagens que enviou e enviar mais. Caso não tenha enviado imagens, aparecerá a mensagem "Nenhuma imagem foi enviada pelo autor". Clique em "Próximo".

12. Janela "Passo 3": inserir/editar/excluir novos co-autores.

Para cada novo co-autor devem ser preenchidos os campos "Nome", "Titulação", "Cargo" e, opcionalmente, CPF (pedido para posteriormente gerar o termo de Copyright, que garante os direitos autorais). A ordem de importância dos autores pode ser alterada clicando nas setas amarelas (para cima ou para baixo). O primeiro nome será considerado o autor principal, e os demais, co-autores. Após inserir/editar/excluir novos co-autores, clique em "Gravar" e em "Próximo". Se não houver novos co-autores, clique em "Próximo".

13. Janela "Passo 4": preencher com o título do artigo e descritores (palavras-chave ou key words). Essas informações devem ser escritas na língua nativa do autor (por exemplo, português ou espanhol) e em inglês.

Clique em "Próximo".

14. Janela "Passo 5": preencher com o resumo (abstract). O autor também pode incluir informações adicionais, como o nome da instituição, nome e endereço para correspondência e se recebeu suporte financeiro.

Também é possível redigir uma Carta ao Editor contendo informações adicionais que considere importantes. Somente o editor terá acesso a esta carta. Clique em "Próximo".

15. Janela "Passo 6": redigir o artigo propriamente dito. É fornecido um editor de texto com os comandos necessários para formatação. É possível "colar" um texto já escrito e formatado em MS Word. Clicar em "Próximo".

16. Janela "Passo 7": Transferência de Declaração de Direitos Autorais (Copyright Transfer Statement). Preencher os campos solicitados, imprimir e enviar para a SBPC/ML pelo fax (21) 2205-3386. Clicar em "Próximo".

17. Janela "Passo 8": formato de visualização do artigo (html ou pdf). Nesta janela, o autor decide se vai submeter o artigo ou vai excluí-lo e desistir de fazê-lo.
18. Janela "Concluído": indica que você terminou o processo de submissão do artigo.
19. Você receberá um e-mail comunicando que o artigo foi submetido a avaliação.

ANEXO F – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos da UFPE



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. N.º. 216/2010 - CEP/CCS

Recife, 27 de agosto de 2010

Registro do SISNEP FR – 352936
CAAE – 3353.0.000.172-10
Registro CEP/CCS/UFPE N.º 242/10
Título: “**Perfil Imunoistoquímico do Câncer de Colo Uterino**”
Pesquisador Responsável: Guacyra Magalhães Pires

Senhor(a) Pesquisador(a):

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) registrou e analisou, de acordo com a Resolução N.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, o protocolo de pesquisa em epígrafe, liberando-o para início da coleta de dados em 26 de agosto de 2010.

Ressaltamos que a aprovação definitiva do projeto será dada após a entrega do relatório final, conforme as seguintes orientações:

- a) Projetos com, no máximo, 06 (seis) meses para conclusão: o pesquisador deverá enviar apenas um relatório final;
- b) Projetos com períodos maiores de 06 (seis) meses: o pesquisador deverá enviar relatórios semestrais.

Dessa forma, o ofício de aprovação somente será entregue após a análise do relatório final.

Atenciosamente

Prof. ~~Geraldo~~ Bosco Lindoso Couto
Coordenador do CEP/ CCS / UFPE

A
Mestranda Guacyra Magalhães Pires
Programa de Pós-Graduação em Patologia- CCS/UFPE