

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS P53 E BCL-2
NO CARCINOMA DE ENDOMÉTRIO

MÁRCIA LUIZA MONTALVÃO APPEL BINDA

Porto Alegre

2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS P53 E BCL-2
NO CARCINOMA DE ENDOMÉTRIO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para obtenção do título de Mestre.

MÁRCIA LUIZA MONTALVÃO APPEL BINDA

Orientadora: Profa. Dr. Maria Isabel Albano Edelweiss
Co-orientador: Prof. Dr. James Fleck

Porto Alegre

2004

Aos meus filhos, Pedro e Maria Eduarda, que aprenderam a me dividir, desde cedo, com pacientes e livros. Iluminam a minha vida e me ensinam a amar sem limites.

Ao meu marido Vítor - companheiro constante, ouvinte atento e porto seguro para as turbulências do meu espírito - o meu infinito amor.

Ao meu pai e à minha mãe, que me estimularam, através de suas atitudes, a transpor limites e a ter a eterna inquietude dos que buscam mais.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Professora Maria Isabel, que me acolheu e me estimulou à retomada do trabalho. Um exemplo de dedicação à pesquisa e às pessoas.

Ao Professor James Fleck, pelas opiniões sempre seguras.

Ao Professor Luis Fernando Rivero, pelo prestimoso auxílio na leitura das lâminas.

Ao Professor Waldemar Rivoire, que proporcionou o meu desenvolvimento como especialista na área de Oncologia Genital e que, ao longo de dez anos de convívio profissional, vem me enriquecendo com seus ensinamentos e experiência.

À Dr. Heleusa Mônego, minha mestra. Brinda-me constantemente com seus ensinamentos profissionais e com sua amizade. Suas palavras de incentivo, seu apoio nos momentos difíceis e, sobretudo, sua constante disponibilidade e desprendimento a elevam, além de amiga imprescindível, à segunda mãe. Obrigada.

Ao Dr. Ricardo dos Reis, colega atencioso e dedicado, que tem sempre palavras de estímulo e valorização.

À Professora Lúcia Pellanda, pela orientação epidemiológica, estatística e pelas palavras de incentivo.

Ao Serviço de Patologia do HCPA, pela cessão dos blocos de parafina e pelo apoio estrutural para a realização deste estudo e, de modo especial, à funcionária Flávia, pela disponibilidade e pela competência na confecção das lâminas.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	5
LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	6
1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....	7
1.1 INCIDÊNCIA E CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS DO CARCINOMA DE ENDOMÉTRIO	7
1.2 TIPO HISTOLÓGICO	9
1.3 AVALIAÇÃO DA EXTENSÃO DA DOENÇA (ESTADIAMENTO)	12
1.4 FATORES PROGNÓSTICOS DE USO CORRENTE.....	14
1.4.1 Variáveis clínicas.....	14
1.4.2 Variáveis patológicas.....	15
1.5 BIOLOGIA MOLECULAR	18
1.5.1 Gene e proteína p53	21
1.5.2 Gene e proteína bcl-2	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DE LITERATURA.....	34
2 OBJETIVOS.....	46
3 ARTIGO CIENTÍFICO EM LÍNGUA PORTUGUESA.....	47
5 ARTIGO CIENTÍFICO EM LÍNGUA INGLESA	84

LISTA DE ABREVIATURAS

TH – terapia hormonal
E – estágio
UNIFESP – Universidade Federal do Estado de São Paulo
EPM – Escola Paulista de Medicina
AE – adenocarcinoma endometrióide
PS – papilar seroso
CC – células claras
FIGO – Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
G – grau de diferenciação tumoral
G1 – bem diferenciados
G2 – moderadamente diferenciados
G3 – indiferenciados
GOG – Gynecologic Oncology Group
p.e. – por exemplo
i.e. – isto é
DNA – ácido desoxirribonucléico
Kda – kilodaltons
MCP – morte celular programada
Fase G1 – *gap* 1 ou intervalo 1: fase de repouso
Fase G2 – *gap* 2 ou intervalo 2 : fase preparatória para mitose
Fase G0 – *gap* 0 ou intervalo 0: células estáveis
Fase S – fase de síntese protéica
imh – imunoistoquímica
PCR – reação em cadeia da polimerase
Ca+ - cálcio iônico
RE – receptor estrogênico
RP – receptor de progesterona
HCPA – Hospital de Clínicas de Porto Alegre
CAP – Colégio Americano de Patologia
Col. - colaboradores

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Tabela 1– Frequência dos estádios clínicos.....	9
Figura 1 – Carcinomas Endometriais	10
Figura 2 – Sistema de Estadiamento Cirúrgico da Neoplasia Endometrial.....	13

ARTIGO EM PORTUGUÊS

Figura 1- Imunoistoquímica da expressão da proteína p53: (1A) Positiva e (1B) Negativa. A expressão foi observada no núcleo (seta) das células tumorais	75
Figura 2- Imunoistoquímica da expressão da proteína bcl-2: (2A) Positiva e (2B) Negativa. A expressão foi observada no citoplasma (seta) das células tumorais	76
Figura 3 - Curvas de sobrevida de acordo com a expressão da proteína p53...	77
Figura 4 - Curvas de sobrevida de acordo com a expressão da proteína bcl-2	78
Tabela 1 - Características histopatológicas dos tumores endometriais ressecados no serviço de Oncologia Genital do HCPA.....	79
Tabela 2 – Relação entre as expressões da proteína p53 e da proteína bcl-2 e as características histopatológicas nas pacientes com neoplasia endometrial submetidas a tratamento cirúrgico primário	80
Tabela 3 – Associação da expressão da proteína p53 e óbito (n=16).....	81
Tabela 4 – Associação da expressão da bcl-2 e óbito (n=16)	81
Tabela 5 – Frequência da expressão da p53 em pacientes vivas (n= 32).....	82
Tabela 6 – Associação da expressão da proteína p53 e a realização da linfadenectomia pélvica completa (n=48).....	82
Tabela 7 – Associação da expressão da proteína p53 e tratamento complementar (n=45)	83

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1 INCIDÊNCIA E CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS DO CARCINOMA DE ENDOMÉTRIO

O carcinoma de endométrio é a neoplasia do trato genital inferior feminino mais comum nos Estados Unidos. De acordo com a *American Cancer Society*, cerca de 40.100 novos casos foram diagnosticados no ano de 2003 e 6.800 mortes foram decorrentes da doença¹. Excluindo-se as lesões cutâneas não melanóticas, é o quarto câncer mais comum em mulheres, atrás das lesões de mama, pulmão e cólon. A taxa de incidência anual é de aproximadamente 26 casos novos para cada 100.000 mulheres brancas e de 17.7 para cada 100.000 mulheres da raça negra². A incidência para mulheres pós-menopáusicas é consideravelmente maior em ambas as raças, chegando a 100 casos novo/ano para cada 100.000 mulheres brancas não usuárias de estrogênio³.

No Brasil, apesar do incremento obtido nos últimos anos, na qualidade da informação sobre morbidade e mortalidade por câncer, os dados epidemiológicos estão longe do ideal. Calcula-se que o carcinoma endometrial seja responsável por 3% de todas as neoplasias diagnosticadas na mulher, vindo atrás dos tumores de pele, mama, colo uterino, cólon e estômago. Estima-se uma incidência de 6 a 13.3 casos novos/100.000 mulheres/ano^{4,5}. Segundo dados do Departamento de Ginecologia do Hospital AC Camargo de São Paulo, na década de 80, o câncer de corpo uterino estava presente em 10% dos casos atendidos na instituição e, na

década de 90, foi identificado em 25% dos casos⁶. Um estudo realizado na população do estado de São Paulo mostra um incremento na taxa de mortalidade por câncer endometrial, no período de 1980 a 1998, na ordem de 50 a 93.9%. Isto pode ser o resultado tanto de um aumento no número de casos novos/ano quanto de atrasos no diagnóstico e tratamento⁷.

A neoplasia endometrial afeta principalmente pacientes no período peri e pós-menopáusicos, com idade entre 50 e 65 anos. Somente 5% dos casos ocorrem em mulheres com idade inferior a 40 anos e 20 a 25% são diagnosticados antes da menopausa. Produz, precocemente, sangramento vaginal anormal, especialmente pós-menopáusicos⁸.

Incluem-se, entre fatores de risco para a neoplasia endometrial, o uso de terapia hormonal (TH) com estrogênio isolado, obesidade, diabetes *melittus*, nuliparidade e menopausa tardia (acima de 52 anos). Situações que diminuam a exposição ao estrogênio ou aumentem os níveis de progesterona (p.e., TH combinada - estrogênio e progestágeno -, tabagismo, anticoncepcional oral, ovulação) podem ser consideradas como protetoras. Mulheres residentes em países ocidentais desenvolvidos, com alto nível socioeconômico, com dieta rica em lipídios, especialmente gordura animal, são mais expostas a esta neoplasia^{9,10}.

Estudos nacionais mostram que pacientes com tumor endometrial apresentam, entre as suas características epidemiológicas, índice de massa corporal acima de 25kg/m² (73.8 a 78.5% dos casos), obesidade (21.35 a 48.5%), hipertensão arterial sistêmica (41.7 a 73.3%) e diabetes *melittus* (16.5 a

21.35%)^{4,11,12}. A média etária é de 64.67 anos e apresentação clínica mais freqüente é o sangramento pós-menopáusico¹².

Na literatura americana, a maioria das pacientes (75 – 88%) com carcinoma endometrial apresenta-se, ao diagnóstico, com doença em estágio (E) I (tumor restrito ao corpo uterino), com taxa de sobrevida de 82 a 95%^{13,14}. Esta taxa cai para 50 a 60% para doença em E II, 15 a 25% em E III e valores ainda mais baixos no E IV¹⁵. Parkin e cols.¹⁶ relataram índices de sobrevida global (sobrevida em 5 anos) que variavam conforme os países analisados: 84% nos Estados Unidos, 72% nos países europeus e 69% em países em desenvolvimento.

No Brasil, a freqüência dos estádios clínicos pode ser vista nos dados não publicados da Universidade Federal do Estado de São Paulo (UNIFESP) e Escola Paulista de Medicina (EPM) (Tabela 1)¹⁷.

Tabela 1– Freqüência dos estádios clínicos – UNIFESP/EPM (1997)

Estádio	Pacientes	
	n	%
I	75	70,7
II	6	5,7
III	19	16
IV	8	7,5

1.2 TIPO HISTOLÓGICO

Os carcinomas endometriais são, na maioria, adenocarcinomas. Estes são classificados como de tipo endometrióide (AE) e não endometrióide, sendo o

primeiro o mais comum (57 a 80% dos casos) (Figura 1)^{15,18}. As lesões endometrióides apresentam índices de sobrevida mais elevados¹⁵.

O tumor adenoescamoso ou adenocarcinoma com diferenciação escamosa maligna, originalmente uma variante histológica do adenocarcinoma endometrióide, tem sido objeto de discussão ao longo dos anos. O impacto prognóstico dos elementos escamosos no carcinoma endometrial é assunto pouco definido. Tem sido aceito que o prognóstico nesta lesão está relacionado ao grau de diferenciação do elemento glandular, não sendo necessário situá-lo como tipo especial de carcinoma¹⁹. No entanto, sabe-se, pelas observações clínicas, que o tumor adenoescamoso tem pior prognóstico que as lesões endometrióides⁹. Nesta forma, em vários estudos, é incluído na categoria das lesões não endometrióides^{20,21,22}.

Carcinomas Endometriais	
Adenocarcinoma endometrióide	
•	Típico
•	Adenoacantoma
•	Adenoescamoso
Adenocarcinoma não endometrióide	
•	Carcinoma de células claras
•	Carcinoma papilar seroso
•	Carcinoma secretor
•	Carcinoma mucinoso
•	Carcinoma indiferenciado
•	Carcinoma misto
•	Carcinoma escamoso

Figura 1 – Carcinomas Endometriais

Entre os tumores de tipo não endometrióide, destacam-se o papilar seroso (PS) e o de células claras (CC). O primeiro, reconhecido como um subtipo

histológico distinto por Lauchlan e Hedrinckson e col., perfaz 3 a 10% dos carcinomas endometriais. O carcinoma de células claras (CC), que pode coexistir com as neoplasias serosas, mas que também é definido como uma entidade isolada, representa 0.8 a 5.5% dos casos. Muitos estudos têm demonstrado uma evolução mais agressiva e prognóstico mais reservado para estas lesões, mesmo em estádios iniciais. Taxas de sobrevida em cinco anos para pacientes com tumores em E I e II variam de 42 a 68% nos subtipos PS e CC e 75 a 87% no AE²³.

Nos últimos anos, tem se definido pelo menos, dois tipos de carcinoma de endométrio. O tipo A, que se caracteriza por hiperestrinismo, tipo histológico endometrióide, baixo grau tumoral, estádios iniciais, freqüente associação com hiperplasia endometrial, positividade para receptores hormonais e prognóstico favorável. Ao contrário, o tipo B não se associa à estimulação estrogênica, tem como lesão precursora o carcinoma intra-epitelial, não expressa receptores hormonais, seu tipo histológico é não endometrióide. Estes tumores têm, mesmo em estádios iniciais, um mau prognóstico. É possível que alguns tumores não possam ser enquadrados claramente dentro de uma das duas categorias, assim como alguns casos do tipo A possam, durante o processo de carcinogênese, adquirir características próprias do grupo B^{15,24,25,26}.

1.3 AVALIAÇÃO DA EXTENSÃO DA DOENÇA (ESTADIAMENTO)

De acordo com a recomendação da Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO), revisada em 1988, a neoplasia endometrial deve ser estadiada cirurgicamente (Figura 2). Isto significa que o conhecimento da real extensão da doença, assim como a sua definição prognóstica, somente se dá após a intervenção cirúrgica. A importância deste procedimento tornou-se evidente a partir de 1970, quando foram publicados os resultados dos primeiros trabalhos que utilizavam, além da histerectomia, a dissecação da cadeia linfática pélvica para tratamento da neoplasia endometrial. Desta forma, verificou-se que, aproximadamente, 22% das pacientes com doença clinicamente restrita ao útero (estádio I clínico) tinham doença extra-uterina ao tempo da laparotomia. Além disso, pode se perceber que a presença de metástase em linfonodos estava diretamente relacionada à piora da diferenciação tumoral e ao aumento da invasão tumoral no miométrio. Foram encontradas 3% de metástases linfáticas pélvicas em tumores bem diferenciados (G1), com invasão do terço interno do miométrio, e 34% em tumores indiferenciados (G3), com invasão até o terço externo²⁷.

O sistema de estadiamento atual inclui a avaliação cirúrgica do grau de diferenciação tumoral, o conhecimento da invasão miometrial e cervical, a análise dos anexos uterinos (ovários e trompas de falópio) e dos linfonodos retroperitoniais e a citologia peritoneal. Para tanto, é recomendada a histerectomia total com anexectomia bilateral, lavados ou esfregaços da superfície peritoneal e a linfadenectomia pélvica e paraaórtica.

Em função dos poucos dados disponíveis, a FIGO não determinou regras que direcionassem a extensão da dissecação linfática. Isto tem determinado uma ampla variedade de opiniões e práticas em relação à linfadenectomia²⁸. A extensão deste procedimento pode variar desde a simples palpação transperitoneal com biópsia dos linfonodos aumentados, a amostragem dirigida de um ou dois linfonodos de determinada cadeia linfática e a dissecação completa dos nodos pélvicos e paraaórticos²⁹. Uma pesquisa sobre as estratégias terapêuticas utilizadas na prática diária de ginecologistas oncológicos demonstrou que 54% destes realizam sistematicamente a linfadenectomia retroperitoneal, 43.5% a fazem seletivamente após a individualização dos casos e 2.5% nunca a realizam³⁰. Isto porque a linfadenectomia sistemática é considerada, por alguns, um procedimento associado à morbidade significativa e com benefícios terapêuticos questionáveis.

Estádio I	Tumor limitado ao corpo uterino A - tumor limitado ao endométrio B - invasão menor ou igual a 50% do miométrio C - invasão maior que 50% do miométrio
Estádio II	Tumor invade a endocérvice A - envolvimento de glândulas endocervicais (sem invasão de estroma) B - envolvimento do estroma cervical
Estádio III	Tumor está além dos limites uterinos, porém restrito à pelve A - invasão da serosa e/ou anexos uterinos e/ou citologia peritoneal positiva B - metástases vaginais C - metástases para linfonodos pélvicos e/ou paraaórticos
Estádio IV	Tumor invade órgãos vizinhos ou metástases à distância A - invasão da bexiga e/ou mucosa do intestino B - metástases à distância

Figura 2 – Sistema de Estadiamento Cirúrgico da Neoplasia Endometrial (FIGO, 1988)

1.4 FATORES PROGNÓSTICOS DE USO CORRENTE

Vários fatores prognósticos têm sido utilizados para predizer o curso clínico das pacientes com neoplasia endometrial. Estes podem ser convenientemente divididos em variáveis clínicas e patológicas.

1.4.1 Variáveis clínicas

Entre as variáveis clínicas, incluem-se a idade e o grupo racial.

A idade parece ser uma variável prognóstica importante. O Gynecologic Oncology Group (GOG) reportou taxas de sobrevida em 5 anos, para doença em E I e II, que variam com a idade: 96% até os 50 anos, 87.3% dos 51 aos 60 anos, 78% dos 61 aos 70 anos, 70.7% dos 71 aos 80 anos e de 53.6% para pacientes com mais de 80 anos³¹. Diversos estudos têm demonstrado que mulheres mais jovens tendem a ter lesões mais bem diferenciadas do que as idosas. Cristopherson e col.³² reportaram uma taxa de sobrevida em 10 anos de 95% para mulheres com idade inferior a 50 anos e com doença no E I. Os mesmos autores relataram que mulheres idosas têm tumores endometriais mais indiferenciados e em estágio mais avançado quando comparadas a pacientes mais jovens³³.

Em relação à raça, também, tem se evidenciado uma disparidade na sobrevida. Nos Estados Unidos, mulheres da raça negra têm chance de morte por

câncer endometrial maior do que mulheres brancas³. Enquanto a taxa de mortalidade entre mulheres brancas é de 3.9/100.000, em mulheres negras temos cifras quase duas vezes maiores (7/100.000)². Entre as possíveis explicações para isto incluem-se: retardo diagnóstico, conseqüente à desinformação e dificuldade de acesso aos serviços médicos; maior incidência de tumores endometriais de pior prognóstico (p.e., tipo não endometrióide) e alterações biomoleculares (i.e, expressão de p53 e HER-2/neu, aneuploidia e alto índice proliferativo)³⁴.

1.4.2 Variáveis patológicas

As variáveis patológicas são obtidas, primariamente, através do fragmento endometrial diagnóstico e complementadas pela análise do espécime cirúrgico. São, classicamente, definidas pelo tipo histológico, grau de diferenciação tumoral, profundidade de invasão miometrial e estadiamento cirúrgico.

O tipo histológico influencia marcadamente a sobrevida. Um estudo retrospectivo de pacientes tratadas na *Mayo Clinic* demonstrou taxas de sobrevida em 5 anos para tumores endometrióides de 92% e de apenas 33% para pacientes com lesões não endometrióides³⁵. Sabe-se que os tumores não endometrióides, particularmente os papilares serosos e os de células claras, são mais agressivos que os tumores endometrióides de mesmo estágio¹⁵. Frequentemente, estes tumores apresentam-se com doença extra-uterina ao tempo do diagnóstico, mesmo na presença de limitada invasão miometrial e isto explica, em parte, a menor

sobrevida³⁶. Em uma série de 50 casos de tumores papilares serosos, reportada por Goff e col.³⁷, 14 pacientes (28%) não apresentavam invasão miometrial. Entre estas, aproximadamente 36% tinham metástases linfonodais, 43% doença intraperitoneal e 50% apresentavam lavados peritonias positivos. Portanto, nestes tumores, a relação entre profundidade de invasão miometrial e doença extra-uterina faz-se de maneira desproporcional³⁶. Lesões do tipo adenocarcinoma com elemento escamoso maligno (tumores adenoescamosos) tendem a ser menos diferenciadas e apresentar pior prognóstico. Tem se observado taxa de sobrevida em 5 anos de somente 19%, valor este muito inferior ao encontrado em adenocarcinomas endometrióides típicos⁹.

A invasão miometrial é o mais importante marcador prognóstico e de recorrência à distância para pacientes com doença em E I, definida por estadiamento completo (linfonodos retroperitoneais negativos)³⁸. Em particular, a invasão do terço externo do miométrio é o maior preditor de disseminação hematogênica da doença. Em estudo de Mariani e col.³⁹, para pacientes estadiadas cirurgicamente e com doença restrita ao corpo uterino (E I), somente 2% das pacientes com invasão miometrial inferior a 66% apresentaram metástase à distância e morte aos cinco anos, em comparação com 29% de falha à distância e 22% de morte aos cinco anos, com invasão maior ou igual a 66%. Também, o grau de invasão miometrial relaciona-se diretamente com a chance de propagação linfonodal da doença. Em um estudo prospectivo do GOG, Creasman e col.²⁷ demonstraram que a incidência de metástase linfonodal variou de 1% na ausência de invasão miometrial a 35% quando de invasão miometrial profunda.

O grau de diferenciação tumoral (G) é considerado variável prognóstica de extrema importância. Os tumores de tipo endometrióide são classificados em bem diferenciados (G1), moderadamente diferenciados (G2) e indiferenciados (G3). Os adenocarcinomas não endometrióides são, em geral, lesões indiferenciadas ou de alto grau. Existe uma associação direta entre tumores indiferenciados, invasão miometrial profunda e prognóstico. Lesões G1 confinadas ao terço interno do miométrio têm propagação linfonodal na ordem de 3%, enquanto que, nas lesões G3, que comprometem mais de dois terços do miométrio, a propagação linfática chega a 34%^{10,27}.

O estadiamento cirúrgico é o mais importante marcador de recorrência e morte pela doença. A presença de metástase linfonodal, seja na cadeia linfática pélvica ou paraaórtica – o que caracteriza doença no estágio IIIC – é o fator independente mais importante^{23,40}. Um estudo prospectivo conduzido pelo GOG observou que 50% de todas as recorrências aconteceram em pacientes com comprometimento linfonodal. Além de marcador prognóstico, discute-se a função terapêutica da linfadenectomia retroperitoneal (pélvica e paraaórtica). Kilgore e col.⁴¹ relataram uma sobrevida significativamente maior ($p = 0.0002$) para pacientes submetidas à linfadenectomia pélvica completa (número médio de linfonodos = 11) em comparação àquelas submetidas somente a amostragem linfática (número médio de linfonodos = 4). Mohan e col.⁴² encontraram taxas elevadas de sobrevida em 10 e 15 anos (94% e 96%, respectivamente) para pacientes com doença em E I submetidas à linfadenectomia pélvica completa (número médio de linfonodos = 33). Já a citologia peritoneal positiva, como achado isolado, apesar de se constituir em um estágio IIIA, parece não se associar a prejuízo significativo na sobrevida⁴³.

Embora os fatores prognósticos clássicos orientem adequadamente sobre o risco de recorrência e morte, não é raro, que alguns casos de doença aparentemente indolente e curável, venham a recidivar. O contrário também é verdadeiro, por exemplo, tumores G3 com invasão profunda do miométrio, evoluem sem recidivas.

A subjetividade e a limitação da interpretação patológica representam possíveis limitações às abordagens prognósticas correntes. Presumivelmente, a disseminação e a recorrência precoces, a refratariedade ao tratamento e a curta sobrevida refletem características biológicas diferenciadas do tumor. Assim, a busca de novos indicadores do potencial maligno das neoplasias endometriais parece ser necessária.

1.5 BIOLOGIA MOLECULAR

Esforço considerável tem sido investido na identificação e avaliação das alterações genéticas e moleculares presentes nas neoplasias em geral e no carcinoma endometrial, em particular, e na maneira como se relacionam com o estadiamento e prognóstico da doença.

Nos últimos vinte anos, pesquisas na área da oncologia têm demonstrado que o câncer é essencialmente uma doença genética. Uma célula normal torna-se uma

célula tumoral como resultado de uma série de mutações em genes importantes no controle do ciclo celular, da morte e proliferação celular⁴⁴.

Diferente das demais síndromes genéticas, como a fibrose cística e a hemofilia, onde se pode definir a(s) mutação(ões) de um único gene, as neoplasias surgem a partir dos efeitos de uma série de alterações gênicas que ocorrem de forma independente ou em associação^{44,45,46}.

Acredita-se que três tipos de genes estejam envolvidos no processo de transformação maligna: oncogenes, genes supressores tumorais e genes de reparo do DNA. Os primeiros são protooncogenes inapropriadamente ativados e que atuam positivamente sobre a proliferação e o crescimento celular. Os genes supressores tumorais retardam o crescimento ou a replicação celular frente a danos no genoma e os genes de reparo do DNA são responsáveis pela detecção e correção de erros no DNA⁴⁴. Para que ocorra a transformação neoplásica, é necessário, além da presença gênica, sua ativação ou inativação, mutação, amplificação e/ou expressão do seu conteúdo protéico de forma normal, excessiva ou mutada. O resultado destas alterações define o comportamento e a expressão fenotípica neoplásica.

Enquanto o controle da proliferação celular é uma etapa já bastante entendida no processo de carcinogênese, alguns estudos sugerem que alterações na taxa de morte celular podem ser igualmente importantes⁴⁵. De uma maneira genérica, pode-se dizer que o crescimento tumoral é determinado por três fatores principais: a. a duração do ciclo celular; b. o percentual de proliferação celular e c. o percentual de morte celular (apoptose). A relação entre a proliferação e a apoptose determina o

quão rápido o tumor irá crescer. Algumas células neoplásicas se dividem mais lentamente do que as células normais; no entanto, o tumor continua a se expandir em razão do prolongamento da vida de suas células. O índice de renovação celular (mitose e apoptose em 10 campos de grande aumento) parece ter utilidade na análise de linfomas e em outros tumores sólidos, como, por exemplo, o carcinoma de próstata. Com estes dados pode-se dizer que os genes que regulam a apoptose são tão importantes na patogênese molecular e genética da neoplasia como são os oncogenes e os genes de supressão tumoral.

Desde que Silverman e col.⁴⁷, em artigo pioneiro, reconheceram uma série de mutações no DNA da célula endometrial, resultando em uma célula neoplásica, muito tem se acrescentado ao conhecimento da biologia molecular deste tumor. O câncer endometrial é acessível à avaliação molecular por várias razões. Primeiro, apresenta um componente pré-maligno; segundo, existem tipos histológicos distintos e, portanto, diferentes expressões gênicas e terceiro, é acessível para amostragem histológica⁴⁴.

Entre os genes descritos na neoplasia endometrial, incluem-se o *c-fms*, *HER-2/neu*, *ras*, *P53* e o *Bcl-2*. Muito se discute sobre o impacto clínico do conhecimento de tais marcadores. Estudos recentes têm sugerido que alguns destes possam ser tão ou mais importantes do que os indicadores prognósticos convencionais⁴⁸.

1.5.1 Gene e proteína p53

O p53 é um gene (*P53*) localizado no braço curto do cromossoma 17 e codifica uma fosfoproteína nuclear de 53 kilodaltons (kda), a proteína p53. É considerado um gene supressor tumoral, uma vez que, frente a agressões à célula, determina parada do processo de divisão celular e, em situações de dano grave, induz à morte celular programada (MCP) ou apoptose⁴⁶.

As transições do ciclo celular são reguladas por uma ampla variedade de sinais que desencadeará o prosseguimento do ciclo de determinada célula. Os controladores dos pontos de checagem informam sobre a integridade do genoma. Quaisquer danos ou mutações, sejam ocasionados por fatores externos, como drogas, irradiação ou infecção viral ou por falhas intrínsecas no mecanismo mitótico, são sinais de alerta que levam à parada na progressão do ciclo. O *P53*, através do seu produto protéico (a proteína p53), é considerado essencial na detecção de eventuais falhas existentes no DNA da célula prestes a se dividir, impedindo que estas se propaguem à linhagem celular subsequente. Uma vez identificada a existência de uma anormalidade no DNA da célula em divisão, a proteína p53 promove uma parada do ciclo celular na fase G1, bloqueando a entrada na fase S. A partir deste momento, dois caminhos poderão ser seguidos: o reparo da lesão no DNA ou, havendo dano grave ao genoma, a p53 pode então acionar eventos apoptóticos e levar a célula danificada à destruição⁴⁶.

O *P53* encontra-se mutado em aproximadamente 50% das neoplasias humanas⁴⁶. As mutações parecem inativar o efeito regulador negativo do *P53* sobre

a proliferação celular conferindo maior poder de divisão a estas células⁴⁹. A perda da função do gene *P53* está associada, portanto, a aumento da atividade proliferativa e progressão tumoral. Aproximadamente 80% destas mutações são do tipo *missense*. Estas determinam a alteração estrutural da proteína p53 em razão da substituição de um aminoácido por outro com perda funcional e acúmulo no núcleo das células afetadas⁵⁰. Estas mutações são freqüentemente associadas com deleção do outro alelo p53⁵¹. A mutação do *P53* poderá ocorrer precocemente na tumorigênese (p.e, displasia leve de esôfago, mama e pulmão), mas a fração de tumores com *P53* alterado é predominante nos estádios avançados⁵⁰.

Existem comercialmente disponíveis dois métodos principais para detecção da proteína p53 nos tecidos normais ou neoplásicos e para determinação de mutações no gene *P53*, são eles o método de imunistoquímica (imh) e a amplificação do DNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR), respectivamente⁴⁶. Cabe salientar que a imunistoquímica é a técnica mais utilizada. É de fácil execução, baixo custo e permite o aproveitamento de material biológico conservado em parafina.

A proteína p53 (selvagem/normal) é expressa em níveis baixos na maioria dos tecidos fetais e adultos normais e tem uma meia vida de somente 5 a 45 min, não se acumulando em níveis detectáveis por métodos de imunistoquímica. Mutação *missense* no gene *P53* resulta em proteína com meia-vida de 4 a 8h, portanto, muito mais longa do que a meia vida normal. O aumento da meia vida permite que esta proteína se acumule no núcleo das células afetadas e, portanto, que seja detectável na avaliação imunistoquímica. Células normais têm níveis

baixos da p53 selvagem que são indetectáveis por métodos correntes de imunohistoquímica. A p53 somente é detectável em células malignas²⁰. Ocasionalmente, identificam-se tumores que são p53 positivos à leitura imh, mas não carregam mutações gênicas do tipo *missense*, sendo a estabilidade da p53 resultante de outros mecanismos, tais como a ligação a proteínas celulares. Kounelis e col.²⁶ confirmaram esta hipótese ao observar que, nos adenocarcinomas endometrióides, a superexpressão (acúmulo) da proteína p53 ocorreu sem a presença de mutação no gene. Houve positividade imh em 21 a 52% destes tumores, mas somente em 14 a 23% evidenciou-se a alteração gênica. Em estudo de Tashiro e col.⁵², os adenocarcinomas de endométrio do tipo papilar seroso, naturalmente de comportamento mais agressivo, a expressão da p53 correlacionou-se diretamente à mutação gênica. Entre 53 e 90% destes carcinomas apresentavam mutações no gene, inclusive já detectadas na forma de lesões intra-epiteliais. Resultado este similar ao obtido no estudo de Sakuragy e col.⁵³, que demonstrou a presença de mutação no *P53* em 38.9% dos adenocarcinomas endometrióides e em 60% dos tumores serosos.

Os níveis de p53 são indetectáveis com mutações do tipo *frameshift* ou *nonsense*, uma vez que estas alterações produzem proteínas truncadas ou instáveis. Entretanto, esta categoria de mutações constitui menos de 20% das mutações do *P53* descritas nos tumores humanos.

Não é claro, portanto, diante dos dados expostos, que o acúmulo de proteína p53 relacione-se perfeitamente à mutação gênica ou, que de uma maneira inversa, a

ausência de imunorreatividade exclua mutações no gene, principalmente quando estas referem-se às dos tipos *nonmissense*.

O papel da acúmulo da proteína p53 detectada por imunoistoquímica e sua utilidade como fator prognóstico na neoplasia maligna endometrial tem sido investigada.

Geisler e col.²⁰, investigando a expressão da proteína p53 em 46 pacientes com neoplasia endometrial e sua relação com alguns indicadores prognósticos, verificaram que a expressão de p53 era mais freqüente em subtipos histológicos mais agressivos, tumores mais indiferenciados e estádios mais avançados da doença. Este estudo não demonstrou uma relação entre expressão de p53 e profundidade de invasão miometrial.

Hamel e col.⁵⁴ estudaram o valor da expressão da proteína p53 como indicador prognóstico de sobrevida, a longo prazo, em pacientes com neoplasia endometrial submetidas a tratamento cirúrgico primário e radioterapia adjuvante conforme os critérios histopatológicos tradicionais. Os resultados encontrados nas 221 pacientes analisadas demonstram uma significativa relação da expressão da p53 com fatores de mau prognóstico (i.e. estágio avançado, grau de diferenciação tumoral, invasão miometrial e tipo histológico não endometrióide) e prejuízo na sobrevida livre de doença.

Um estudo de Kohler e col.³⁴, com 179 casos de adenocarcinoma endometrial em estádios avançados (III e IV), demonstrou a expressão da p53 em 35% dos

casos. Esta expressão foi significativamente menos freqüente em pacientes com doença em estágio IIIA às custas de citologia peritoneal positiva (9/58, 16%) comparada àquelas com evidência histológica de metástase (53/121, 44%) ($p < 0.001$). Em um estudo anterior, do mesmo autor, com 107 casos, encontrou-se uma freqüência de expressão de p53 de 20% do total dos casos (9% nos estádios I e II e 41% nos estádios III e IV) e uma associação direta com indiferenciação histológica, estágio avançado, tipo histológico não endometrióide e diminuição de sobrevida⁵⁵. Isto não foi confirmado em análise multivariada, em estudo publicado posteriormente⁵⁶.

Toshihiro e col.⁴⁸ estudaram o significado prognóstico do bcl-2, p53 e metástases linfonodais em pacientes com neoplasia de endométrio estagiadas cirurgicamente. Neste estudo, demonstrou-se que o p53 pode ser tão importante como marcador de mau prognóstico quanto à presença de metastáse linfonodal. A expressão da p53 foi significativamente relacionada à sobrevida para pacientes em estádios III e IV. As taxas de sobrevida nestas pacientes com p53 negativo foram de 70%, enquanto para pacientes com p53 positivo (expressão presente em mais de 50% dos núcleos das células tumorais) a sobrevida foi de somente 40%.

Estudo de Zheng e col.⁵¹ encontrou 71.4% de imunopositividade de p53 em tumores papilares serosos em comparação com 38.1% para tumores endometrióides de endométrio, dados com significância estatística. Além disso, nos tumores papilares serosos, não houve diferença na expressão quando os tumores foram estratificados por estágio.

A maioria dos estudos sobre a relação entre a expressão da proteína p53, seu valor prognóstico independente e tempo de sobrevida têm resultados conflitantes. Séries maiores são necessárias para que se possa alcançar a resposta definitiva. Geisler e col.²², usando a técnica de imunistoquímica, determinaram que a expressão de p53 pode ser um dos eventos iniciais da carcinogênese endometrial e um fator prognóstico independente para tempo de sobrevida em cinco anos. Em um estudo de Kohler e col.³⁴, a expressão de p53, em análise multivariada, foi um fator associado com menor tempo de sobrevida, e este efeito foi independente da idade, estadiamento e grau histológico. Bancher-Todesca e col.⁵⁷, analisando a expressão da p53 em 23 pacientes com tumores endometriais de subtipo histológico papilar seroso, evidenciaram que os casos cujos tumores expressavam esta proteína tiveram tempo de sobrevida inferior àqueles negativos. Devido ao número pequeno de casos, não se comprovou ser esta diferença significativa em análise multivariada.

Definir o papel da expressão da proteína p53 na neoplasia endometrial é passo importante para o esclarecimento do processo de carcinogênese. A sustentação desta proteína como marcador prognóstico e de sobrevida poderá definir novas estratégias na abordagem terapêutica destas lesões.

1.5.2 Gene e proteína bcl-2

O gene *Bcl-2* (B – Cell Lymphoma 2) codifica uma proteína de mesmo nome (bcl-2), com 25 a 26 kda, localizada na membrana mitocondrial, retículo

endoplasmático e membrana nuclear⁵⁸. Foi descoberto, em 1984, pela análise e identificação da translocação 14;18 (q32,q21) no cromossoma 18. A expressão deste gene inibe a apoptose em vários sistemas celulares e em condições fisiológicas e neoplásicas. Além desta função, já bem estabelecida, discute-se o papel do *Bcl-2* sobre o controle do ciclo celular, inibindo a transição entre as fases G0/G1 e S e a fase G2/M. Esta alteração é a responsável pelos baixos índices de proliferação celular vistos em alguns tumores⁵⁹.

A apoptose, primariamente descrita por Kerr, em 1972, é definida como uma alteração morfológica que culmina em morte celular. À microscopia eletrônica caracteriza-se por condensação da cromatina densa e fragmentação celular. O processo resulta na formação de corpos apoptóticos que são rapidamente fagocitados por leucócitos ali presentes, permitindo a manutenção da integridade dos tecidos. Em contraste com a necrose, a apoptose não induz à resposta inflamatória⁴⁵.

A regulação da apoptose é fundamental nos processos de embriogênese, na manutenção da homeostase tecidual na vida adulta, na remoção das células senescentes, na deleção de células com dano genético e na eliminação das células consideradas inadequadas para prosseguimento do ciclo celular. Ademais, tem importância na transformação neoplásica de alguns órgãos. Pode ser encontrada em todos os tumores malignos não tratados. Os fatores responsáveis pela sua ocorrência espontânea são diversos. Frequentemente, é proeminente próximo a um foco confluyente de necrose, onde uma isquemia leve parece estar envolvida na sua iniciação. Através da observação que o fator de necrose tumoral-alfa tem induzido

apoptose em células tumorais *in vitro*, acredita-se que a liberação desta citocinina ocorra também em tumores *in vivo*, através da infiltração tumoral por macrófagos. No entanto, o aumento da apoptose em tumores é, principalmente, o resultado de processos intrínsecos da célula tumoral. As taxas de apoptose são células-específicas, diferindo entre si conforme a expressão combinada de diferentes oncogenes. Estímulos apoptóticos, particularmente os provenientes de drogas citotóxicas ou radioionizantes, alterando as taxas espontâneas de morte, são de extrema importância quando se analisa o comportamento tumoral frente ao tratamento. O efeito apoptótico das drogas anticâncer é responsável pela regressão tumoral. Clones tumorais capazes de resistir a MCP e de se perpetuar são clones quimio ou rádio-resistentes⁶⁰.

Os mecanismos que levam a MCP são regulados por um grande número de genes. A forma como relacionam-se e interagem entre si influencia as taxas de proliferação celular e morte. Por esta razão, definir de forma compreensiva a via de apoptose é sempre difícil e, muitas vezes, impossível. Os genes mais freqüentemente envolvidos são o *Bcl-2* e genes homólogos a ele (*Bax*, *Bcl-xl*, *Bcl-xs*), além de *c-myc*, *v-abl*, *v-rel* e *v-ras* e o *P53*⁴⁶.

A forma pela qual o *Bcl-2* inibe a apoptose não é clara. Hockenbery e col. localizaram a proteína bcl-2 na membrana mitocondrial e sugeriram que a proteção contra a apoptose fosse em decorrência da alteração na função mitocondrial. Outros autores sugerem que a inibição da apoptose, vista como superexpressão da proteína bcl-2, possa ser decorrente da alteração na distribuição do Ca⁺ intracelular, uma vez que a supressão da fragmentação do DNA (um marcador da apoptose),

está associada com decréscimo nos níveis de Ca^{+} do citosol e seu aumento na mitocôndria⁶¹.

Altos níveis da proteína bcl-2, sem associação com alterações estruturais grosseiras no gene *Bcl-2*, têm sido descritos em uma grande variedade de tumores, incluindo os neuroblastomas e carcinomas do pulmão, próstata, cólon e nasofaringe⁶². Translocações ou outros tipos de alterações morfológicas no gene ocorrem somente em linfomas ou tipos raros de leucemia⁶³. É, desta forma, a aberração cromossômica mais comum nos linfomas não-Hodgkin (30%), alcançando taxas de 70-80% nos linfomas foliculares⁶¹.

A importância da bcl-2 no desenvolvimento e no prognóstico das doenças neoplásicas é assunto ainda não totalmente esclarecido. Exemplos demonstram sua expressão associada a um curso clínico mais favorável em alguns tipos de câncer de pulmão e de mama e, ao contrário, em tumores de próstata e neuroblastomas. As anormalidades na expressão de bcl-2 podem ocorrer precoce ou tardiamente no processo oncogênico. No adenocarcinoma de cólon e reto, por exemplo, a perda do gradiente normal de expressão de bcl-2 ocorre em pólipos pré-neoplásicos, sugerindo ser este um evento precoce no desenvolvimento tumoral. Ao contrário, os tumores de próstata expressam bcl-2 em uma fase tardia, normalmente em associação com doença metastática⁶³.

O padrão e o significado da expressão da bcl-2 na doença do endométrio é incerto. Gompel e col.⁶⁴ descreveram variações da bcl-2 no endométrio normal durante o ciclo menstrual. Parece que sua expressão é máxima durante a fase

proliferativa e desaparece no início da fase secretora, sugerindo uma regulação hormonal. Otsuki e col.⁶⁵ demonstraram que o padrão cíclico de expressão da bcl-2 é resultante da influência hormonal ovariana e é diretamente relacionado a imunorreatividade para receptores de estrogênio (RE) e progesterona (RP). Em relação ao endométrio pós-menopáusico, Morsi e col.⁵⁸, utilizando método de análise de citometria de fluxo, evidenciaram reatividade para a bcl-2 com inibição da apoptose e ausência de atividade proliferativa, o que reflete seu estado inativo.

A expressão da bcl-2, relativamente alta no endométrio normal, diminui gradualmente nas hiperplasias típicas, atípicas e carcinoma^{66,67}. Ademais, a significativa relação com receptores hormonais vista no endométrio normal e hiperplásico perde-se nos carcinomas, restando somente uma tênue afinidade com os RP. Especula-se, desta forma, que o mecanismo de regulação da bcl-2, no tecido neoplásico endometrial, é muito mais complexo, sendo, muito provavelmente, influenciado pela ação de diversas proteínas reguladoras⁶⁸.

O padrão de expressão do *Bcl-2 in vivo* é determinado utilizando-se técnicas de imunistoquímica, hibridização *in situ* ou ambas⁶³. A detecção da proteína bcl-2 tem sido feita, na maioria dos estudos, por imunistoquímica. Esta técnica permite utilização de material conservado em parafina. Apesar de alguns relatos denunciando a perda de qualidade, quando da utilização de material histológico nestas condições, é possível, desta forma, estudar casos retrospectivos^{26,69,70}. Na leitura do exame imunistoquímico, a coloração poderá ser citoplasmática ou nuclear.

Alguns estudos têm demonstrado que a expressão citoplasmática da bcl-2 no carcinoma endometrial relaciona-se a fatores prognósticos favoráveis. De uma forma geral, associam-se à expressão citoplasmática aumentada da bcl-2, os tumores endometriais em estádios iniciais (E I e II), bem diferenciados, com invasão miometrial superficial ou incipiente. Ao contrário, a expressão nuclear parece se relacionar com tumores avançados, comprometimento linfonodal e diminuição da sobrevida⁷¹. São poucos os estudos que exploram os dados decorrentes da expressão nuclear da bcl-2. De uma forma geral, quando se comenta, na literatura corrente, sobre a expressão imunohistoquímica da proteína bcl-2, a coloração vista é invariavelmente citoplasmática.

A literatura é rica em estudos que tentam associar a expressão da bcl-2 aos clássicos fatores prognósticos endometriais. Yamuchi e col.⁷² demonstraram uma alta expressão citoplasmática da bcl-2 nos tumores em estágio I e com RE positivos comparado às lesões RE negativas e em estágio mais avançado. Coppola e col.⁶⁷ observaram a presença da bcl-2 em 90% dos tumores de baixo grau (estádio I e II) e em 50% dos tumores de alto grau (estádio III e IV). Kounelis e col.²⁶ encontraram, em seus estudos, a bcl-2 expressa em 75% dos tumores endometriais em estádios precoces contra 55% de expressão nos tumores avançados ($p=0,07$). Uma possível explicação para estes achados é a de que quando ocorre um aumento da apoptose devido à diminuição da bcl-2, aumenta, também, a proliferação celular. Portanto, a perda da bcl-2 pode se correlacionar a tumores de alto grau e alto índice proliferativo^{58,67}. A redução de imunopositividade da bcl-2 observada em tumores de alto grau, sugere que o papel da inibição da apoptose é menos importante em fases avançadas do tumor. Parece que, nos estádios iniciais, a perpetuação de células

pela expressão de bcl-2 permite que estas adquiram outras anormalidades gênicas que conduzam à transformação neoplásica. Uma vez que as células expressem mutações em oncogenes ou genes supressores tumorais, tais como o *P53*, adquirindo fenótipo neoplásico, a proteína bcl-2 passa a ser de pouca relevância e pode ser inativada por mecanismos celulares que modificam ou diminuem a sua expressão^{26,71}.

Kokawa e col.⁷³, analisando o comportamento da bcl-2 em tumores endometriais de subtipos histológicos distintos, observaram que a imunorreatividade para esta proteína estava aumentada nos endometrióides e diminuída ou ausente nos não endometrióides. Geisler e col.⁷⁴ demonstraram resultados semelhantes - expressam bcl-2, 44% dos tumores endometrióides e 23.1% dos não endometrióides (p (0,001). Miturski e col.⁷⁰, ao contrário, não encontraram nenhuma associação com tipo histológico e profundidade de invasão miometrial.

A persistência da bcl-2 parece se relacionar a tumores endometriais bem diferenciados⁶⁸. No entanto, esta observação não tem sido comprovada em alguns estudos. Sakuragi e col.⁷¹ não definiram de maneira absoluta a positividade a bcl-2 e maior diferenciação tumoral. Giatromanolaki e col.²¹, Chhieng e col.⁷⁵ e Miturski e col.⁷⁰ também não observaram nenhuma relação deste marcador com grau tumoral. Achados discordantes também são encontrados na avaliação da profundidade de invasão miometrial e sua relação com a bcl-2^{68,70,71,73}.

A associação da expressão da bcl-2 com a sobrevida é assunto ainda controverso. Utilizando-se análise univariada fica evidente que a imunopositividade

para bcl-2 parece estar relacionada a tumores endometriais de bom prognóstico e boa chance de sobrevida em 5 anos^{48,76}. Geisler e col.⁷⁴ e Sakuragi e col.⁷¹ demonstraram que a persistência da bcl-2 se constitui também em fator prognóstico independente em análise multivariada ($p = 0,012$ e $p = 0,0398$, respectivamente). No entanto, Coppola e col.⁶⁷ não demonstraram uma relação significativa da expressão bcl-2 e sobrevida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DE LITERATURA

- 1 American Cancer Society. Cancer reference Information. Disponível em <<http://www.cancer.org>>. Acesso em nov. 2004.
- 2 National Cancer Institute. SEER cancer statistics review, 1975-2001. Disponível em <<http://www.nci.nih.gov>>. Acesso em nov. 2004.
- 3 Lignieres B, Moyer DL. Influence of sex hormones on hyperplasia/carcinoma Risks. In: Lobo RA. Treatment of the postmenopausal women. Philadelphia: Lippincott – Raven Publishers; 1996.
- 4 Cará PR. Incidência das neoplasias endometriais em Caxias do Sul, Brasil, 1995-1996. São Paulo: USP; 1999. 136 p. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, Departamento de Saúde Materno-Infantil. São Paulo; 1999.
- 5 Faria SL, Ferrigno R. Câncer do endométrio: tratamento adjuvante pélvico apenas com radioterapia externa após cirurgia sem linfadenectomia. Brasils. 28.08.2001. Disponível em <<http://www.inca.org.br/rbc/n45/v03/artigo1.html>>.

6 Rodrigues da Silva SR, Simões SCB. Estudo do perfil das portadoras de adenocarcinoma de endométrio do Hospital de Câncer de Pernambuco e verificação e análise dos principais fatores de risco. Trabalho apresentado no XIII Encontro da Associação Brasileira de Estudos Populacionais, 2002.

7 Leite MLJG. Análise da tendência temporal da mortalidade por câncer de endométrio da população feminina residente no Estado de São Paulo – 1980 a 1998. São Paulo: USP; 2003. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, Departamento de Saúde Materno-Infantil. São Paulo; 2003. 114p.

8 Rivoire W, Mônico H, Appel M. neoplasias do corpo uterino. In: Freitas F, Menke CH, Rivoire W, Passos EP. Rotinas em Ginecologia. 4. ed. Porto Alegre: Artmed; 2001.

9 Herbst AL. Neoplastic diseases of the uterus. In: Herbst AL, Mishell DR, Stenchever MA, Droegemueller W. Comprehensive Gynecology. 2nd edition. St. Louis: Mosby Year Book; 1992.

10 Hacker NF. Uterine Cancer. In: Berek JS, Hacker NF. Practical Gynecologic Oncology. 3rd edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2000.

11 Garcia MGM, Carvalho MGF, Garcia MM. Análise dos fatores de risco em pacientes com adenocarcinoma endometrial. *Reprod Clin* 1998; 13(4): 232-6.

12 Catelan MF, Nisida ACT, Almeida Júnior O, Ricci MD et al. Câncer de endométrio: epidemiologia, tratamento e sobrevida. Rev Ginecol Obstet 1998; 9(3): 140-4.

13 Park RC, Gribbsby PW, Muss HB, Norris HJ. Corpus: Epithelial tumors. In: Hoskins WJ, Perez CA, Young RC. Principles and practice of gynecologic oncology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 1992.

14 Fanning J. Long-term survival of intermediate risk endometrial cancer (stage IG3, IC, II) treated with full lymphadenectomy and brachytherapy without teletherapy. Gynecol Oncol 2001; 82: 371-4.

15 Burton JL, Wells M. Recent advances in the histopathology and molecular pathology of carcinoma of the endometrium-review. Histopathol 1998; 33: 297-303.

16 Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Global cancer statistics. CA Cancer J Clin 1999; 49: 33-64.

17 Lima GR, Gonçalves WJ, Oliveira VC. Endométrio: Propagação e estadiamento. In: Rodrigues de Lima G, Gebrim LH, Oliveira VC, Martins NV. Ginecologia Oncológica. São Paulo: Atheneu; 1999.

18 Boyd J. Molecular biology in the clinicopathologic assessment of endometrial carcinoma subtypes – Editorial. Gynecol Oncol 1996; 61: 163-5.

19 Stávale JN. Endométrio: aspectos morfológicos. In: Rodrigues de Lima G, Gebrim LH, Oliveira VC, Martins NV. Ginecologia Oncológica. São Paulo: Atheneu; 1999.

20 Geisler JP, Wiemann MD, Zhou Z, Miller GA, Geisler HE. p53 as a prognostic indicator in endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 1996; 61: 245-8.

21 Giatromanolaki A, Sivridis E, Koukourakis MI, Harris AL, Gatter KC. *Bcl-2* and p53 expression in stage I endometrial carcinoma. *Anticancer Res* 1998; 18: 3689-94.

22 Geisler JP, Geisler HE, Wiemann MD, Zhou Z, Miller GA, Crabtree W. p53 expression as a prognostic indicator of 5-year survival in endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 1999; 74: 468-71.

23 Cirisano FD, Robboy SJ, Dodge RK, Bentley MD, Krigman HR et al. The outcome of stage I-II clinically and surgically stages papillary serous and clear cell endometrial cancers when compared with endometrioid carcinoma. *Gynecol Oncol* 2000; 77: 55-65.

24 Bohkman JV. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 1987; 15: 10-7.

25 Verh Dstch Ges L, Kurman RJ. A dualistic model of endometrial carcinogenesis based on immunohistochemical and molecular genetic analysis. *Path* 1997; 81: 228-32.

26 Kounelis S, Kapranos N, Kouri E, Coppola D, Papadaki H, Jones M. Immunohistochemical profile of endometrial adenocarcinoma: a study of 61 cases and review of the literature. *Mod Pathol* 2000; 13(4): 379-88.

27 Creasman WT, Morrow CP et al. Surgical pathologic spread patterns of endometrial cancer: A Gynecologic Oncology Group Study. *Cancer* 1987; 60: 2035-41.

28 Podratz C, Mariani A, Webb MJ. Staging and therapeutic value of lymphadenectomy in endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 1998; 70: 163-4.

29 Tang X et al. Clinicopathological factors predicting retroperitoneal lymph node metastasis and survival in endometrial cancer. *Jpn J Clin Oncol* 1998; 28(11): 673-8.

30 Orr JW. Surgical staging of endometrial cancer: does the patient benefit? *Gynecol Oncol* 1998; 71: 335-9.

31 Zaino RJ, Kurman RJ, Diana KL, Morrow CP. Prognostic models to predict outcome for women with endometrial adenocarcinoma. *Cancer* 1996; 77: 1115-21.

32 Cristopherson WM, Connelly PJ, Alberhansky RC. Carcinoma of the endometrium: an analysis of prognosticators in patients with favorable subtypes and stage I disease. *Cancer* 1983; 51: 1705.

33 Cristopherson WM, Connelly PJ, Alberhansky RC. Carcinoma of the endometrium: a clinicopathology study of clear cell adenocarcinoma and secretory carcinoma. *Cancer* 1982; 49: 1511.

34 Kohler MF, Carney P, Dodge R, Soper J, Clarke-Pearson D et al. Gynecology: p53 overexpression in advanced-stage endometrial adenocarcinoma. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 175(5): 1246-52.

35 Wilson TD, Podratz KC, Gaffey TA, Malkasian GD, O'Brien PC, Naessens JM. Evaluation of unfavourable histologic subtypes in endometrial adenocarcinomas. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 162: 418-26.

36 Cirisano FD, Robboy SJ, Dodge RK, Bentley MD, Krigman HR et al. Epidemiologic and surgicopathologic findings of papillary serous and clear endometrial cancers when compared to endometrioid carcinoma. *Gynecol Oncol* 1999; 74: 385-94.

37 Goff BA, Kato D, Schmidt RA, EK M, Ferry JA, Muntz HG et al. Uterine papillary serous carcinoma: patterns of metastatic spread. *Gynecol Oncol* 1994; 54: 264-8.

38 Morrow CP, Bundy BN, Kurman RJ, Creasman WT, Heller P et al. Relationship between surgical-pathological risk factors and outcome in clinical stage I and II carcinoma of the endometrium: a Gynecologic Oncology group study. *Gynecol Oncol* 1991; 40: 55-65.

39 Mariani A, Webb MJ, Keeney GL, Lesnick TG, Podratz KC. Surgical stage I endometrial cancer: predictors of distant failure and death. *Gynecol Oncol* 2002; 87: 274-0.

40 McMeekin DS, Lashbrook D, Gold M, Scribner DR, Kamelle S, Tillmanns TD, Mannel R. Nodal distribution and its significance in FIGO stage IIIC endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 2001; 82: 375-9.

41 Kilgore LC, Patridge EE, Alvarez RD, Austin JM, Shingleton HM et al. adenocarcinoma of the endometrium: survival comparisons of patients with and without pelvic node sampling. *Gynecol Oncol* 1995; 56: 29-33.

42 Mohan DS, Samuels MA, Selim MA, Shalodi AD, Ellis RJ, Samuels JR et al. Long-term outcomes of therapeutic pelvic lymphadenectomy for stage I endometrial adenocarcinoma. *Gynecol Oncol* 1998; 70: 165-71.

43 Preyer O, Obermair, A, Formann E, Schmid W, Perrin LC et al. The impact of positive peritoneal washings and serosal and adnexal involvement on survival in patients with stage IIIA uterine cancer. *Gynecol Oncol* 2002; 86: 269-73.

44 Mutch DG. Molecular characteristics of cancers: the way of the future? Editorial. *Gynecol Oncol* 2000; 77: 8-10.

45 Sheets EE, Yeh J. The role of apoptosis in gynecological malignancies. *Ann Med* 1997; 29: 121-6.

46 Rossi BM, Pinho M. *Genética e Biologia molecular para o cirurgião*. São Paulo: Lemar; 1999.

47 Silverman MB, Roche PC, Kho RM, Keeney GL, Li H, Podratz KC. Molecular and cytokinetic pretreatment risk assessment in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 2000; 77: 1-7.

48 Ohkouchi T, Sakuragi N, Watari H, Nomura E, Todo Y et al. Prognostic significance of bcl-2, p53 overexpression, and lymph node metastasis in surgically staged endometrial carcinoma. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 187 (2): 353-9.

49 Ito K, Watanabe K, Nasim S, Sasano H, Sato S et al. Prognostic significance of p53 overexpression in endometrial cancer. *Cancer Res* 1994; 54: 4667-70.

50 Harris CC, Hollstein M. Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *The N Engl J Med* 1993; 329(18): 1318-27.

51 Zheng W, Cao P, Zheng M, Kramer EE, Godwin TA. p53 overexpression and bcl-2 persistence in endometrial carcinoma: comparison of papillary serous and endometrioid subtypes. *Gynecol Oncol* 1996; 61: 167-74.

52 Tashiro H, Isacson C, Levine R, Kurman RJ, Cho KR, Hedrick L. p53 gene mutations are common in uterine serous carcinoma and occur early in their pathogenesis. *Am J Pathol* 1997; 150: 177-85.

53 Sakuragi N, Hirai A, Tada M, Yamada H, Yamamoto R, Fujimoto S, Moriuchi T. Dominant-negative mutation of p53 tumor suppressor gene in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 2001; 83: 485-90.

54 Hamel NW, Sebo TJ, Wilson TO, Keeney GL, Roche PC, Suman VJ et al. Prognostic value of p53 and proliferation cell nuclear antigen expression in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 1996; 62: 192-8.

55 Kohler MF, Kerns BJ, Davidoff AM et al. Overexpression and mutation of p53 in endometrial carcinoma. *Cancer Res* 1992; 52: 1622-7.

56 Kohler MF, Lukes AS, Pieper CF et al. Multivariable analysis of DNA ploidy, p53, and HER-2/neu as prognostic factors in endometrial cancer. *Cancer* 1994; 73: 2380-5.

57 Bancher-Todesca D, Gitsch G, Williams KE, Kohlberger P, Neunteufel W et al. p53 protein overexpression: a strong prognostic factor in uterine papillary serous carcinoma. *Gynecol Oncol* 1998; 71: 59-63.

58 Morsi HM, Leers MP, Radespiel-Tröger M, Björklund V et al. Apoptosis, bcl-2 expression, and proliferation in benign and malignant endometrial epithelium: an approach using multiparameter flow cytometry. *Gynecol Oncol* 2000; 77: 11-7.

59 Bonneefoy-Berard N, Aouacheria A, Verschelde C, Quemeneur L, Marçais A, Marvel J. Control of proliferation by *Bcl-2* family members. *Biochimica et Biophysica Acta* 2004; 1644: 159-68.

60 Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis: its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994; 73(8): 2013-25.

61 Lu Q, Abel P, Foster CS, Lalani E. *Bcl-2*: role in epithelial differentiation and oncogenesis. *Hum Pathol* 1996; 27(2): 102-10.

62 Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Lin HK, Liebermann DA, Hoffman B, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogen* 1994; 9: 1799-805.

63 Reed JC. Regulation of apoptosis by bcl-2 family proteins and its role in cancer and chemoresistance. *Curr Opin Oncol* 1995; 7: 541-6.

64 Gompel A, Sabowein JC, Martin A. *Bcl-2* expression in normal endometrium during the menstrual cycle. *Am J Pathol* 1994; 144: 1195-202.

65 Otsuki Y, Misaki O, Sugimoto O et al. Cyclic bcl-2 gene expression in human uterine endometrium during menstrual cycle. *Lancet* 1994; 344: 28-9.

66 Marone M, Ferrandina G, Macchia G, Mozzetti S. *Bcl-2*, bax, bcl-xl and bcl-xs expression in neoplastic and normal endometrium. *Oncol* 2000; 58: 161-8.

67 Coppola D, Fu L, Nicosia SV, Kounelis S, Jones M. Prognostic significance of p53, bcl-2, vimentin, and S100 protein-positive Langerhans cells in endometrial carcinoma. *Hum Pathol* 1998; 29(5): 455-62.

68 Saegusa M, Okayasu I. *Bcl-2* is closely correlated with favorable prognostic factors and inversely associated with p53 protein accumulation in endometrial carcinomas: immunohistochemical and polymerase chain reaction/loss of heterozygosity findings. *J Cancer Res Clin Oncol* 1997; 123: 429-34.

69 Soong R, Knowles S, Williams KE, Hammond IG, Wysocki SJ, Iacopetta BJ. Overexpression of p53 protein is an independent prognostic indicator in human endometrial carcinoma. *Br J Cancer* 1996; 74: 562-7.

70 Miturski R, Semczuk A, Tomaszewski J, Jakowicki J. *Bcl-2* protein expression in endometrial carcinoma: the lack of correlation with p53. *Cancers Letters* 1998; 133: 63-9.

71 Sakuragi N, Ohkouchi T, Hareyama H, Ikeda K, Watari H, Fujimoto T et al. *Bcl-2* expression and prognosis of patients with endometrial carcinoma. *Int J Cancer (Pred Oncol)* 1998; 79: 153-8.

72 Yamauchi N, Sakamoto A, Uozaki H, Iihara K, Machinami R. Immunohistochemical analysis of endometrial adenocarcinoma for bcl-2 and p53 in relation to expression of sex steroid receptor and proliferative activity. *Int J Gynecol Pathol* 1996; 15: 202-8.

73 Kokawa K, Shikone T, Otani T, Nishiyama R, Ishii Y, Shigetaka Y, Yamoto M. Apoptosis and the expression of bcl-2 and bax in patients with endometrioid, clear cell, and serous carcinomas of the endometrium. *Gynecol Oncol* 2001; 81: 178-83.

74 Geisler JP, Geisler HE, Wiemann MC, Zhou Z, Miller GA, Crabtree W. Lack of bcl-2 persistence: an independent prognostic indicator of poor prognosis in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 1998; 71: 305-7.

75 Chhieng DC, Ross JS, Ambros RA. *Bcl-2* expression and the development of endometrial carcinoma. *Mod Pathol* 1996; 9(4): 402-6.

76 Athanassiadou P, Petrakakou E, Liossi A, Nakopoulou L, Zerva C et al.
Prognostic significance of p53, bcl-2 and EGFR in carcinoma of the endometrium.
Acta Cyto 1999; 43(6): 1039-44.

2 OBJETIVOS

- Determinar a frequência de expressão da proteína p53 e da bcl-2 na neoplasia maligna do endométrio.
- Relacionar a expressão das proteínas p53 e bcl-2 com características clínicas e tumorais prognósticas:
 - idade;
 - tipo histológico;
 - grau de diferenciação celular;
 - invasão miometrial; e
 - estadiamento cirúrgico.
- Relacionar a expressão das proteínas p53 e bcl-2 com sobrevida.

3 ARTIGO CIENTÍFICO EM LÍNGUA PORTUGUESA

EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS P53 E BCL-2 NO CARCINOMA DE ENDOMÉTRIO

Appel, M.L.M. MD¹; Edelweiss, M.I. PhD²; Fleck, J. PhD³; Rivero, L.F. MD²; Rivoire, W.A. MD¹; Mônego, H.I. MD¹; dos Reis, R. MD¹.

Departamento de Ginecologia e Obstetrícia¹, Departamento de Patologia² e Departamento de Medicina Interna (Serviço de Oncologia)³ do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

Endereço para correspondência: Dra. Márcia Appel, Rua Comendador Caminha, 128/902, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, CEP 90430-030. Fone/Fax: 51 33469397; E-mail: marciaappel@terra.com.br

RESUMO

Objetivos: verificar a freqüência da expressão imunoistoquímica da p53 e da bcl-2 em pacientes com carcinoma endometrial e relacioná-la a fatores histológicos (tipo histológico, grau de diferenciação tumoral, profundidade de invasão miometrial, comprometimento linfonodal e estadiamento cirúrgico) e sobrevida.

Delineamento: estudo de coorte histórica.

Instituição: Hospital de Clínicas de Porto Alegre, hospital universitário da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Métodos: Foram estudadas 48 pacientes com carcinoma endometrial submetidas a tratamento cirúrgico primário. A expressão imunoistoquímica das proteínas p53 e bcl-2 foi determinada utilizando-se os blocos de parafina que continham a área tumoral.

Resultados: a expressão das proteínas p53 e bcl-2 foi detectada em 39,6% e 58,3% dos tumores, respectivamente. Não se encontrou diferença significativa na freqüência de expressão da p53 quando analisados tipo histológico (33,3% em tumores endometrióides, 58,3% em tumores não endometrióides; $p = 0,176$), profundidade de invasão miometrial ($p = 0,632$) e estadiamento cirúrgico (E) (E I – 11,1%, E II – 66,7%, E III – 57,1%; $p = 0,061$). A expressão deste marcador foi significativamente mais freqüente em tumores indiferenciados ($p = 0,007$) e com comprometimento linfonodal ($p = 0,03$). Em análise univariada, houve uma associação positiva com óbito (RR 3,358, IC 1,386 – 8,134; $p = 0,005$) e diminuição de tempo de sobrevida. O presente estudo não demonstrou nenhuma relação da bcl-2 com os marcadores histopatológicos e sobrevida.

Conclusão: este estudo demonstrou estar a expressão da proteína p53 relacionada

a tumores indiferenciados, comprometimento linfonodal e a risco de óbito. A expressão da bcl-2, ao contrário, não se relacionou aos fatores histológicos conhecidos.

Palavras-chave: carcinoma de endométrio, p53, bcl-2, prognóstico

1 INTRODUÇÃO

O carcinoma de endométrio é uma das neoplasias ginecológicas mais comuns. No Brasil, em que pese a inadequação das notificações epidemiológicas, ocupa a quinta posição entre todos os tumores, ficando atrás das lesões de mama, colo uterino, cólon e estômago¹.

Os marcadores prognósticos tradicionalmente utilizados para predizer o curso clínico da neoplasia endometrial incluem o tipo histológico, o grau de diferenciação tumoral, profundidade de invasão miometrial, doença linfonodal e estágio². Estas informações são obtidas pelo estudo histológico do espécime cirúrgico. Variáveis clínicas, como a idade e grupo racial, têm sido apontadas, também, como fatores prognósticos importantes³.

A maioria das mulheres (75-88%) com carcinoma endometrial tem doença em estágio inicial no momento do diagnóstico^{4,5}. Em razão disso, o prognóstico destas pacientes é bom, com uma taxa de sobrevida em cinco anos de 80 a 85%⁵. No entanto, a constatação de que 15 a 20% destas pacientes, com doença aparentemente curável, apresentarão recidiva e morte, permite especular sobre a

existência de fatores adicionais que possam estar relacionados a risco de progressão e disseminação da doença.

Nos últimos anos, com a ampliação do conhecimento na área de biologia molecular, tem sido sugerido que alguns marcadores biológicos possam ser tão ou mais importantes do que os convencionais⁶. Inúmeras publicações têm relacionado os genes p53 (*P53*) e o bcl-2 (*Bcl-2*) como possíveis marcadores de agressividade tumoral.

O *P53* é considerado um gene supressor tumoral. Expressa uma proteína de mesmo nome (p53) que, frente a danos no genoma celular, determina a parada na progressão do ciclo e a apoptose celular (morte celular programada). A inativação funcional da p53 tem importante papel no processo de transformação maligna. Permite à célula tumoral maior poder de divisão e proliferação⁷. Entre 21 e 49% dos carcinomas endometriais expressam a p53 anormal. A sua positividade, vista ao estudo imunohistoquímico, parece se relacionar a tumores agressivos, indiferenciados e de mau prognóstico.

O *Bcl-2* é um gene que inibe a apoptose celular. Codifica uma proteína com 25 a 26 kda (*bcl-2*), localizada na membrana mitocondrial, retículo endoplasmático e membrana nuclear⁸. Os níveis de expressão da bcl-2 variam no endométrio normal de maneira cíclica. São maiores durante a fase proliferativa e diminuem na fase secretora, o que sugere uma regulação hormonal. Além disto, a expressão de bcl-2, relativamente alta no endométrio normal, diminui nas hiperplasias atípicas e adenocarcinoma^{9,10}. A sua expressão sustentada pode ser importante nas fases

iniciais da carcinogênese endometrial. A expressão de bcl-2 tem se relacionado a tumores endometriais bem diferenciados, doença em estágio inicial e de bom prognóstico.

O objetivo deste estudo foi verificar a frequência da expressão imunohistoquímica das proteínas p53 e bcl-2 em pacientes tratadas cirurgicamente para neoplasia endometrial e relacioná-la a fatores histológicos e prognósticos de uso corrente (tipo histológico, grau de diferenciação tumoral, profundidade de invasão miometrial, comprometimento linfonodal e estadiamento cirúrgico) e sobrevida.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 PACIENTES

No período de janeiro de 1996 a dezembro de 2001, 52 pacientes consecutivas com diagnóstico histológico de carcinoma endometrial foram submetidas a tratamento cirúrgico primário no Setor de Oncologia Genital do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Este Setor é considerado referência, dentro da instituição hospitalar, para tratamento desta doença.

Foram excluídas as pacientes com história ou presença concomitante de outra neoplasia maligna e/ou já submetidas a tratamento neo-adjuvante. Desta

forma, quatro pacientes com história de neoplasia maligna prévia (2 com tumores de cólon, 1 com tumor de mama e 1 com tumor de colo uterino) foram retiradas do grupo inicial. Portanto, 48 pacientes foram incluídas no estudo.

Das 48 pacientes, 11 (23%) foram submetidas a histerectomia total com salpingooforectomia bilateral com ou sem citologia peritoneal e, em 37 pacientes (77%), além deste procedimento, foi realizada alguma forma de dissecação linfática pélvica (total ou amostragem) com ou sem citologia peritoneal. O número de linfonodos pélvicos dissecados variou de 2 a 40 (média 16,9; desvio-padrão de 9,71). Em 11 pacientes, além da linfadenectomia pélvica, foi realizada a amostragem paraaórtica (2-8 linfonodos, média de 3,36).

Em 26 pacientes, foi possível definir o estadiamento cirúrgico, com informações baseadas nos laudos histopatológicos.

Das 48 pacientes, 34 foram referidas para tratamento complementar pós-cirúrgico e, em 3 casos, não havia menção desta informação em prontuário. A radioterapia (teleterapia e/ou braquiterapia) foi o tratamento de escolha em 31 pacientes.

2.2 DELINEAMENTO, SEGUIMENTO E ÉTICA

O delineamento utilizado foi uma coorte histórica. A ressecção cirúrgica foi considerada o tempo zero. O seguimento foi iniciado após a ressecção do tumor e realizado até a morte da paciente ou até o final do período do estudo (dezembro de

2003). A morte atribuída (desfecho) foi aquela relacionada diretamente com o evento (câncer de endométrio). As informações a respeito da sobrevivência das pacientes foram obtidas a partir do prontuário médico, além de telefonemas e correspondências. As pacientes em acompanhamento ambulatorial eram orientadas a consultar a cada três meses, durante o primeiro ano pós-operatório, a cada 4 meses, no segundo ano, a cada 6 meses do terceiro ao quinto ano e, anualmente, a partir do sexto ano. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do HCPA.

2.3 VARIÁVEIS EM ESTUDO

Obteve-se, através da revisão dos prontuários, a idade e o laudo descritivo do estudo histológico do espécime cirúrgico. As variáveis analisadas incluíram a idade, o tipo histológico, grau de diferenciação tumoral, profundidade de invasão miometrial, o comprometimento linfonodal e estadiamento cirúrgico.

O tipo histológico e o grau de diferenciação tumoral foram redefinidos pela leitura de novas lâminas coradas por hematoxilina e eosina e feitas a partir dos blocos de parafina que continham a área tumoral e que, posteriormente, também, foram utilizados para o exame de imunohistoquímica. Os casos em que a classificação da profundidade de invasão miometrial obedecia a critérios em desuso (i.e. invasão tumoral definida por terços de penetração no miométrio) foram reclassificados. A peça cirúrgica, conservada em blocos de parafina, foi obtida junto

ao Serviço de Patologia do HCPA. A interpretação destas lâminas coube a dois patologistas independentes.

A classificação histológica obedeceu a critérios da Organização Mundial da Saúde (OMS) e do Colégio Americano de Patologia (CAP)¹¹. As lesões endometriais foram divididas em dois grandes grupos, os adenocarcinomas endometrióides e os adenocarcinomas não endometrióides (subtipos papilar seroso, células claras, mucinoso, carcinoma de células escamosas, carcinoma indiferenciado e o carcinoma misto). O carcinoma adenoescamoso foi considerado, como na maioria dos estudos deste tipo, também como uma lesão não endometrióide^{12,13, 14}.

Os adenocarcinomas endometrióides foram classificados, segundo o grau histológico, em: a. tumores bem diferenciados (G1) – tumores compostos somente por glândulas; b. tumores moderadamente diferenciados (G2) – combinação de glândulas e massas de epitélio sólido; c. tumores indiferenciados (G3) – proliferações sólidas predominantes. Os carcinomas indiferenciados, os serosos e os de células claras foram considerados lesões indiferenciadas. Como não há critério universalmente aceito para a graduação de tumores mucinosos, utilizou-se classificação igual a dos endometrióides.¹¹

A classificação da profundidade de invasão miometrial de uso corrente é definida como: A – sem invasão (restrita ao endométrio); B – invasão menor ou igual a 50% e C – invasão maior que 50%¹¹. Não houve a possibilidade de resgatar esta nova classificação em apenas um caso.

A neoplasia endometrial foi estadiada cirurgicamente de acordo com o sistema de estadiamento da Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO) de 1988: I – doença restrita ao corpo uterino; II – comprometimento cervical e III – comprometimento de anexos uterinos e/ou linfonodos retroperitoniais positivos e/ou citologia peritoneal e/ou metástases vaginais.

2.4 AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA

2.4.1 Anticorpos e reagentes

Como anticorpos primários, foram utilizados o anticorpo monoclonal anti-p53 (camundongo) que reconhece a proteína p53 mutada (Dako Corporation código 7001 clone DO -7) e o anticorpo monoclonal anti-bcl-2 que reconhece a proteína bcl-2 (Dako Corporation).

2.4.2 Técnica de imunistoquímica – Preparação das lâminas

De cada bloco de parafina, um corte foi submetido à coloração de rotina em hematoxilina – eosina para análise histológica e confirmação da área tumoral. Os cortes subseqüentes foram submetidos à técnica imunistoquímica de rotina do Serviço de Patologia do HCPA, usando-se os anticorpos primários anteriormente descritos. Foi manufaturada somente uma lâmina de cada anticorpo monoclonal a partir de um único bloco de parafina. Todas as reações foram executadas com

controles positivos (câncer de mama para a expressão da proteína p53 e linfonodo para a bcl-2).

Após desparafinização e reidratação, recuperação antigênica, inativação da peroxidase endógena e bloqueio das reações inespecíficas, os cortes foram encubados por 2 horas em temperatura ambiente, com uma solução diluída dos anticorpos primários a 1:100 para a proteína p53 e 1:80 para a bcl-2. A localização dos anticorpos primários foi alcançada pela aplicação subsequente do complexo estreptavidina-biotina peroxidase (LSAB, Dako) e a revelação com a utilização do diaminobenzidina tetraidroclorido (kit DAB, Dako).

2.4.3 Determinação imunoistoquímica das expressões da proteína p53 e bcl-2

Os tumores foram considerados positivos para expressão de p53 se 10% ou mais dos núcleos das células tumorais estivessem corados em marrom (p53-positivos).

Os tumores foram considerados positivos para a expressão de bcl-2 se 10% ou mais do citoplasma das células tumorais estivessem corados em marrom (bcl-2-positivos).

As lâminas foram examinadas por dois patologistas independentes que não tinham conhecimento das informações histológicas. Os poucos casos discordantes

foram reexaminados em conjunto, em um segundo momento, e a concordância foi alcançada.

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis contínuas são descritas sob a forma de média e desvio padrão e as categóricas sob a forma de proporções.

A avaliação da associação entre expressão das proteínas p53 e bcl-2 e as características histopatológicas foram examinadas pelo teste do qui-quadrado. Quando necessário, o teste exato de Fisher foi utilizado. A análise da sobrevida da coorte foi feita pelo método de Kaplan-Meier. O impacto de cada fator prognóstico na sobrevida foi testado pelo teste de *log-rank*. O nível de significância considerado foi de 5%. O programa *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) para Windows, versão 11.0, foi utilizado para a análise estatística.

3 RESULTADOS

3.1 PACIENTES

Foram avaliadas 48 pacientes. A idade variou de 34 a 90 anos (média de 65,6 anos \pm 11,7 anos); 26 pacientes (54,2%) tinham idade igual ou inferior a 66 anos e 22 pacientes (45,8%) tinham idade de 67 anos ou mais.

As principais características histopatológicas estão listadas na tabela 1.

3.2 IMUNOISTOQUÍMICA DAS EXPRESSÕES DA PROTEÍNA P53 E DA BCL-2

A expressão da proteína p53 foi positiva em 19 casos (39,6%) (figura 1).

A expressão da proteína bcl-2 foi positiva em 28 casos (58,3%) (figura 2).

3.3 ASSOCIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS P53 E BCL-2 E IDADE

A média de idade para as pacientes com p53 positivo foi de $66,4 \pm 11,6$ anos e para as p53 negativas foi de $55,1 \pm 11,9$ ($p = 0,73$).

A média de idade para as pacientes com bcl-2 positivo foi de $66,3 \pm 10,2$ anos e para as bcl-2 negativas foi de $64,6 \pm 13,7$ anos ($p=0,63$).

3.4 ASSOCIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA P53 E OS ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS

A associação entre a expressão da proteína p53 e os indicadores prognósticos histopatológicos estão sumarizados na tabela 2. Não houve relação estatisticamente significativa entre a frequência de expressão da p53 e o tipo

histológico ($p = 0,176$), a profundidade de invasão miometrial ($p = 0,632$) e estadiamento cirúrgico ($p=0,061$). A expressão da p53 foi mais freqüente em tumores indiferenciados ($p = 0,007$) e com comprometimento linfonodal ($p = 0,030$).

3.5 ASSOCIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA BCL-2 E OS ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS

A associação entre a expressão da proteína bcl-2 e os indicadores prognósticos histopatológicos estão sumarizados na tabela 2. Não houve relação estatisticamente significativa entre a freqüência de expressão da bcl-2 e o tipo histológico, grau de diferenciação tumoral, profundidade de invasão miometrial, estadiamento cirúrgico e comprometimento linfonodal.

3.6 SEGUIMENTO MÉDIO E SOBREVIDA GLOBAL

O tempo de acompanhamento variou de 20 dias a 99,5 meses. A sobrevida média global foi de 69,77 meses (IC= 58,18 – 81,37). Durante o período de acompanhamento, ocorreram 16 óbitos.

3.7 ASSOCIAÇÃO DA PROTEÍNA P53 E TEMPO DE SOBREVIDA

A sobrevida média das 19 pacientes com expressão positiva para p53 foi de 48,9 meses (IC = 30,79 – 67,08) e das 29 pacientes com expressão negativa foi de 83,8 meses (IC = 71,6 – 96,1) (log rank $p= 0,0023$) (figura 3).

3.8 ASSOCIAÇÃO DA PROTEÍNA BCL-2 E TEMPO DE SOBREVIDA

A sobrevida média das 28 pacientes com expressão positiva para bcl-2 foi de 72,48 meses (IC = 58,12 – 86,84) e das 20 pacientes com expressão negativa foi de 65,2 meses (IC = 47,8 – 82,6) (log rank $p = 0,53$) (figura 4).

3.9 ASSOCIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA P53 E ÓBITO

Houve uma significativa associação entre os casos de óbito e a expressão da p53. A expressão da p53 relaciona-se positivamente com a frequência de óbitos (tabela 3).

3.10 ASSOCIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA BCL-2 E ÓBITO

Não houve associação entre a expressão da bcl-2 e óbito (tabela 4).

4 DISCUSSÃO

Esforço considerável tem sido investido na identificação das alterações genéticas e moleculares presentes nas neoplasias, em geral, e no carcinoma endometrial, em particular, e na maneira como se relacionam com o estadiamento da doença e prognóstico.

Vários estudos realizados em pacientes com tumores endometriais têm apontado as proteínas p53 e bcl-2 como importantes variáveis prognósticas. A positividade da pesquisa imunohistoquímica para p53, além de identificar a expressão proteica anormal – resultado de alterações estruturais e/ou funcionais – parece também se relacionar a fatores adversos. Lesões indiferenciadas, penetração tumoral profunda no miométrio, comprometimento linfonodal e estádios avançados são situações que se associam à positividade da p53. Ao contrário, a expressão da proteína bcl-2 tem sido apontada como diretamente relacionada à evolução clínica favorável e a marcadores histopatológicos de bom prognóstico (i.e., tumores endometrióides, bem diferenciados, de penetração miometrial superficial e estadiamento precoce). A base teórica, em que se apóiam estas observações clínicas, mostra que a expressão imunohistoquímica da p53 e/ou a perda ou ausência de expressão da bcl-2 associa-se a tumores com altos índices de apoptose e

proliferação celular. Características estas que se relacionam ao potencial de progressão e disseminação tumoral^{15,16}.

Um recente modelo da carcinogênese endometrial reconheceu dois tipos tumorais distintos: o adenocarcinoma endometrióide (bom prognóstico) e o adenocarcinoma não endometrióide (mau prognóstico). O tumor endometrióide desenvolve-se de forma lenta e progressiva a partir da hiperplasia endometrial em um ambiente de estímulo estrogênico sem oposição. É caracterizado por expressão sustentada de bcl-2 e alterações tardias no gene *P53*, como se evidencia pela ausência da p53 nas hiperplasias atípicas e nas lesões de baixo grau (estádio I e II)^{6,17,18}. Em contraste, adenocarcinomas não endometrióides (especialmente os serosos e os de células claras) desenvolvem-se em um epitélio atrófico sem estímulo estrogênico, são agressivos e têm um ambiente biológico distinto. A mutação gênica e o acúmulo da proteína p53 são freqüentemente encontrados mesmo no carcinoma endometrial intra-epitelial, entidade histopatológica identificada como lesão precursora da neoplasia papilar serosa e presente em aproximadamente 90% dos casos^{17,19,20,21,22,23}. Em um estudo de Kounelis e colaboradores (col)¹⁸, foi demonstrada que a expressão imunoistoquímica da p53 se estende às glândulas endometriais atípicas e atróficas adjacentes à área de neoplasia papilar invasora. Estas informações comprovam que, nestes casos, as alterações no *P53* são eventos que ocorrem precocemente na carcinogênese.

O estudo em foco analisou as taxas de expressão das proteínas p53 e bcl-2 e a maneira como se relacionam aos fatores prognósticos tradicionais. O método utilizado para determinar esta expressão foi o de imunoistoquímica (imh). Este, em

razão da sua simplicidade de execução e baixo custo, tem sido amplamente utilizado em estudos deste tipo. Ademais, pode ser realizado utilizando-se material biológico estocado e conservado por longo tempo em blocos de parafina. Em relação à p53, parece não haver diferença na reatividade quando analisadas diferentes frações tumorais e tão pouco esta é influenciada pelo tempo de armazenamento dos blocos^{24,25}. Também, o uso de anticorpos monoclonais de diferentes fontes comerciais parece não alterar a frequência da expressão²⁶. A expressão da bcl-2, ao contrário, pode variar, segundo alguns estudos, de acordo com o anticorpo monoclonal utilizado e técnica de execução do exame. Isso, em parte, pode justificar a discrepância de resultados verificada na literatura em relação a esta proteína¹⁸.

Diferente das técnicas que usam a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), a avaliação imunoistoquímica não permite a identificação de anormalidades no gene. Os resultados positivos normalmente se relacionam a alterações estruturais das proteínas por ele codificadas. De uma forma simplificada, pode-se dizer que proteínas anormais são resultantes de genes anormais e mutados. No entanto, a positividade imh pode ocorrer somente como resultado da ligação destas proteínas a outras, o que poderia lhes conferir maior estabilidade e permitir o seu acúmulo nas células neoplásicas. Ao contrário, a presença de tipos específicos de mutações (p.e., do tipo *frame-shift*) produz proteínas truncadas ou instáveis, que são indetectáveis ao exame de imh. Portanto, na perspectiva prática, o exame de imh tem baixa sensibilidade, baixa especificidade e modesto valor preditivo para definição de portadores de mutações gênicas²⁷.

Nos carcinomas endometriais, a expressão da p53 na leitura imunoistoquímica pode não se relacionar a mutação gênica, especialmente nos tumores endometrióides. Nestes casos, a ligação da p53 a outras proteínas nucleares, formando complexos protéicos de alta estabilidade, parece explicar a sua imunorreatividade. Ao contrário, nas lesões não endometrióides, particularmente nos tumores serosos, de comportamento mais agressivo, é bem mais comum a presença de mutações no gene^{23,28}. Em relação à proteína bcl-2, acredita-se que, em tumores sólidos, sua expressão não está associada à anormalidade gênica²⁹.

Neste estudo, detectou-se a expressão nuclear da p53 em 39,6% dos casos. Esta frequência global é concordante com a literatura, que mostra taxas que variam de 21 a 49%^{25,18}.

Em relação as variáveis clínicas, não foi encontrada nenhuma associação da p53 com a idade das pacientes. Isto também foi evidenciado no estudo de Geisler e col.¹². Não foi possível avaliar a relação da expressão da p53 com o grupo racial, uma vez que esta característica não foi incluída de forma adequada nos registros médicos. Kohler e col.²⁵ observaram uma frequência aumentada de expressão da p53 em tumores endometriais de pacientes negras. A influência das diferenças étnicas e das altas taxas de miscigenação da população em foco sobre os marcadores biológicos e outros fatores prognósticos ainda necessita ser esclarecida.

Na análise do tipo histológico, verificou-se que 58,3% dos tumores não endometrióides e 33,3% dos tumores endometrióides expressaram p53. Esta diferença, apesar de definir uma tendência, não se mostrou significativa ($p = 0,176$).

Na revisão da literatura, a diferença de expressão entre estes dois tipos é mais relevante. Geisler e col.¹² observaram que 57,3% dos tumores endometrióides e 94,1% dos tumores não endometrióides expressavam p53 ($p < 0,001$). Em um estudo brasileiro, Bonfitto e col.³⁰, analisando 51 casos, observaram, em material de curetagem uterina, a expressão de p53 em 16% dos tumores endometrióides e em 71% dos não endometrióides ($p < 0,05$). Quando analisados somente os tumores serosos e de células claras, Kounelis e col.¹⁸ encontraram índices de positividade em 76 a 100% dos casos. No presente trabalho, a avaliação isolada destes subtipos, apesar do número reduzido de casos (5 casos), também, demonstrou uma frequência de expressão alta (80%).

Encontrou-se uma maior frequência de expressão da p53 nos casos de tumores de pior diferenciação (G3 71,4% X G2 35% X G1 14,3%; $p = 0,007$). Resultados semelhantes foram encontrados em inúmeros estudos^{12,25,31,32}. Não foi detectada diferença significativa para a expressão da p53 em relação à profundidade de invasão miometrial. Geisler e col.¹², ao analisarem 46 casos de pacientes com neoplasia endometrial, verificaram ser a expressão de p53 mais freqüente em tumores avançados e indiferenciados, mas também não encontraram diferença para invasão miometrial.

A expressão da proteína p53 não variou conforme o estadiamento cirúrgico. Analisando-se, no entanto, somente o comprometimento linfonodal, o que caracteriza o estágio IIIC, observou-se que a imunorreatividade para p53 foi mais freqüente nesta situação ($p = 0,030$). O comprometimento linfonodal é considerado, hoje, a variável prognóstica mais importante⁶. A literatura é rica em estudos que

demonstram uma associação direta do estadiamento cirúrgico avançado e do comprometimento linfonodal com a expressão da p53^{12,25,31,32}. A dissecação linfática realizada de forma ampla ou apenas por amostragem e a impossibilidade de definir sobre o estadiamento cirúrgico em vinte e duas pacientes são críticas a este estudo. Pacientes que foram submetidas somente a linfadenectomia pélvica por amostragem – abordagem cirúrgica comumente utilizada nos primeiros anos do estudo – poderão ter sido subestadiadas e isto ter, de alguma forma, influenciado os resultados.

Estudos têm relacionado a expressão da p53 à diminuição do tempo de sobrevida global em pacientes com tumores endometriais. Ohkouchi e col.⁶ determinaram que a taxa de sobrevida, em 5 anos, para pacientes em estágio III/IV variou conforme a expressão da p53. A sua presença relacionou-se a 40,4% de sobrevida e a sua negatividade a 75,7%. Oreskovic e col.²⁷ também observaram que a positividade celular para p53 se relacionou a pior sobrevida em tumores G1 e G2. Ito e col.³³, ao analisarem 221 pacientes com doença inicial, demonstraram que a expressão da p53 estava presente em 50% dos casos que foram a óbito e em somente 8% das pacientes vivas e sem doença. No presente estudo, a positividade para p53 relacionou-se, em análise univariada, a risco de óbito. Entre as pacientes que foram a óbito, 68,7% expressavam p53 (tabela 3). Ao contrário, somente 25% das pacientes vivas e sem doença foram p53 positivas (tabela 5). Este resultado não foi influenciado pela extensão do procedimento cirúrgico (amostragem linfonodal ou linfadenectomia pélvica completa) ou pelo tratamento complementar – fatores potencialmente relacionados à recidiva e/ou sobrevida – visto que não se encontrou

diferença estatisticamente significativa quando analisadas estas variáveis e a expressão da p53 (tabelas 6 e 7).

Em análise multivariada, não foi possível caracterizar a expressão da p53 como fator prognóstico independente quando comparada a tipo e grau histológico, invasão miometrial e estadiamento. Este achado é discordante dos dados descritos na literatura^{6,14,26, 33}. No entanto, o pequeno número de casos e de desfechos torna este trabalho não apropriado para tal tipo de análise.

A expressão citoplasmática de bcl-2 foi encontrada em 58,3% dos carcinomas analisados neste estudo. A literatura descreve taxas que variam de 34 a 85%¹⁸, dependendo da seleção de pacientes.

O presente estudo não demonstrou relação da expressão de bcl-2 com a idade, o tipo e grau histológico, profundidade de invasão miometrial, estadiamento cirúrgico e sobrevida (tabelas 2 e 4, figura 4).

A literatura tem se mostrado contraditória em relação à expressão da bcl-2 e fatores prognósticos. Alguns tumores de próstata e neuroblastomas com reação positiva para bcl-2 apresentam comportamento biológico altamente agressivo. Isto pode ser explicado pela resistência à terapia hormonal e/ou citotóxica conferida pela persistência da bcl-2 e a sua capacidade de inibir a apoptose³⁴. Na neoplasia endometrial, ao contrário, vários estudos mostram a sua alta expressão relacionada a alguns fatores prognósticos favoráveis – lesões bem diferenciadas, de tipo endometrióide e em estádios iniciais^{10,35,36,37,38}. Longe de ser um assunto bem

definido, alguns outros estudos não encontraram resultados semelhantes^{13,18}. Kounelis e col.¹⁸, estudando 61 pacientes, não encontraram diferença significativa na expressão de bcl-2 quando analisados tipo histológico, grau de diferenciação e estadiamento. Giatromanolaki e col.¹³, analisando 133 pacientes, não encontraram nenhuma relação deste marcador com grau tumoral, profundidade de invasão miometrial e invasão linfovascular. Sakuragi e col.³⁹ não encontraram diferença significativa para expressão da bcl-2 quando analisados comprometimento linfonodal e grau tumoral; no entanto, esta foi inversamente proporcional a penetração miometrial ($p < 0,025$).

Concluindo, este estudo demonstrou que a expressão da p53 foi diretamente associada a óbito e marcadores de mau prognóstico (grau de diferenciação tumoral, lesões serosas e de células claras e comprometimento linfonodal). Este achado a coloca como variável relacionada à maior agressividade tumoral. É possível que venha a se constituir em fator prognóstico independente, com sua presença valorizada em pacientes com doença de baixo grau (estádio inicial e tumores bem diferenciados). Um número maior de casos é necessário para que se possa obter esta informação. A expressão da bcl-2, ao contrário, não se associou aos fatores prognósticos conhecidos. Isto não invalida a importância que vem sendo dada, na literatura, aos marcadores da apoptose, uma vez que a morte celular programada parece ser o resultado de um sistema altamente complexo, onde há a participação de inúmeros genes. Em relação ao endométrio, são possíveis influências à expressão da bcl-2, à atividade de receptores hormonais, principalmente os receptores de progesterona e à atividade das proteínas homólogas a bcl-2, quais sejam, bax, bcl-x, bcl-xs – variáveis estas não incluídas neste estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Instituto Nacional do Câncer. Estimativas da Incidência e mortalidade por câncer no Brasil. 2003. Disponível em <<http://www.inca.gov.br>>.
- 2 Hacker NF. Uterine Cancer. In: Berek JS, Hacker NF. Practical Gynecologic Oncology. 3rd edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.
- 3 Axtell LM, Myers MH. Contrasts in survival of black and white cancer patients, 1960-73. J Natl Cancer Inst 1978; 60: 1209-15.
- 4 Greenlee RT, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer Statistics 2000. CA Cancer J Clin 2000; 50: 7-33.
- 5 Mariani A, Sebo TJ, Katzmann JA, Jerry A, Keeney GL et al. Pretreatment assessment of prognostic indicators in endometrial cancer. Am J Obstet Gynecol 2000; 182(6): 1535-44.
- 6 Ohkouchi T, Sakuragi N, Watari H, Nomura E, Todo Y et al. Prognostic significance of bcl-2, p53 overexpression, and lymph node metastasis in surgically staged endometrial carcinoma. Am J Obstet Gynecol 2002; 187(2): 353-9.
- 7 Nishioka H, Hiasa Y, Hayashi I. Immunohistochemical detection of p53 oncoprotein in human oral squamous cell carcinomas and leukoplasias: comparison with proliferating cell nuclear antigen staining and correlation with clinicopathological findings. Oncology 1993; 50: 426-9.

- 8 Morsi HM, Leers MP, Radespiel-Tröger M, Björklund V et al. Apoptosis, bcl-2 expression, and proliferation in benign and malignant endometrial epithelium: an approach using multiparameter flow cytometry. *Gynecol Oncol* 2000; 77: 11-7.
- 9 Marone M, Ferrandina G, Macchia G, Mozzetti S. *Bcl-2*, bax, bcl-xl and bcl-xs expression in neoplastic and normal endometrium. *Oncology* 2000; 58: 161-8.
- 10 Coppola D, Fu L, Nicosia SV, Kounelis S, Jones M. Prognostic significance of p53, bcl-2, vimentin, and S100 protein-positive Langerhans cells in endometrial carcinoma. *Human Pathol* 1998; 29(5): 455-62.
- 11 Colégio Americano de Patologia. Disponível em <http://www.cap.org/apps/docs/cancer_protocols/protocols_indexhtml>. Acesso em jan. 2004.
- 12 Geisler JP, Wiemann MD, Zhou Z, Miller GA, Geisler HE. p53 as a prognostic indicator in endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 1996; 61: 245-8.
- 13 Giatromanolaki A, Sivridis E, Koukourakis MI, Harris AL, Gatter KC. *Bcl-2* and p53 expression in stage I endometrial carcinoma. *Anticancer Res* 1998; 18: 3689-94.
- 14 Geisler JP, Geisler HE, Wiemann MD, Zhou Z, Miller GA, Crabtree W. p53 expression as a prognostic indicator of 5-year survival in endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 1999; 74: 468-71.

15 van Slooten HJ, van de Vijver, van de Velde CJ, van Dierendonck JH. Loss of bcl-2 in invasive breast cancer is associated with high rates of cell death, but also with increased proliferative activity. *Br J Cancer* 1998; 77: 789-96.

16 Bonnefoy-Berard N, Aouacheria A, Verschelde C, Quemeneur L, Marçais A, Marvel J. Control of proliferation by *Bcl-2* family members. *Biochimica et Biophysica Acta* 2004; 1644: 159-68.

17 Boyd J. Molecular biology in the clinicopathologic assessment of endometrial carcinoma subtypes – Editorial. *Gynecol Oncol* 1996; 61: 163-5.

18 Kounelis S, Kapranos N, Kouri E, Coppola D, Papadaki H, Jones M. Immunohistochemical profile of endometrial adenocarcinoma: a study of 61 cases and review of the literature. *Mod Pathol* 2000; 13(4): 379-88.

19 Ambros RA, Sherman ME, Zahm CM, Bitterman P, Kurman RJ. Endometrial intraepithelial carcinoma: a distinctive lesion specifically associated with tumors displaying serous differentiation. *Hum Pathol* 1995; 26: 1260-7.

20 Sherman ME, Bur ME, Kurman RJ. p53 in endometrial cancer and its putative precursors: evidence for diverse pathways of tumorigenesis. *Hum Pathol* 1995; 26: 1268-74.

21 Spiegel GW. Endometrial carcinoma *in situ* in postmenopausal women. *Am J Surg Pathol* 1995; 19: 417-32.

22 Burton JL, Wells M. Recent advances in the histopathology and molecular pathology of carcinoma of the endometrium - review. *Histopathology* 1998; 33: 297-303.

23 Sakuragi N, Hirai A, Tada M, Yamada H, Yamamoto R, Fujimoto S, Moriuchi T. Dominant-negative mutation of p53 tumor suppressor gene in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 2001; 83: 485-90.

24 Kohler MF, Kerns BJ, Humprey PA, Marks JR, Bast RC, Berchuck A. Mutation and overexpression of p53 in early-stage epithelial ovarian cancer. *Obstet Gynecol* 1993; 81: 643-50.

25 Kohler MF, Carney P, Dodge R, Soper J, Clarke-Pearson D et al. Gynecology: p53 overexpression in advanced-stage endometrial adenocarcinoma. *Am J Obstet Gynecol*; 175(5): 1246-52.

26 Soong R, Knowles S, Williams KE, Hammond IG, Wysocki SJ, Iacopetta BJ. Overexpression of p53 protein is an independent prognostic indicator in human endometrial carcinoma. *Br J Cancer* 1996; 74: 562-7.

27 Oreskovic S, Babic D, Kalafatic D, Barisic D, Beketic-Oreskovic L. A significance of immunohistochemical determination of steroid receptors, cell proliferation factor Ki-67 and protein p53 in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 2004; 93: 34-40.

28 Tashiro H, Isacson C, Levine R, Kurman RJ, Cho KR, Hedrick, L. p53 gene mutations are common in uterine serous carcinoma and occur early in their pathogenesis. *Am J Pathol* 1997; 150: 177-85.

29 Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Lin HK, Liebermann DA, Hoffman B, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 1994; 9: 1799-1805.

30 Bonfitto VL, Andrade LA. p53, estrogen and progesterone receptors in diagnostic curettage for endometrial adenocarcinoma and their correlation with morphological data and disease stage at hysterectomy. *São Paulo Méd J* 2003; 121(4): 163-6.

31 Kohler MF, Kerns BJ, Davidoff AM et al. Overexpression and mutation of p53 in endometrial carcinoma. *Cancer Res* 1992; 52: 1622-7.

32 Hamel NW, Sebo TJ, Wilson TO, Keeney GL, Roche PC, Suman VJ et al. Prognostic value of p53 and proliferation cell nuclear antigen expression in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 1996; 62: 192-8.

33 Ito K, Watanabe K, Nasim S, Sasano H, Sato S et al. Prognostic significance of p53 overexpression in endometrial cancer. *Cancer Res* 1994; 54: 4667-70.

34 Derossi DR, Ito K, Couto Filho J, Bacchi CE. Avaliação da expressão da proteína bcl-2 no carcinoma de mama: estudo em punção aspirativa por agulha fina; correlação com grau histológico em espécimes cirúrgicos correspondentes. *J Bras Patol Med Lab* 2003; 39(3): 229-35.

35 Yamauchi N, Sakamoto A, Uozaki H, Iihara K, Machinami R. Immunohistochemical analysis of endometrial adenocarcinoma for bcl-2 and p53 in relation to expression of sex steroid receptor and proliferative activity. *Int J Gynecol Pathol* 1996; 15: 202-8.

36 Taskin M, Lallas TA, Barber HR, Shevchuk MM. *Bcl-2* and p53 endometrial adenocarcinoma. *Mod Pathol* 1997; 10(7): 728-34.

37 Saegusa M, Okayasu I. *Bcl-2* is closely correlated with favorable prognostic factors and inversely associated with p53 protein accumulation in endometrial carcinomas: immunohistochemical and polymerase chain reaction/loss of heterozygosity findings. *J Cancer Res Clin Oncol* 1997; 123: 429-34.

38 Geisler JP, Geisler HE, Wiemann MC, Zhou Z, Miller GA, Crabtree W. Lack of bcl-2 persistence: an independent prognostic indicator of poor prognosis in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 1998; 71: 305-7.

39 Sakuragi N, Ohkouchi T, Hareyama H, Ikeda K, Watari H, Fujimoto T et al. *Bcl-2* expression and prognosis of patients with endometrial carcinoma. *Int J Cancer (Pred Oncol)* 1998; 79: 153-8.

TABELAS E FIGURAS

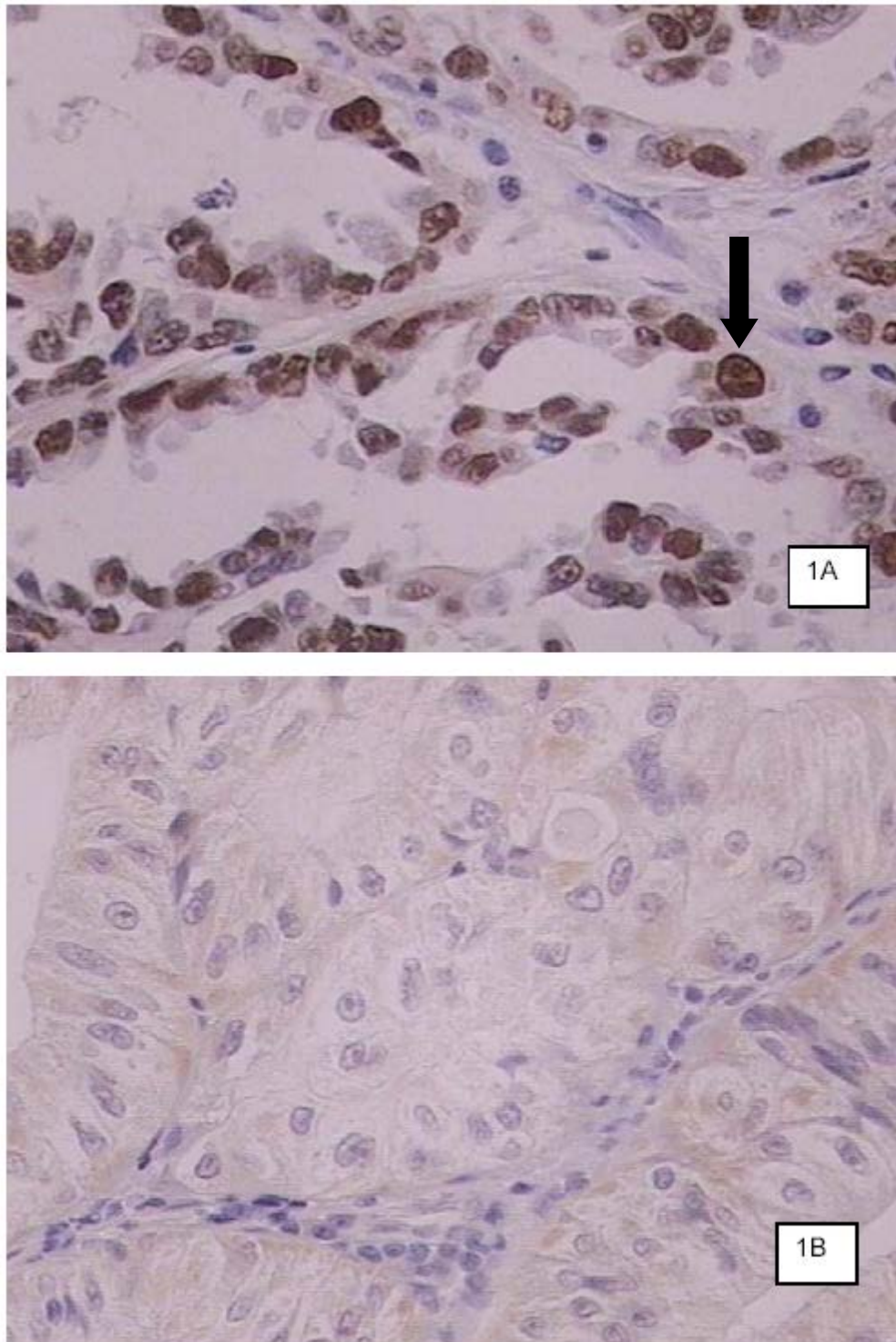


Figura 1- Imunoistoquímica da expressão da proteína p53: (1A) Positiva e (1B) Negativa. A expressão foi observada no núcleo (seta) das células tumorais

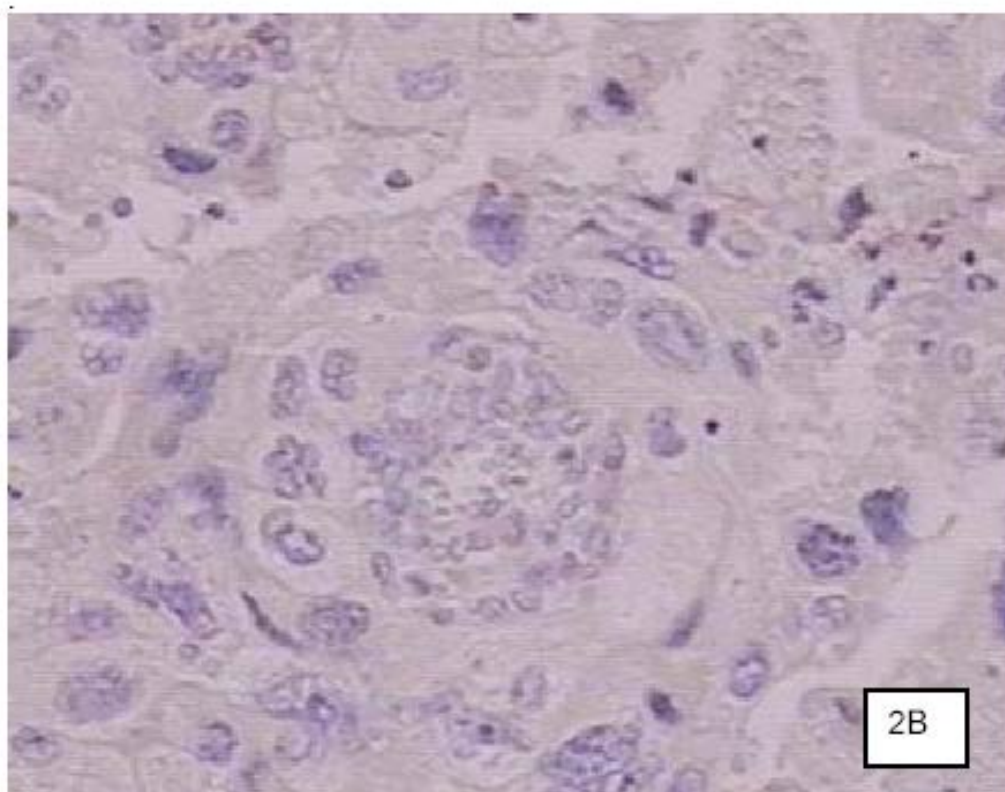
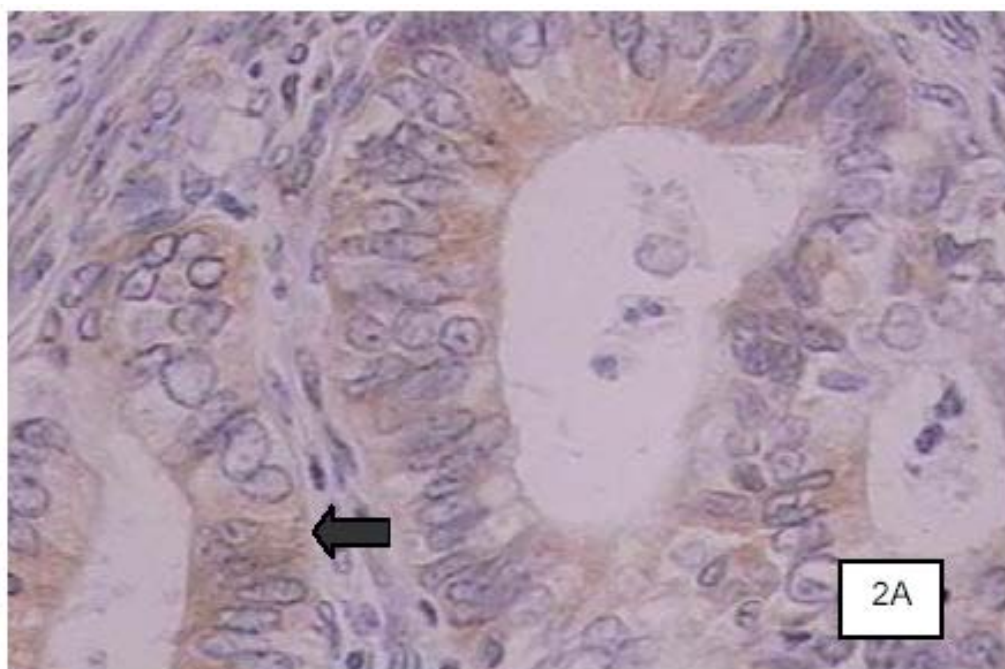


Figura 2- Imunoistoquímica da expressão da proteína bcl-2: (2A) Positiva e (2B) Negativa. A expressão foi observada no citoplasma (seta) das células tumorais

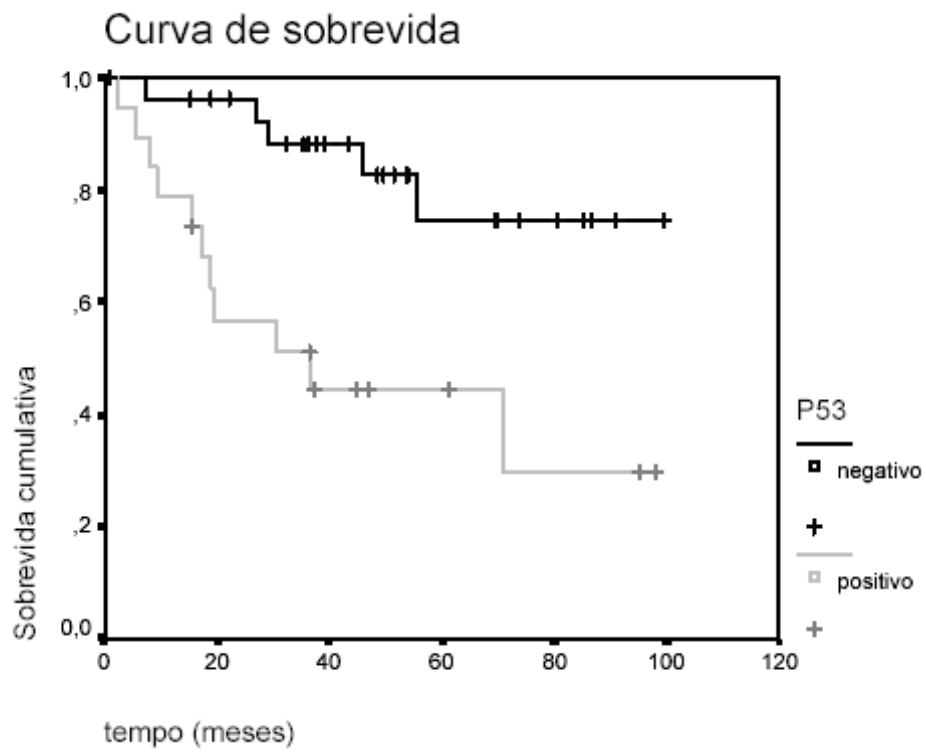


Figura 3 - Curvas de sobrevida de acordo com a expressão da proteína p53

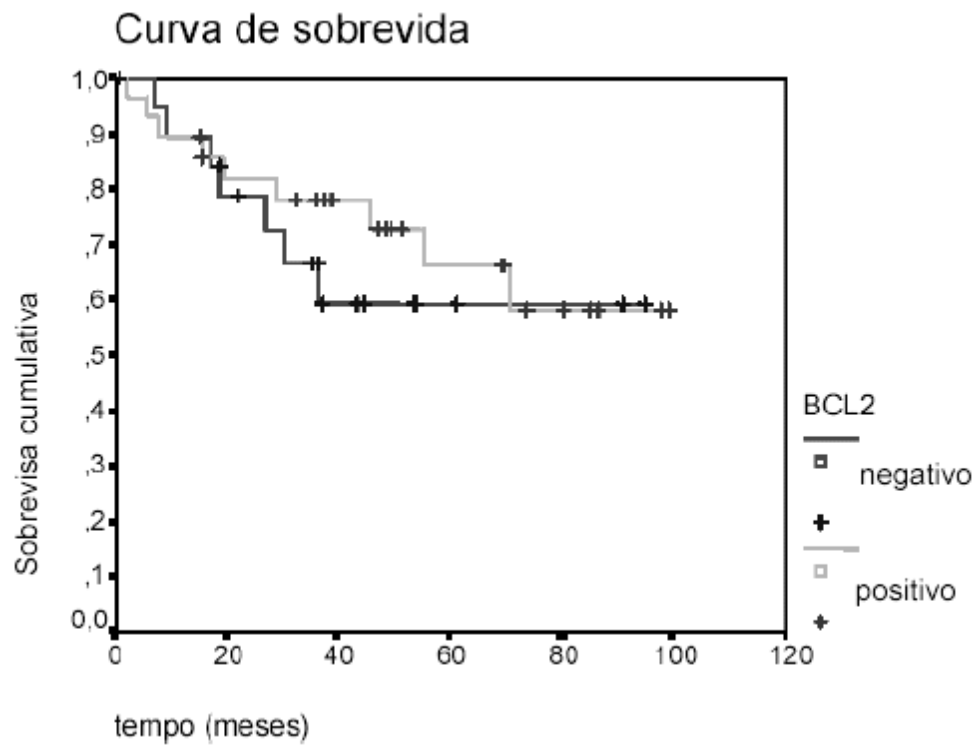


Figura 4 - Curvas de sobrevivência de acordo com a expressão da proteína bcl-2

Tabela 1 - Características histopatológicas dos tumores endometriais ressecados no serviço de Oncologia Genital do HCPA

Características	Número de pacientes
Tipo histológico	(n=48)
Endometrióide	36 (75%)
Não endometrióide	12 (25%)
Papilar seroso	4
Adenoescamoso	3
Mucinoso	2
Indiferenciado	2
Células claras	1
Grau de diferenciação*	(n=48)
G1	14 (29,2%)
G2	20 (41,6%)
G3	14 (29,2%)
Profundidade de invasão miometrial*	(n=48)
Nenhuma	2 (4,2%)
Menor ou igual a 50%	19 (39,6%)
Maior que 50%	26 (54,2%)
Terço médio	1 (2%)
Estadiamento cirúrgico**	(n=26)
I	9 (34,6%)
II	3 (11,5%)
III	14 (53,9%)
Comprometimento linfonodal (estádio IIIC)**	(n=37)
Positivo	5 (13,5%)
Negativo	32 (86,5%)

*Conforme critérios do Colégio Americano de Patologia (CAP) e OMS

**Conforme FIGO, 1988

Tabela 2 – Relação entre as expressões da proteína p53 e da proteína bcl-2 e as características histopatológicas nas pacientes com neoplasia endometrial submetidas a tratamento cirúrgico primário

Características	p53 positivo	p53 negativo	Valor de p	bcl-2 pos	<i>Bcl-2</i> neg	Valor de p
Tipo histológico						
Endometrióide	12 (33)	24 (66,7)	0,176	21 (58,3)	15 (41,7)	1
Não endometrióide	7 (58,3)	5 (41,7)		7 (58,3)	5 (41,7)	
Invasão miometrial						
Sem invasão miometrial	1 (50)	1 (50)	0,632	1 (50)	1 (50)	0,855
Menor ou igual a 50%	6 (31,6)	13 (66,4)		11 (57,9)	8 (42,1)	
Maior que 50%	12 (46,2)	14 (53,8)		15 (57,7)	11 (42,3)	
Invasão do terço médio		1 (100)		1 (100)		
Grau de diferenciação tumoral						
Bem diferenciado (G1)	2 (14,3)	12 (87,5)	0,007	8 (57,1)	6 (42,9)	0,285
Moderadamente diferenciado (G2)	7 (35)	13 (65)		14 (70)	6 (30)	
Pouco diferenciado (G3)	10 (71,4)	4 (28,6)		6 (42,9)	8 (57,1)	
Estadiamento cirúrgico						
I	1 (11,1)	8 (88,9)	0,061	4 (44,4)	5 (55,6)	0,608
II	2 (66,7)	1 (33,3)		2 (66,7)	1 (33,3)	
III	8 (57,1)	6 (42,1)		5 (35,7)	9 (64,3)	
Comprometimento linfonodal (IIIC)						
Positivo	4 (80)	1(20)	0,030	1 (20)	4 (80)	0,285
Negativo	8 (25)	24 (75)		20 (62,5)	12 (37,5)	

O número entre parênteses corresponde ao percentual

**Tabela 3 – Associação da expressão da proteína p53 e óbito
(n=16)**

	Óbito n (%)	RR (IC 95%)	Valor de p
p53 positivo	11 (68,7)	3,358 (1,386-8,134)	0,005
p53 negativo	5 (31,3)		

**Tabela 4 – Associação da expressão da bcl-2 e óbito
(n=16)**

	Óbito n (%)	RR (IC 95%)	Valor de p
bcl-2 positivo	9 (56,2)	0,918 (0,411-2,052)	1
bcl-2 negativo	7 (43,8)		

Tabela 5 – Frequência da expressão da p53 em pacientes vivas (n= 32)

	Pacientes n (%)	Valor de p
p53 positivo	8 (25)	0,005
p53 negativo	24 (75)	

Tabela 6 – Associação da expressão da proteína p53 e a realização da linfadenectomia pélvica completa (n=48)

Linfadenectomia pélvica completa	p53 positivo	p53 negativo	Total	Valor de p
Sim	7 (36,8)	7 (24,1)	14	p = 0,517
Não	12 (63,2)	22 (75,9)	34	
Total	19	29	48	

O número entre parênteses corresponde ao percentual

Tabela 7 – Associação da expressão da proteína p53 e tratamento complementar (n=45)

Tratamento complementar	p53 positivo	p53 negativo	Total	Valor de p
Sim	14 (77,8)	20 (74,1)	34	p = 1
Não	4 (22,2)	7 (25,9)	11	
Total	18	27	45	

O número entre parênteses corresponde ao percentual

5 ARTIGO CIENTÍFICO EM LÍNGUA INGLESA

P53 AND BCL-2 EXPRESSION IN ENDOMETRIAL CARCINOMA

Appel, M.L.M. MD¹; Edelweiss, M.I. PhD²; Fleck, J. PhD³; Rivero, L.F. MD²; Rivoire, W.A. MD¹; Mônego, H.I. MD¹; dos Reis, R. MD¹.

Departament of Gynecology and Obstetrics¹, Departament of Pathology² and Departament of Clinical Oncology³, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Medical Post-Graduate Program. School of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

Address correspondence to: Dra. Márcia Appel, Rua Comendador Caminha, 128/902, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, 90430-030. Fone/Fax: +55 51 33469397; e-mail: marciaappel@terra.com.br

ABSTRACT

Objectives: To check the frequency of p53 and bcl-2 immunohistochemical expression in patients with endometrial carcinoma and to correlate it with histological factors (histological type, tumor grade, depth of myometrial invasion, lymph node involvement and surgical staging) and survival.

Design: Historical cohort study

Institution: Hospital de Clínicas de Porto Alegre, a teaching hospital affiliated with the School of Medicine of Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Methods: Forty-eight patients with endometrial carcinoma who were submitted to primary surgical treatment were assessed. p53 and bcl-2 immunohistochemical expression was determined using paraffin blocks containing the tumor area.

Results: p53 and bcl-2 expression was detected in 39.6 and 58.3% of the tumors, respectively. No significant difference was found regarding the frequency of p53 expression when analyzing histological type (33.3% in endometrioid tumors, 58.3% in nonendometrioid tumors; $p = 0.176$), depth of myometrial invasion ($p = 0.632$) and surgical staging (I- 11.1%, II – 66.7%, III – 57.1%; $p = 0.061$). P53 expression was significantly more frequent in undifferentiated tumors ($p = 0.007$) and in those showing lymph node involvement ($p = 0.03$). The univariate analysis showed a positive association with death (RR 3.358 , CI 1.386 – 8.134; $p = 0.005$) and short-term survival. The present study did not reveal any correlation of bcl-2 expression with histopathological markers and survival.

Conclusion: This study showed that p53 expression is directly correlated with undifferentiated tumors, lymph node involvement and risk of death. On the other hand, bcl-2 expression was not correlated with known histological factors.

Keywords: endometrial cancer, p53, bcl-2, prognosis

1. INTRODUCTION

Endometrial carcinoma is one of the most common gynecological malignancies. In Brazil, where epidemiological notifications are inadequate, endometrial carcinoma ranks fifth among all tumors, being only surpassed by breast, cervical, colonic and stomach cancers¹.

Conventional prognostic markers used to determine the clinical course of endometrial carcinomas include histological type, tumor grade, depth of myometrial invasion, lymph node involvement and staging². This information is obtained by the histological analysis of surgical specimens. Clinical variables, such as age and ethnic group also have been regarded as important prognostic factors³.

Most women (75-88%) with endometrial carcinoma have early-stage disease at diagnosis^{4,5}. Because of that, these patients have a good prognosis, with a five-year survival rate between 80 and 85%⁵. However, the fact that 15 to 20% of these patients, with apparently curable disease, will have recurrent disease and will die, makes us speculate about the existence of additional factors that may be related to the risk of tumor progression and dissemination.

In the last few years, thanks to improvements in molecular biology, some biological markers have been suggested to be as important as or more important than conventional factors⁶. Several publications have regarded p53 (*P53*) and bcl-2 (*Bcl-2*) genes as possible markers of tumor aggressiveness.

P53 is considered a tumor suppressor gene. This gene expresses a protein called p53 which, due to injuries to the cell genome, halts the progression of the cell cycle and causes apoptosis (programmed cell death). The functional inactivation of p53 plays a crucial role in the malignant transformation process. It provides the tumor cell with a higher capacity for division and proliferation⁷. Twenty-one to 49% of endometrial carcinomas show abnormal p53 expression. Its positivity, seen in immunohistochemical analysis, seems to be related to undifferentiated, aggressive tumors, with a poor prognosis.

Bcl-2 is a gene that inhibits apoptosis. It encodes a protein with 25 to 26 kda (*bcl-2*), located in the mitochondrial membrane, endoplasmic reticulum and nuclear membrane⁸. The levels of *bcl-2* expression vary in a cyclic fashion in normal endometrium. These levels are higher during the proliferative phase and decrease in the secretory phase, thus suggesting hormonal regulation. Moreover, *bcl-2* expression, which is relatively high in normal endometrium, decreases in atypical hyperplasias and adenocarcinoma^{9,10}. Its sustained expression may be important at the early stages of endometrial carcinoma. *bcl-2* expression has been related to well-differentiated endometrial tumors, early-stage disease and disease with a good prognosis.

The aim of the present study was to check the frequency of p53 and bcl-2 immunohistochemical expression in patients surgically treated for endometrial carcinoma in our setting, and to correlate it with conventional histological and prognostic factors (histological type, tumor grade, depth of myometrial invasion, lymph node involvement and surgical staging) and survival.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Patients

Between January 1996 and December 2001, 52 consecutive patients with a histological diagnosis of endometrial carcinoma were submitted to primary surgical treatment at the Division of Genital Oncology of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). This division is considered a reference center for the treatment of endometrial carcinoma.

Patients with concomitant history or presence of any other malignancy and/or previously submitted to neoadjuvant therapy were excluded from the study. Therefore, four patients with previous history of malignancy (two with colon cancer, one with breast cancer and one with cervical cancer) were excluded from the initial group. Altogether, 48 patients participated in the study.

Out of these 48 patients, 11 (23%) were submitted to total hysterectomy with bilateral salpingo-oophorectomy with or without peritoneal cytology, and 37 patients (77%), in addition to total hysterectomy, were submitted to some form of pelvic lymph node dissection (total dissection or lymph node sampling) with or without peritoneal

cytology, .The number of pelvic lymph nodes dissected ranged from 2 to 40 (mean of 16.9; standard deviation of 9.71). In addition to pelvic lymphadenectomy, paraaortic lymph node sampling (2-8 lymph nodes, mean of 3.36) was performed in 11 patients.

It was possible to define surgical staging in 26 patients using the information obtained from the patients' histopathological records.

Of these 48 patients, 34 were referred for postsurgical adjuvant therapy and in three cases no mention of such indication was found on the medical records. Radiotherapy (teletherapy and/or brachytherapy) was the treatment of choice in 31 patients.

2.2. Study design, follow-up and ethics

A historical cohort was used. Surgical resection was regarded as zero time. The follow-up began after tumor resection, extending up to the patient's death or up to the end of the study period (December 2003). Related death (outcome) was that which was directly associated with the event (endometrial cancer). Information about the patients' survival was obtained from the medical records and also via phone calls and regular mail. Outpatients were instructed to see their doctor every three months during the first postoperative year, every four months in the second year and every six months in the third to the fifth years, and annually from the sixth year on. The study protocol was approved by the Research and Ethics Committee of the HCPA Graduate Research Group.

2.3. Analyzed Variables

Age and the description of the histological analysis of the surgical specimen were obtained from the review of medical records. The variables analyzed included age, histological type, tumor grade, depth of myometrial invasion, lymph node involvement and surgical staging.

Histological type and tumor grade were redefined by the analysis of the new hematoxylin-eosin-stained slides embedded in paraffin blocks containing the tumor area, which were later used for the immunohistochemical analysis. The cases in which the classification of the depth of myometrial invasion was based on outdated criteria (i.e, depth of myometrial invasion divided into thirds) were reclassified. The surgical specimen was obtained from the Division of Pathology of HCPA. The slides were assessed by two independent pathologists.

The histological classification satisfied the criteria established by the College of American Pathologists (CAP)¹¹. Endometrial lesions were divided into two large groups: endometrioid adenocarcinomas and nonendometrioid adenocarcinomas (whose subtypes include serous papillary carcinoma, clear cell carcinoma, mucinous carcinoma, squamous cell carcinoma, undifferentiated carcinoma and mixed-cell carcinoma). Adenosquamous carcinoma was considered, as occurs in most studies of this type, a nonendometrioid lesion^{12,13,14}.

According to their histological type, endometrioid adenocarcinomas were classified into: a. well-differentiated tumors (G1) – tumors including only glands; b.

moderately differentiated tumors (G2) – combination of glands and solid epithelial masses; c. undifferentiated tumors (G3) – predominant solid proliferations. Undifferentiated, serous, and clear cell carcinomas were considered undifferentiated lesions. Since no universally accepted criteria exist for the classification of mucinous carcinomas, we used the same classification used for endometrioid tumors¹¹.

The currently used classification for the depth of myometrial invasion is the following: A – no invasion (restricted to the endometrium); B – invasion less than or equal to 50% and C – invasion greater than 50%. (11) This new classification could not be used in only one case.

The surgical staging of endometrial carcinomas was defined according to the International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) staging (1988): I – disease restricted to the uterine corpus; II – cervical involvement and III – involvement of uterine adnexa and/or positive retroperitoneal lymph nodes and/or peritoneal cytology.

2.4. Immunohistochemical analysis

2.4.1 Antibodies and reagents

The following primary antibodies were used: mouse monoclonal anti-p53 antibody, which recognizes protein p53 (Dako Corporation code 7001 clone DO –7), and monoclonal anti-bcl-2 antibody, which recognizes bcl-2 (Dako Corporation).

2.4.2. Immunohistochemical technique – Preparation of slides

One section from each paraffin block was submitted to hematoxylin-eosin staining for histological analysis and confirmation of the tumor area. The subsequent sections were submitted to routine immunohistochemical analysis by the Division of Pathology of HCPA using the previously described primary antibodies. Only one slide was mounted with each monoclonal antibody using a single paraffin block. All reactions were performed with positive controls (breast cancer for p53 expression and lymph node for bcl-2 expression).

After deparaffinization and rehydration, antigen retrieval, inactivation of endogenous peroxidase and blocking of nonspecific reactions, the sections were incubated for two hours at ambient temperature with a diluted solution of primary antibodies (at 1:100 for p53 and 1:80 for bcl-2). The primary antibodies were located by subsequent use of the streptavidin-biotin peroxidase complex (LSAB, Dako) and revealed with diaminobenzidine tetrahydrochloride (kit DAB, Dako).

2.4.3. Immunohistochemical determination of p53 and bcl-2 expressions

Tumors were positive for p53 expression if 10% or more of the nuclei of tumor cells was stained brown (p53-positive).

Tumors were positive for bcl-2 expression if 10% or more of the cytoplasm of tumor cells was stained brown (bcl-2-positive).

The slides were examined by two independent pathologists who were blinded to the histological data. Cases with discrepant scores were later reassessed together until an agreement could be reached.

2.5. Statistical Analysis

Continuous variables are described as mean and standard deviation and categorical variables are described as proportions.

The correlation between p53 and bcl-2 expressions and the histopathological characteristics were analyzed by the chi-square test. Fisher's exact test was used whenever necessary. The survival analysis was made using the Kaplan-Meier method. The impact of each prognostic factor on survival was assessed by the log-rank test. The significance level was established at 5%. The Statistical Package for Social Sciences (SPSS) for Windows version 11.0 was used for the statistical analysis.

3. RESULTS

3.1. Patients

Forty-eight patients were assessed.

Age ranged from 34 to 90 years (mean of 65.6 years \pm 11.7 years). Twenty-six patients (54.2%) were 66 years old or younger and 22 patients (45.8%) were 67 years old or older.

The major histopathological characteristics are listed in Table 1.

3.2. Immunohistochemical analysis of p53 and bcl-2 expressions

P53 expression was positive in 19 cases (39.6%) (Figure 1).

Bcl-2 expression was positive in 28 cases (58.3%) (Figure 2).

3.3. p53 and bcl-2 expression versus age

The mean age for p53-positive patients was 66.4 \pm 11.6 years and 55.1 \pm 11.9 (p = 0.73) for p53-negative patients.

The mean age for bcl-2-positive patients was 66.3 \pm 10.2 years and 64.6 \pm 13.7 years (p=0.63) for bcl-2-negative patients.

3.4. p53 expression versus histopathological findings

The correlation between p53 expression and histopathological prognostic factors are summarized in Table 2. No statistically significant correlation was found between the frequency of p53 expression and histological type ($p = 0.176$), depth of myometrial invasion ($p = 0.632$) and surgical staging ($p=0.061$). P53 expression was more frequent in undifferentiated tumors ($p = 0.007$) and in those with lymph node involvement ($p = 0.030$).

3.5. bcl-2 expression versus histopathological findings

The correlation between bcl-2 expression and histopathological prognostic factors are summarized in Table 2. No statistically significant correlation was found between the frequency of bcl-2 expression and histological type, tumor grade, depth of myometrial invasion, surgical staging and lymph node involvement.

3.6. Mean follow-up and overall survival

The mean follow-up period ranged from 20 days to 99.5 months. Mean overall survival was 69.77 months (CI= 58.18 – 81.37). Sixteen patients died during the follow-up period.

3.7. p53 expression versus survival

The mean survival for the 19 p53-positive patients was 48.9 months (CI = 30.79 – 67.08) and for the 29 p53-negative patients it was 83.8 months (CI = 71.6 – 96.1) (log rank $p= 0.0023$) (Figure 3).

3.8. bcl-2 expression versus survival

The mean survival for the 28 bcl-2-positive patients was 72.48 months (CI = 58.12 – 86.84) and for the 20 bcl-2-negative patients it was 65.2 months (CI = 47.8 – 82.6) (log rank $p = 0.53$) (Figure 4).

3.9. p53 expression versus death

A significant correlation was observed between death and p53 expression. P53 expression is positively correlated with the occurrence of deaths (Table 3).

3.10. bcl-2 expression versus death

No correlation was observed between bcl-2 expression and death (Table 4)

4. DISCUSSION

Considerable effort has been made in order to identify the genetic and molecular changes observed in carcinomas in general and, especially, in endometrial

carcinoma, and to determine how they relate to the staging and prognosis of the disease.

Several studies carried out in patients with endometrial tumors have indicated that p53 and bcl-2 are important prognostic variables. The presence of p53 immunoreactivity, in addition to indicating abnormal protein expression – as a result of structural and/or functional changes – seems to be correlated with adverse factors. Undifferentiated lesions, deep myometrial invasion, lymph node involvement and advanced stage of the disease are associated with p53 positivity. Conversely, bcl-2 expression has been directly correlated with favorable clinical outcome and good histopathological prognostic factors (i.e., well-differentiated endometrioid tumors with superficial myometrial invasion and early staging). The theoretical basis for these clinical observations shows that p53 immunohistochemical expression and/or the loss or absence of bcl-2 expression is associated with tumors characterized by a high level of apoptosis and cellular proliferation. These characteristics are related to the possibility of tumor progression and dissemination^{15, 16}.

A recent model of endometrial carcinogenesis revealed that there are two different types of tumors: endometrioid adenocarcinoma (with a good prognosis) and nonendometrioid adenocarcinoma (with a dismal prognosis). Endometrioid tumors develop slowly and progressively as a result of endometrial hyperplasia in unopposed estrogen activity. It is characterized by sustained bcl-2 expression and late mutations to the *P53* gene, as confirmed by the absence of p53 in atypical hyperplasias and in low-grade lesions (stage I and II)^{6,17,18}. On the other hand, nonendometrioid adenocarcinomas (especially serous and clear cell carcinomas) develop in an

atrophic epithelium without estrogen stimulation, are aggressive and have a distinct biological environment. Gene mutation and p53 protein accumulation often are found in intraepithelial endometrial carcinoma, a histopathological entity identified as a precursor lesion for serous papillary carcinoma and observed in approximately 90% of cases^{17,19,20,21,22,23}. A study conducted by Kounelis et al¹⁸ showed the extension of p53 immunoreactivity to atypical and atrophic endometrial glands adjacent to the area of the invasive papillary tumor. This information proves that, in these cases, mutations to the *P53* gene occur early on in carcinogenesis.

Our study analyzed p53 and bcl-2 expressions and how they relate to conventional prognostic factors. Immunohistochemistry (IHC) was used to determine these expressions. This method, due to its easy application and low cost, has been widely used in studies of this type. Furthermore, it allows the use of stored biological material preserved for long periods of time in paraffin blocks. With regard to p53, there seems to be no difference as to immunoreactivity when different tumor fractions are analyzed, and its expression is not influenced by prolonged storage of paraffin blocks^{24,25}. Also, the use of monoclonal antibodies from different commercial sources does not seem to change the frequency of p53 expression²⁶. However, according to some studies, bcl-2 expression may vary with the type of monoclonal antibody used and with the technique used for the analysis. To some extent, this may explain the discrepant results described in the literature regarding bcl-2 expression¹⁸.

Unlike the techniques that employ polymerase chain reaction (PCR), the immunohistochemical analysis does not allow the identification of gene abnormalities. Positive results usually are associated with structural changes in the proteins

encoded by the gene. Simply put, we may say that abnormal proteins result from abnormal and mutant genes. However, immunoreactivity may occur only as a result of the binding of these proteins to other proteins, which could provide them with increased stability and allow them to accumulate in neoplastic cells. Conversely, the presence of specific types of mutations (e.g.: frame-shift) produces truncated or unstable proteins, which go undetected by IHC. Therefore, in practice, IHC has low sensitivity, low specificity and reasonable predictive value for the determination of gene mutation carriers²⁷.

In endometrial carcinomas, p53 expression in IHC may not be associated with gene mutation, especially in endometrioid tumors. In these cases, the binding of p53 to other nuclear proteins, forming highly stable protein complexes, apparently explains its immunoreactivity. On the other hand, in nonendometrioid lesions, especially in serous tumors, which are more aggressive, gene mutations are more common^{23, 28}. With regard to bcl-2, its expression in solid tumors hasn't been associated with abnormal genes²⁹.

In our study, we detected nuclear p53 expression in 39.6% of cases. This overall frequency is consistent with the literature, which describes rates between 21 and 49%^{25,18}.

As far as the clinical variables are concerned, we did not find any association of p53 expression with patient ages. This also was described by Geisler et al.¹². We could not assess the correlation of p53 expression with ethnic group, as race was not properly specified in the medical records. Kohler et al.²⁵ observed an increased p53

expression in endometrial tumors in black patients. The influence of ethnic differences and high rates of miscegenation of the Brazilian population on biological markers and on other prognostic factors has not been clarified yet.

As to histological type, we found that 58.3% of nonendometrioid tumors and 33.3% of endometrioid tumors had p53 expression. Although this difference shows a tendency, it was not statistically significant ($p = 0.176$). In the review of the literature, the difference in p53 expression between these two types of tumors is more relevant. Geisler et al.¹² observed that 57.3% of endometrioid tumors and 94.1% of nonendometrioid tumors had p53 expression ($p < 0.001$). In Brazil, Bonfitto et al.³⁰ studied 51 cases and observed p53 expression in 16% of endometrioid tumors and in 71% of nonendometrioid tumors ($p < 0.05$) in uterine curettage specimens. By analyzing only serous and clear cell tumors, Kounelis et al.¹⁸ found positivity rates in 76 to 100% of cases. In our study, the separate assessment of these subtypes also showed a high p53 expression (80%), despite the small number of cases (5 cases).

We noted increased p53 expression in poorly differentiated tumors (G3 71.4% X G2 35% X G1 14.3%; $p = 0.007$). Similar results were obtained in several studies^{12,25,31,32}. We did not find any significant difference in p53 expression in relation to the depth of myometrial invasion. By studying 46 patients with endometrial carcinoma, Geisler et al.¹² found out that p53 expression was more frequent in advanced-stage and undifferentiated tumors, but they also could not find any difference as to myometrial invasion.

p53 expression wasn't statistically different when analysed surgical staging. However, when only lymph node involvement, which characterizes stage IIIC, was analyzed, we observed that p53 immunoreactivity was more frequent in this situation ($p = 0.030$). Lymph node involvement is currently regarded as the most important prognostic variable⁶. The literature abounds with studies that show a direct association of advanced surgical staging and lymph node involvement with p53 expression^{12,25,31,32}. Extensive lymph node dissection or only lymph node sampling and the impossibility to determine about the surgical staging in twenty two cases are possible limitations of this study. Patients submitted to pelvic lymph node sampling – a surgical approach that is commonly used in the first years of study – may have been understaged and somehow interfered with the results.

Studies have correlated p53 expression with a decrease in overall survival in patients with endometrial tumors. Ohkouchi et al.⁶ noted that the five-year survival for stage III/IV patients varied according to p53 expression. Its presence was related to 40.4% of survival whereas its absence was equivalent to 75.7%. Oreskovic et al.²⁷ also observed that p53 positivity was associated with poor survival in G1 and G2 tumors. Ito et al.³³ studied 221 patients with early-stage disease and found that p53 expression was present in 50% of the patients who died and in only 8% of living and disease-free patients. In our study, according to the univariate analysis, p53 positivity was associated with risk of death. Among the patients who died, 68.7% had p53 expression (Table 3). Conversely, only 25% of living and disease-free patients were p53 -positive (Table 5). This result was not influenced by the extension of the surgical procedure (lymph node sampling or extensive pelvic lymphadenectomy) or by adjuvant therapy – factors potentially related to recurrence and/or survival – since we

did not find a statistically significant difference when these variables and p53 expression were analyzed (Tables 6 and 7).

The multivariate analysis did not allow us to characterize p53 expression as an independent prognostic factor when compared to histological type and tumor grade, myometrial invasion and staging. This finding is not consistent with the data described in the literature^{6,14,26,33}. Nevertheless, our study is not suitable for this type of analysis because of the small number of cases and outcomes.

Cytoplasmic bcl-2 expression was observed in 58.3% of the carcinomas we analyzed. The literature describes rates between 34 and 85%¹⁸, depending on the selection of patients.

Our study did not demonstrate any correlation of bcl-2 expression with age, histological type and tumor grade, depth of myometrial invasion and survival (Tables 2 and 4, Figure 4).

Controversy exists in the literature over the correlation between bcl-2 expression and prognostic factors. Some prostate tumors and neuroblastomas with positive bcl-2 immunoreactivity have a highly aggressive biological behavior. This can be explained by the resistance to hormone and/or cytotoxic therapy, due to the persistence of bcl-2 expression and its capacity to inhibit apoptosis³⁴. With regard to endometrial carcinoma, however, several studies show that the increased bcl-2 expression is associated with some favorable prognostic factors – endometrioid-like well-differentiated lesions in initial stages^{10,35,36,37,38}. Far from being a clearly defined

issue, some other studies do not show similar results^{13,18}. Kounelis et al.¹⁸ studied 61 patients and did not find any significant difference in bcl-2 expression when histological type, tumor grade and staging were analyzed. Giatromanolaki et al.¹³ assessed 133 patients and did not find any relation of this marker with tumor grade, depth of myometrial invasion and lymphovascular invasion. Sakuragi et al.³⁹ did not observe any significant difference in bcl-2 expression when lymph node involvement and tumor grade were analyzed, but this expression was inversely proportional to myometrial invasion ($p < 0.025$).

In conclusion, our study showed that p53 expression was directly associated with death and with a dismal prognosis (tumor grade, serous and clear-cell lesions and lymph node involvement). This finding relates p53 expression to increased tumor aggressiveness. It may even become an independent prognostic factor, being important in patients with low-grade carcinomas (early-stage and well-differentiated tumors). A larger number of patients should be studied so that this information can be obtained. On the other hand, bcl-2 expression was not associated with known prognostic factors. This does not invalidate the importance that has been given by the literature to markers of apoptosis, since apoptosis seems to result from a highly complex system, with the participation of several genes. With regard to the endometrium, possible influences on bcl-2 expression include the activity of hormone receptors, especially progesterone receptors, and the activity of bcl-2 homologous proteins, namely, bax, bcl-x, bcl-xs – which were not included in our study.

REFERENCES

1. Instituto Nacional do Câncer. Estimativas da Incidência e mortalidade por câncer no Brasil. 2003. Disponível em <[http:// www. inca.gov.br](http://www.inca.gov.br)>
2. Hacker NF. Uterine Cancer. In: Berek, JS, Hacker NF. Practical Gynecologic Oncology. 3 rd. edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2000.
3. Axtell LM, Myers MH Contrasts in survival of black and white cancer patients. J Natl Cancer Inst 1978; 60: 1209-15.
4. Greenlee RT, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 2000. CA Cancer J Clin 2000; 50: 7-33.
5. Mariani A, Sebo TJ, Katzmann JA, Jerry A, Keeney GL, Roche PC, et al. Pretreatment assessment of prognostic indicators in endometrial cancer. Am J Obstet Gynecol 2000; 182(6):1535-44.
6. Ohkouchi T, Sakuragi N, Watari H, Nomura E, Todo Y, Yamada H, et al. Prognostic significance of bcl-2, p53 overexpression, and lymph node metastasis in surgically staged endometrial carcinoma. Am J Obstet Gynecol 2002; 187 (2): 353-9.
7. Nishioka H, Hiasa Y, Hayashi I. Immunohistochemical detection of p53 oncoprotein in human oral squamous cell carcinomas and leukoplasias: comparison with proliferating cell nuclear antigen staining and correlation with clinicopathological findings. Oncology 1993; 50: 426-9.

8. Morsi HM, Leers MP, Radespiel-Tröger M, Björklund V, Kabarity HE, et al. Apoptosis, bcl-2 expression, and proliferation in benign and malignant endometrial epithelium: an approach using multiparameter flow cytometry. *Gynecol Oncol* 2000; 77: 11-7.
9. Marone M, Ferrandina G, Macchia G, Mozzetti S. *Bcl-2*, bax, bcl-xl and bcl-xs expression in neoplastic and normal endometrium. *Oncology* 2000; 58: 161-8.
10. Coppola D, Fu L, Nicosia SV, Kounelis S, Jones M. Prognostic significance of p53, bcl-2, vimentin, and S100 protein-positive Langerhans cells in endometrial carcinoma. *Human Pathol* 1998; 29 (5): 455-62.
11. College of American Pathologists. Available from < http://www.cap.org/apps/docs/cancer_protocols/protocols_indexhtml> Revised in January 2004.
12. Geisler JP, Wiemann MD, Zhou Z, Miller GA, Geisler HE. p53 as a prognostic indicator in endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 1996; 61: 245-8.
13. Giatromanolaki A, Sivridis E, Koukourakis MI, Harris AL, Gatter KC. *Bcl-2* and p53 expression in stage I endometrial carcinoma. *Anticancer Res* 1998;18: 3689-94.
14. Geisler JP, Geisler HE, Wiemann MD, Zhou Z, Miller GA, Crabtree W. p53 expression as a prognostic indicator of 5-year survival in endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 1999; 74: 468-71.
15. van Slooten HJ, van de Vivjer van de Velde CJ, van Dierendonck JH. Loss of bcl-2 in invasive breast cancer is associated with high rates of cell death, but also with increased proliferative activity. *Br J Cancer* 1998; 77: 789-96.

16. Bonnefoy-Berard N, Aouacheria A, Verschelde C, Quemeneur L, Marçais A, Marvel J. Control of proliferation by *Bcl-2* family members. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1644: 159-68.
17. Boyd J. Molecular biology in the clinicopathologic assessment of endometrial carcinoma subtypes – Editorial. *Gynecol Oncol* 1996; 61: 163-65.
18. Kounelis S, Kapranos N, Kouri E, Coppola D, Papadaki H, Jones M. Immunohistochemical profile of endometrial adenocarcinoma: a study of 61 cases and review of the literature. *Mod Pathol* 2000; 13(4): 379-88.
19. Ambros RA, Sherman ME, Zahm CM, Bitterman P, Kurman RJ. Endometrial intraepithelial carcinoma: a distinctive lesion specifically associated with tumors displaying serous differentiation. *Hum Pathol* 1995; 26: 1260-67.
20. Sherman ME, Bur ME, Kurman RJ. p53 in endometrial cancer and its putative precursors: evidence for diverse pathways of tumorigenesis. *Hum Pathol* 1995; 26: 1268-74.
21. Spiegel, GW. Endometrial carcinoma in situ in postmenopausal women. *Am J Surg Pathol* 1995; 19: 417-32.
22. Burton JL, Wells M. Recent advances in the histopathology and molecular pathology of carcinoma of the endometrium - review. *Histopathology* 1998; 33: 297-303.
23. Sakuragi N, Hirai A, Tada M, Yamada H, Yamamoto R, Fujimoto S, et al.. Dominant-negative mutation of p53 tumor suppressor gene in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 2001; 83: 485-90.
24. Kohler MF, Kerns BJ, Humprey PA, Marks JR, Bast RC, Berchuck A. Mutation and overexpression of p53 in early-stage epithelial ovarian cancer. *Obstet Gynecol* 1993; 81: 643-50.

25. Kohler MF, Carney P, Dodge R, Soper J, Clarke-Pearson DL, Marks JR, et al. Gynecology: p53 overexpression in advanced-stage endometrial adenocarcinoma. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 175(5): 1246-52.
26. Soong R, Knowles S, Williams KE, Hammond IG, Wysocki SJ, Iacopetta BJ. Overexpression of p53 protein is an independent prognostic indicator in human endometrial carcinoma. *Br J Cancer* 1996; 74: 562-67.
27. Oreskovic S, Babic D, Kalafatic D, Barisic D, Beketic-Oreskovic L.A. Significance of immunohistochemical determination of steroid receptors, cell proliferation factor Ki-67 and protein p53 in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 2004; 93: 34-40.
28. Tashiro H, Isacson C, Levine R, Kurman RJ, Cho KR, Hedrick L. p53 gene mutations are common in uterine serous carcinoma and occur early in their pathogenesis. *Am J Pathol* 1997; 150: 177-85.
29. Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Lin HK, Liebermann DA, et al. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 1994; 9: 1799-1805.
30. Bonfitto VL, Andrade LA. p53, estrogen and progesterone receptors in diagnostic curettage for endometrial adenocarcinoma and their correlation with morphological data and disease stage at hysterectomy. *Sao Paulo Med J* 2003; 121 (4): 163-6.
31. Kohler MF, Berchuck A, Davidoff AM, Humphrey PA, Dodge RK, Iglehart JD, et al. Overexpression and mutation of p53 in endometrial carcinoma. *Cancer Res* 1992; 52 (6): 1622-7.

32. Hamel NW, Sebo TJ, Wilson TO, Keeney GL, Roche PC, Suman VJ et al. Prognostic value of p53 and proliferation cell nuclear antigen expression in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 1996; 62: 192-98
33. Ito K, Watanabe K, Nasim S, Sasano H, Sato S, Yajima A, et al. Prognostic significance of p53 overexpression in endometrial cancer. *Cancer Res* 1994; 54 (17): 4667-70.
34. Derossi DR, Ito K, Couto Filho J, Bacchi CE. Avaliação da expressão da proteína bcl-2 no carcinoma de mama: estudo em punção aspirativa por agulha fina; correlação com grau histológico em espécimes cirúrgicos correspondentes. *J Bras Patol Med Lab* 2003; 39(3): 229-35.
35. Yamauchi N, Sakamoto A, Uozaki H, Iihara K, Machinami R. Immunohistochemical analysis of endometrial adenocarcinoma for bcl-2 and p53 in relation to expression of sex steroid receptor and proliferative activity. *Int J Gynecol Pathol* 1996; 15: 202-208.
36. Taskin M, Lallas TA, Barber HR, Shevchuk MM. *Bcl-2* and p53 endometrial adenocarcinoma. *Mod Pathol* 1997; 10(7): 728-34.
37. Saegusa M, Okayasu I. *Bcl-2* is closely correlated with favorable prognostic factors and inversely associated with p53 protein accumulation in endometrial carcinomas: immunohistochemical and polymerase chain reaction/loss of heterozygosity findings. *J Cancer Res Clin Oncol* 1997; 123: 429-34.
38. Geisler JP, Geisler HE, Wiemann MC, Zhou Z, Miller GA, Crabtree W. Lack of bcl-2 persistence: an independent prognostic indicator of poor prognosis in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 1998; 71: 305-307.

39. Sakuragi N, Ohkouchi T, Hareyama H, Ikeda K, Watari H, Fujimoto T, et al. *Bcl-2* expression and prognosis of patients with endometrial carcinoma. *Int J Cancer* 1998; 79: 153-8.

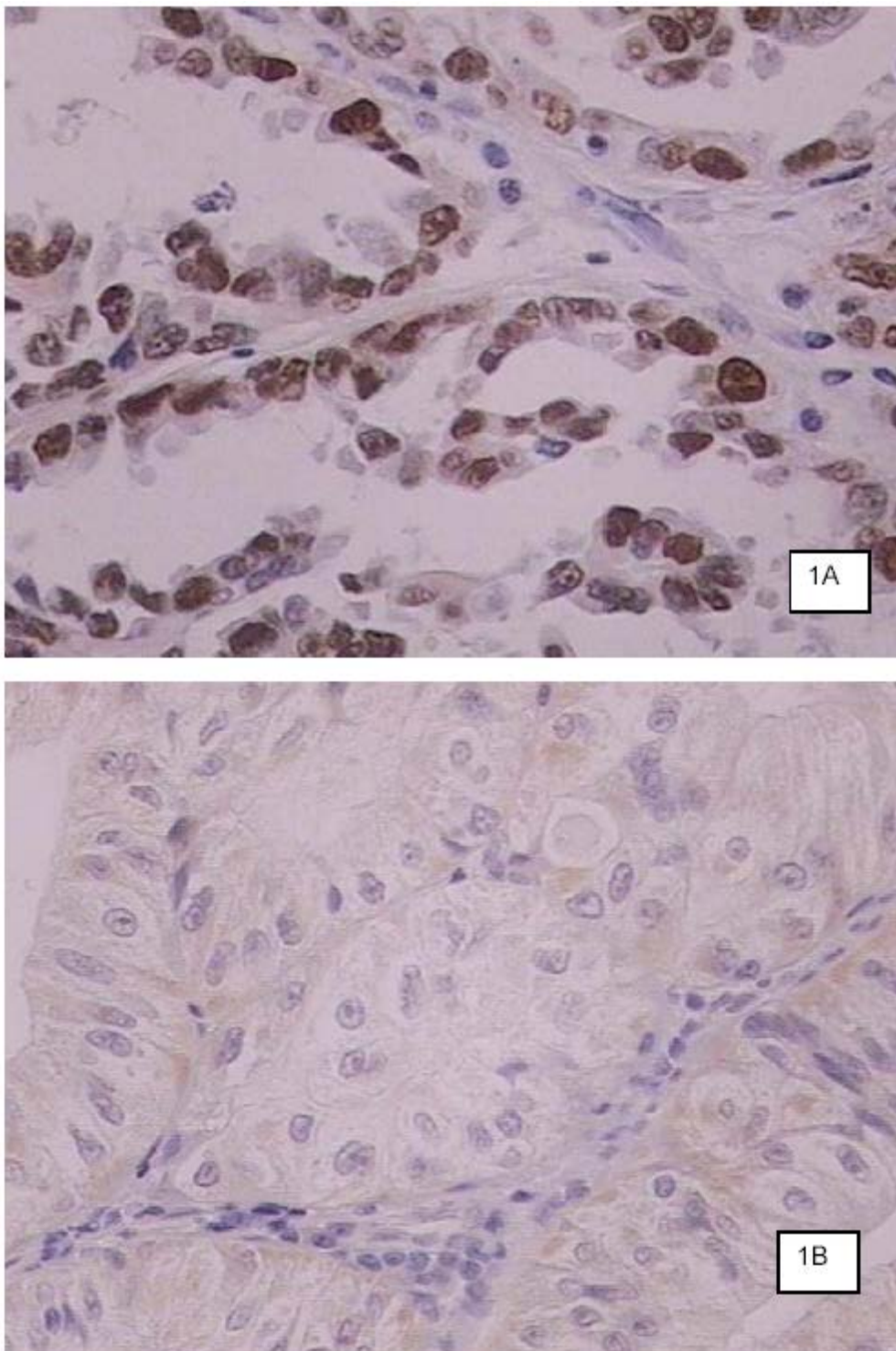


Figure 1 – Immunohistochemical analysis of p53 expression: (1A) Positive and (1B) Negative. The expression was observed in the nucleus (arrow) of tumor cells

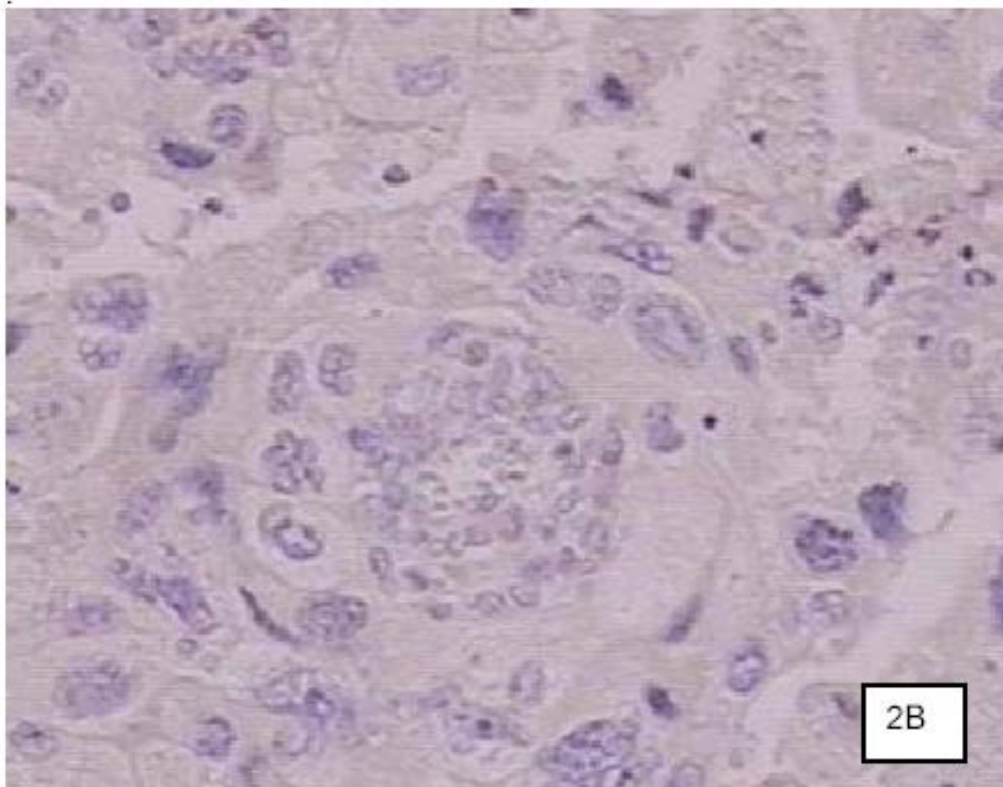
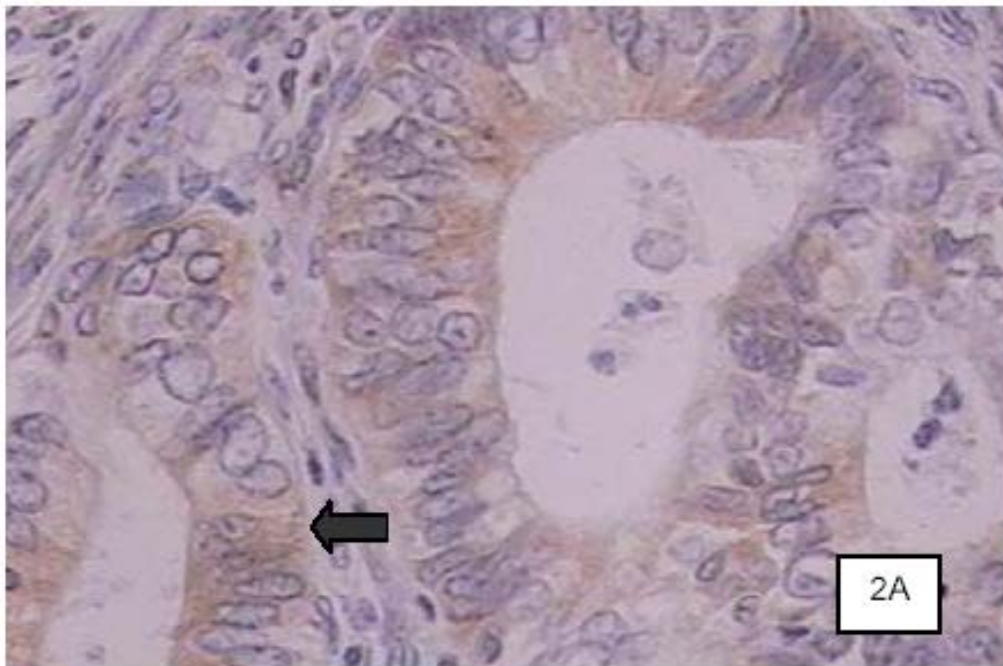


Figure 2 - Immunohistochemical analysis of bcl-2: (2A) Positive and (2B) Negative.

The expression was observed in the cytoplasm (arrow) of tumor cells.

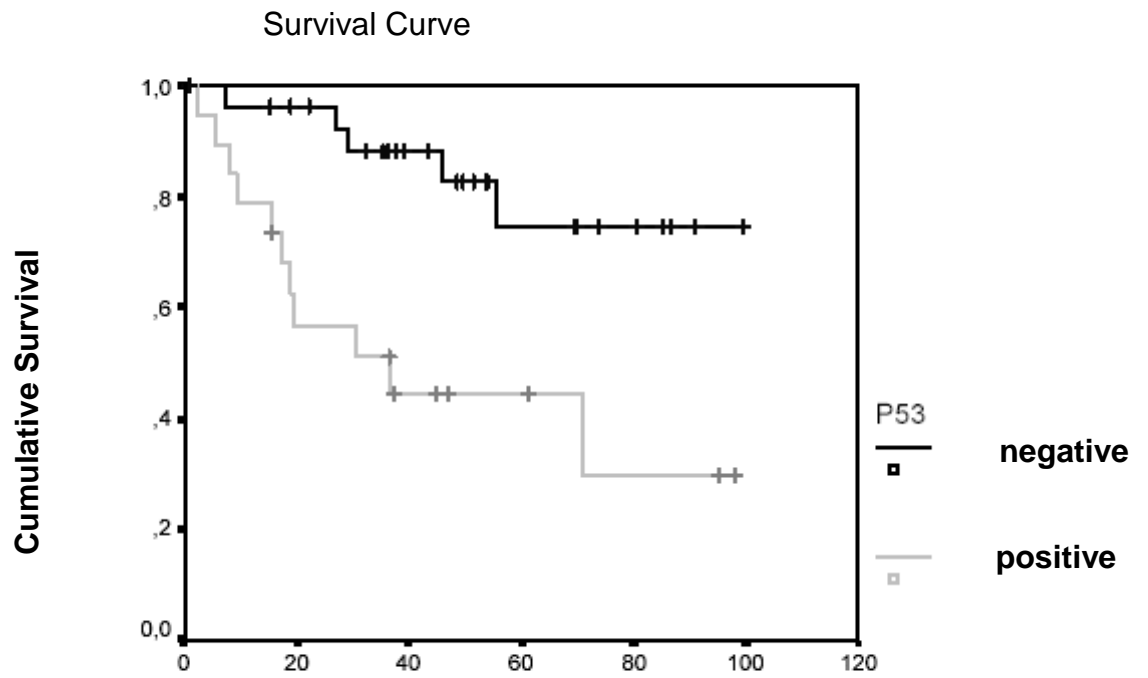


Figure 3 – Survival curves according to p53 expression.

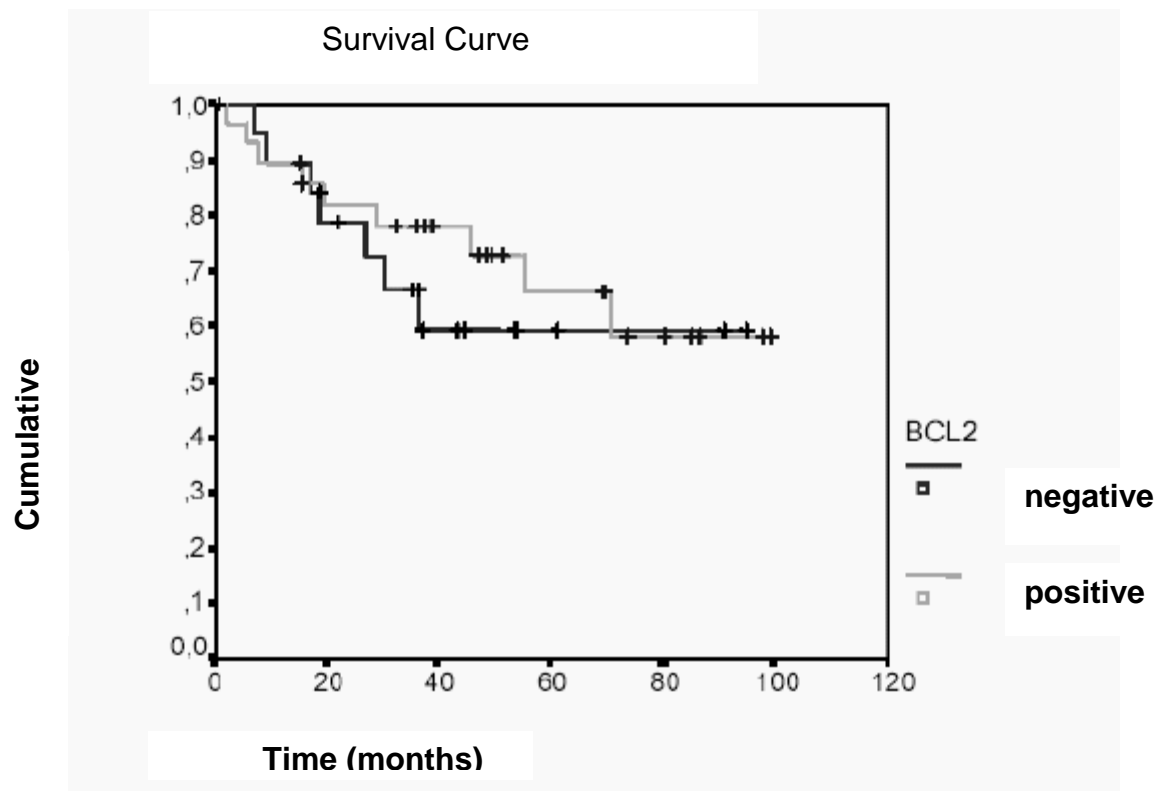


Figure 4 - Survival curves according to bcl-2 expression.

**Table 1 – Histopathological characteristics of endometrial tumors resected at the
Division of Genital Oncology of HCPA**

Characteristics	Number of patients
Histological type	(n=48)
Endometrioid	36 (75%)
Nonendometrioid	12 (25%)
Serous papillary	4
Adenosquamous	3
Mucinous	2
Undifferentiated	2
Clear cells	1
Tumor grade*	(n=48)
G1	14 (29.2%)
G2	20 (41.6%)
G3	14 (29.2%)
Depth myometrial invasion*	(n=48)
No invasion	2 (4.2%)
Less than or equal to 50%	19 (39.6%)
Greater than 50%	26 (54.2%)
Middle third invasion	1 (2%)
Surgical staging**	(n=26)
I	9 (34.6%)
II	3 (11.5%)
III	14 (53.9%)
Lymph node involvement (stage IIIC)**	(n=37)
Positive	5 (13,5%)
Negative	32 (86,5%)

*Following the College of American Pathologists (ACP) criteria

**According to FIGO, 1988

Table 2 – Association between p53 and bcl-2 expressions and the histological characteristics of patients with endometrial carcinoma submitted to primary surgical treatment

Characteristics	p53 pos	p53 neg	p value	bcl-2 pos	Bcl-2 neg	p value
Histological type						
Endometrioid	12 (33)	24 (66.7)	0.176	21 (58.3)	15 (41.7)	1
Nonendometrioid	7 (58.3)	5 (41.7)		7 (58.3)	5 (41.7)	
Myometrial invasion						
No myometrial invasion	1 (50)	1 (50)	0.632	1 (50)	1 (50)	0.855
Less than or equal to 50%	6 (31.6)	13 (66.4)		11 (57.9)	8 (42.1)	
Greater than 50%	12 (46.2)	14 (53.8)		15 (57.7)	11 (42.3)	
Middle third invasion		1 (100)		1 (100)		
Tumor grade						
(G1)	2 (14.3)	12 (87.5)	0.007	8 (57.1)	6 (42.9)	0.285
(G2)	7 (35)	13 (65)		14 (70)	6 (30)	
(G3)	10 (71.4)	4 (28.6)		6 (42.9)	8 (57.1)	
Surgical staging						
I	1 (11.1)	8 (88.9)	0,061	4 (44.4)	5 (55.6)	0,608
II	2 (66.7)	1 (33.3)		2 (66.7)	1 (33.3)	
III	8 (57.1)	6 (42.1)		5 (35.7)	9 (64.3)	
Lymph node involvement (IIC)						
Positive	4 (80)	1(20)	0.030	1 (20)	4 (80)	0.285
Negative	8 (25)	24 (75)		20 (62.5)	12 (37.5)	

The number in parentheses corresponds to the percentage value

Table 3 – Association between p53 expression and death (n=16)

	Death n (%)	RR (95%CI)	p value
p53-positive	11 (68.7)	3.358 (1.386-8.134)	0.005
p53-negative	5 (31.3)		

Table 4 – Association between bcl-2 expression and death (n=16)

	Death n (%)	RR (95%CI)	p value
bcl-2-positive	9 (56.2)	0.918 (0.411-2.052)	1
bcl-2-negative	7 (43.8)		

Table 5 – p53 expression in living patients (n=32)

	Patients n (%)	p value
p53-positive	8 (25)	0.005
p53-negative	24 (75)	

Table 6 – Association of p53 expression and extensive pelvic lymphadenectomy**(n=48)**

Extensive pelvic lymphadenectomy	p53-positive	p53-negative	Total	p value
YES	7 (36.8)	7 (24.1)	14	0.517
NO	12 (63.2)	22 (75.9)	34	
TOTAL	19	29	48	

The number in parentheses corresponds to the percentage value.

Table 7 – Association of p53 expression and adjuvant therapy (n=45)

Adjuvant therapy	p53-positive	p53-negative	Total	p value
YES	14 (77.8)	20 (74.1)	34	1
NO	4 (22.2)	7 (25.9)	11	
TOTAL	18	27	45	

The number in parentheses corresponds to the percentage value.