THAIS GOMES DE ALMEIDA

**Análise da expressão do fator de crescimento HER-2 e do
fator de transcrição FOXO3a em sarcomas e
carcinossarcomas uterinos**

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Programa de Obstetrícia e Ginecologia

Orientadora: Profa. Dra. Kátia Cândido
Carvalho

**São Paulo
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Almeida, Thais Gomes de

Análise da expressão do fator de crescimento HER-2 e do fator de transcrição FOXO3a em sarcomas e carcinossarcomas uterinos / Thais Gomes de Almeida. -- São Paulo, 2015.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Obstetrícia e Ginecologia.

Orientadora: Kátia Cândido Carvalho.

Descritores: 1.Leiomiossarcoma 2.Sarcoma do estroma endometrial
3.Receptor ErbB-2 4.Carcinossarcoma 5.Hibridização *In Situ* fluorescente
6.Imunoistoquímica

USP/FM/DBD-384/15

Aos meus pais, **José Altino de Almeida e Ludmila Gomes de Almeida**, exemplos de amor incondicional, pelo incentivo, compreensão e apoio constante.

Às **pacientes**, motivação maior pela busca do conhecimento, pela coragem, fé e luta pela vida.

A **Deus e à Nossa Senhora Aparecida**, por guiar meus passos e minhas decisões em todos os momentos da vida pessoal e profissional.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra Kátia Cândido Carvalho, por toda a dedicação, paciência e profissionalismo na elaboração e orientação desse trabalho. Obrigada pela oportunidade de ser sua aluna, de compartilhar seus conhecimentos e de me fazer crescer profissionalmente com seus ensinamentos.

Aos Profs. Dr. Edmund Chada Baracat e Dr. Gustavo Arantes Maciel, pela sugestão do tema desta dissertação, incentivo e orientações pertinentes e de grande relevância para delineamento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcelo Alvarenga Calil, por todo apoio e confiança. Muito obrigada por incentivar meu ingresso na pós-graduação.

Aos patologistas Dra. Isabela Werneck, Dr. Luciano Bottura e Dra. Kátia Pincerato, pela importante ajuda e colaboração direta na confecção deste trabalho.

À patologista Dra. Filomena Marino Carvalho, pelo apoio e importante participação na minha banca de qualificação.

Ao Dr. Marcos Roberto Ymayo e à Irmã Monique Bourget, por todo apoio, consideração e confiança em meu trabalho.

Aos meus grandes mestres Dr. Ronaldo Lúcio Rangel Costa, Dr. Francisco Ricardo Gualda Coelho, Dra. Elza Mieko Fukazawa e Dr. Gilberto Kendi Takeda, responsáveis diretos por minha formação e escolha profissional em Oncoginecologia . A todos minha eterna admiração e respeito.

Aos amigos Dra. Mireille Darc Cavalcante Brandão e Dr. Moíses Yoshifumi Komatsu do Hospital Santa Marcelina, e à Dra. Carla Baltazar de Souza do Hospital IBCC/Santa Marcelina, pelo apoio, companheirismo e ajuda fundamentais para que eu pudesse concluir essa dissertação.

Às amigas Mayara Facundo e Flávia Libonati, pelo carinho e amizade sincera. À amiga Carla Testa, pela ajuda primordial no início deste trabalho.

Aos demais colegas do Departamento de Ginecologia do IBCC e Hospital Santa Marcelina com os quais tenho prazer de trabalhar, e aos queridos residentes de ambas as instituições, por fazerem parte da minha vida e servirem de incentivo para o aprendizado constante.

Aos meus irmãos, tios e avós, pela motivação e apoio a mim dado, por entenderem minha ausência em alguns momentos, em especial, ao meu irmão Alison, pela cooperação nos momentos difíceis, e aos meus sobrinhos amados que nasceram durante todo esse processo.

Aos meus tios Geraldo Magela e Mônica Gomes, minha segunda família, pelo amor, carinho e apoio. Serei sempre grata por tudo.

Agradeço a todos os colegas do LIM 58 pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho, Thiago Hideki, Marinalva de Almeida, Juciara Costa, Natália Garcia, Laura dos Anjos e Carla.

Agradeço, também, aos técnicos do Hospital A C Camargo Cancer Center José Ivanildo Neves e Carlos Ferreira Nascimento por toda ajuda prestada. Ao André Lavorato, pela ajuda com as análises estatísticas, e à Valquíria Dias, pela assessoria científica.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento dessa pesquisa (2012/23652-0).

*"Por vezes, sentimos que aquilo que fazemos não é
senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor
se lhe faltasse uma gota".*

Madre Teresa de Calcutá

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação: Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3^a Ed. São Paulo: Serviços de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO.....	2
1.1 Sarcomas uterinos.....	2
1.2 Embriologia e histogênese dos sarcomas ginecológicos	2
1.3 Classificação histológica	3
1.4 Incidência e etiologia.....	4
1.5 Estadiamento	6
1.6 Prognóstico e sobrevida	8
1.7 Diagnóstico	9
1.8 Tratamento padrão dos sarcomas uterinos	10
1.9 Subtipos histológicos.....	11
1.9.1 Leimiossarcoma (LMS).....	11
1.9.1.1 <i>Quadro clínico</i>	12
1.9.1.2 <i>Particularidades do tratamento</i>	13
1.9.1.3 <i>Biologia do tumor</i>	13
1.9.2 Sarcoma do estroma endometrial (SEE)	14
1.9.2.1 <i>Quadro clínico</i>	16
1.9.2.2 <i>Particularidades do tratamento</i>	16
1.9.2.3 <i>Biologia do tumor</i>	17
1.9.3 Adenossarcomas (AS).....	18
1.9.3.1 <i>Quadro clínico</i>	19
1.9.3.2 <i>Particularidades do tratamento</i>	19
1.9.3.3 <i>Biologia do tumor</i>	20
1.9.4 Carcinossarcoma (CS)	20
1.9.4.1 <i>Quadro clínico</i>	20
1.9.4.2 <i>Particularidades do tratamento</i>	21
1.9.4.3 <i>Biologia do tumor</i>	21

1.10 Aspectos moleculares dos sarcomas uterinos	22
1.10.1 Receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2 - HER-2	23
1.10.2 Fator de transcrição – FOXO3a	28
2 OBJETIVOS	34
2.1 Geral	34
2.1 Específicos	34
3 CASUÍSTICA E MÉTODOS	36
3.1 Seleção dos casos	36
3.2 Coleta de dados	37
3.3 Variáveis coletadas	37
3.4 Construção do Tissue Microarray –TMA	38
3.5 Reações de imunoistoquímica (IIQ)	38
3.6 Avaliação da expressão das proteínas	40
3.7 Protocolo de Hibridização <i>in Situ</i> Fluorescente (FISH)	41
3.8 Protocolo de Hibridização <i>in Situ</i> Cromogênica (SISH)	42
3.9 Análise Estatística	43
4 RESULTADOS	46
4.1 Dados demográficos, clínicos e cirúrgicos	46
4.2 Imunoistoquímica (IIQ)	48
4.3 Estado gênico de HER-2	51
4.4 Correlação dos achados moleculares e dados clínico patológicos	54
5 DISCUSSÃO	62
6 CONCLUSÕES	68
7 ANEXOS	70
7.1 ANEXO A - Carta de aprovação do projeto no Comitê de Ética em Pesquisa CEP-FMUSP	70
7.2 ANEXO B - Ficha de coleta de dados das pacientes	71
7.3 ANEXO C - Mapa de TMA - <i>Tissue microarray</i> - de sarcomas e carcinossarcomas uterinos	72
7.3 ANEXO D - Mapa de TMA - <i>Tissue Microarray</i> - de leiomiomas e leiomiiossarcomas uterinos	73
8 REFERÊNCIAS	75
9 APÊNDICES	
9.1 APÊNDICE A - Artigo publicado na revista <i>Medical Express</i>	

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AS	Adenossarcoma
CS	Carcinossarcoma
EGF	Fator de crescimento epidérmico
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
ErbB	Produto gênico da eritroblastose viral
FC	Fator de crescimento
FIGO	Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
FISH	Hibridização <i>in situ</i> fluorescente
FOXO3a	FKHRL1 – forkhead em rabdomiossarcoma como proteína 1
HC/FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
H.E	Hematoxilina e Eosina
HER-2	Receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2
HT	Histerectomia total
I IQ	Imunoistoquímica
IκB	Proteínas inibidoras de kappa B
IKK	Enzima quinase das proteínas inibidoras de kappa B
LMS	Leimiossarcoma
MM	Miométrio
NEE	Nódulo do estroma endometrial
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Solução Salina Fosfatada
PI3K/ AKT	Fosfatidilinositol-3 quinase
RE	Receptor de estrogênio
RP	Receptor de progesterona

RM	Ressonância magnética
SEE	Sarcoma do estroma endometrial
SEE-AG	Sarcoma do estroma endometrial de alto grau
SEE-BG	Sarcoma do estroma endometrial de baixo grau
SG	Sobrevida global
SLD	Sobrevida livre de doença
SISH	Hibridização <i>in situ</i> cromogênica
SOB	Salpingooforectomia bilateral
SUI	Sarcoma uterino indiferenciado
TMA	Microarranjo de tecido
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial
WHO	<i>World Health Organization</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura do receptor do fator de crescimento epidérmico	24
Figura 2	Perspectiva de sistema da família de proteínas ERBB.....	25
Figura 3	Ativação das vias de sinalização envolvidas na programação celular	26
Figura 4	Subfamílias das proteínas Fox descritas em diferentes espécies.....	29
Figura 5	Funções dos fatores de transcrição FOXO nas células e nos organismos.	30
Figura 6	Vias de sinalização das quinases oncogénicas (Akt, IKK e ERKF) e seu alvo FOXO3a.....	31
Figura 7	Fotomicrografias dos tecidos corados por HE (40x) dos seguintes tipos histológicos: Leiomiossarcoma (LMS), Carcinossarcoma (CS), Sarcoma do Estroma Endometrial (SEE) e Adenossarcoma (AS)	49
Figura 8	Forte expressão nuclear do FOXO3a (40x) dos seguintes tipos histológicos: Leiomiossarcoma (LMS), Carcinossarcoma (CS), Sarcoma do Estroma Endometrial (SEE) e Adenossarcoma (AS)	50
Figura 9	Expressão negativa de HER-2 em Leiomiossarcoma (LMS), Sarcoma do Estroma Endometrial (SEE), Adenossarcoma (AS) e Sarcoma uterino indiferenciado (SUI). Carcinossarcoma uterino mostrando forte expressão imunoistoquímica na membrana celular (3+) para HER-2.....	51
Figura 10	- Amplificação de HER-2. Sinais vermelhos - HER-2, verdes - cromossomo 17. (A) Integridade nuclear; (B) Ausência de amplificação; (C) sinal amplificado na amostra de carcinossarcoma; (D) Amplificação de pelo menos 10 cópias.	52
Figura 11	Leiomiossarcoma uterino com sonda <i>Vysis LSI Dual Color</i> (HER-2 em vermelho; cromossomo 17 em verde). (A), Integridade nuclear. (B e C) Ausência de amplificação de sinal, na proporção 2:2 (x100).	53

Figura 12	Amplificação de HER-2 por SISH em amostras de carcinossarcomas. (A) seta azul - componente mesenquimal sem reatividade; seta verde - componente epitelial reativo para HER-2 (20X). (B) Núcleos positivos para amplificação gênica no componente epitelial. (C) seta vermelha - célula com alta amplificação. (D) Amostra de carcinossarcoma sem amplificação.	53
Figura 13	Curvas de Kaplan-Meier mostrando as taxas de sobrevida global e sobrevida livre de doença para as pacientes com carcinossarcoma.....	54
Figura 14	Curvas de Kaplan-Meier mostrando as taxas de sobrevida global e sobrevida livre de doença para as pacientes com leiomiossarcoma.....	55
Figura 15	Curvas de Kaplan-Meier mostrando as taxas de sobrevida global e sobrevida livre de doença para as pacientes com sarcoma do estroma endometrial.	55
Figura 16	Curvas de Kaplan-Meier mostrando as taxas de sobrevida global e livre de doença referentes à expressão da proteína FOXO3a nos carcinossarcomas.	56
Figura 17	Curvas de Kaplan-Meier mostrando as taxas de sobrevida global e livre de doença referentes à expressão da proteína FOXO3a nos leiomiossarcomas	57
Figura 18	Curvas de Kaplan-Meier mostrando as taxas de sobrevida global e livre de doença referentes à expressão da proteína FOXO3a nos sarcomas do estroma endometrial.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação dos tumores mesenquimais (WHO, 2014).....	4
Tabela 2	Estadiamento da FIGO para leiomiossarcoma e sarcoma do estroma endometrial	7
Tabela 3	Estadiamento da FIGO para adenossarcoma uterino.....	7
Tabela 4	Estadiamento da FIGO para carcinosarcoma uterino	8
Tabela 5	Estudos sobre expressão de HER-2 nos carcinosarcomas uterinos	28
Tabela 6	Relação de órgãos que expressam as proteínas FOXO.....	30
Tabela 7	Anticorpos e condições padronizadas para cada um dos anticorpos utilizados nas reações de imunoistoquímica	39
Tabela 8	Características clínicas, anatomopatológicas e tratamento cirúrgico das pacientes com sarcoma e carcinosarcoma uterinos	47
Tabela 9	Características do estadiamento, tratamento adjuvante e recorrência de acordo com tipo histológico para as pacientes com sarcoma e carcinosarcoma uterinos	47
Tabela 10	Relação entre as pacientes que realizaram quimioterapia e radioterapia conforme o tipo histológico	48
Tabela 11	Estado atual das pacientes com sarcoma e carcinosarcoma uterinos	48
Tabela 12	Frequências das expressões imunoistoquímicas do FOXO3a entre as pacientes estudadas e os diferentes tipos histológicos sarcoma e carcinosarcoma uterinos	50
Tabela 13	Dados de FISH para os diferentes tipos histológicos de sarcoma e carcinosarcoma uterinos	52
Tabela 14	Expressão de FOXO3a em tecidos tumorais em relação ao miométrio normal	58
Tabela 15	Expressão de FOXO3a entre os tipos histológicos de sarcoma e carcinosarcoma uterinos	58

Tabela 16	Associação entre a expressão proteica de FOXO3a e variáveis clinicopatológicas nas pacientes avaliadas com sarcoma e carcinosarcoma uterinos 59

RESUMO

Almeida TG. *Análise da expressão do fator de crescimento HER-2 e do fator de transcrição FOXO3a em sarcomas e carcinossarcomas uterinos* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

Sarcomas uterinos são tumores mesodérmicos raros que compreendem, aproximadamente, 3% de todos os cânceres uterinos. Até o momento não há consenso quanto os fatores de risco para determinar um pior prognóstico e tratamento mais adequado. A radioterapia adjuvante não tem impacto na sobrevida e o papel da quimioterapia ainda é limitado. Nesse contexto, a busca por marcadores moleculares mostra-se importante tanto para a individualização do tratamento, quanto para o diagnóstico e prognóstico desses tumores. O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão de HER-2 e do fator de transcrição FOXO3a nos sarcomas e carcinossarcomas uterinos. Para isso, foram avaliadas 100 amostras incluindo: 56 leiomiossarcomas (LMS), 24 carcinossarcomas (CS), 18 sarcomas do estroma endometrial (SEE) e 2 adenossarcomas (AS). A expressão das proteínas foi avaliada por imunoistoquímica e a presença de alterações no número de cópias do gene *HER-2* foi analisada por FISH e SISH. A amplificação de *HER-2*, resultando na hiperexpressão da proteína, foi observada no componente epitelial de uma única amostra de carcinossarcoma. Não foi observada deleção do gene. Os dados de SISH mostraram maior correlação com os de imunoistoquímica. A expressão de FOXO3a foi significativamente maior em todos os tumores avaliados em comparação ao miométrio, e mostrou associação significativamente com maior sobrevida livre de doença nos casos de LMS. Maior expressão dessa proteína também foi observada nos SEE de alto grau. Mulheres com mais de 50 anos, portadoras de LMS, apresentaram menor expressão de FOXO3a. Em conjunto, os resultados sugerem ser o FOXO3a potencial marcador para o risco de malignização e prognóstico para pacientes com LMS. Além disso, permitem indicar a utilização da técnica de SISH para melhor correlacionar a amplificação de HER-2 com os dados imunoistoquímicos.

Descritores: Leiomiossarcoma; Sarcoma do estroma endometrial; Receptor Erb-2; Carcinossarcoma; Hibridização *in situ* fluorescente; Imunoistoquímica.

ABSTRACT

Almeida TG. *Evaluation of the HER-2 growth factor receptor and FOXO3a transcriptional factor in uterine sarcomas and carcinosarcomas* [Dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2015.

Uterine sarcomas are rare mesodermal tumors that comprise approximately 3% of all uterine cancers. To date, there is no consensus related to risk factors for poor prognosis and appropriate treatment. Adjuvant radiotherapy has no impact on survival of the patients and chemotherapy has limited role. In this context, the search for molecular markers is important in a search for individualization of treatment, for the diagnosis and prognosis of these tumors. The objective of this study was to evaluate the expression of HER-2 and FOXO3a transcription factor in uterine sarcomas and carcinosarcomas. For this, we evaluated a total of 100 samples including: 56 leiomyosarcomas (LMS), 24 carcinosarcomas (CS), 18 endometrial stromal sarcoma (ESS) and 2 adenomas (AS). The protein expression were assessed by immunohistochemistry and copy number of the *HER-2* was performed by FISH and SISH. *HER-2* gene amplification, resulting in the protein overexpression was found in the epithelial component of an only one case of carcinosarcoma. SISH data showed higher relationship with protein expression than FISH. FOXO3a expression was significantly higher in all tumors than normal myometrium and it showed association with lower disease free survival, in LMSs patients. Protein overexpression was observed in the high grade SEE samples. LMS women's with > 50 years old showed lower FOXO3a protein expression. Our results suggest that FOXO3a is involved in leiomyosarcoma risk of malignancy and might become a potential prognostic marker to these patients. Moreover, they allow us to indicate the SISH analysis as a better correlation method with the immunohistochemical data for HER-2 amplification, in the future.

Descriptors: Leiomyosarcoma; Sarcoma endometrial stromal; Receptor, Erb-2; Carcinosarcoma; *in situ* hybridization fluorescence; Immunohistochemistry.

1 INTRODUÇÃO

---

1 INTRODUÇÃO

1.1 Sarcomas uterinos

Sarcomas são tumores malignos raros (1-2% de todos os cânceres) com origem em células-tronco mesenquimais que podem se desenvolver em tecidos moles e vísceras. O sarcoma ginecológico mais comum é o uterino, que é responsável por 90% dos casos de sarcoma dessa região (Gill *et al.*, 1999; Martinez *et al.*, 2011).

A apresentação clínica dos sarcomas uterinos é, muitas vezes, de uma massa uterina de crescimento rápido, dor pélvica ou abdominal por compressão ou invasão de estruturas adjacentes e sangramento genital (Seddon e Davda, 2011; Novetsky e Powell, 2013).

O diagnóstico deve ser preciso, pois o tratamento está associado, muitas vezes, a cirurgias de grande extensão. Cada tipo específico de sarcoma necessita de tratamento individualizado de acordo com seu comportamento clínico e sua histologia (Begnami *et al.*, 2003). Agressividade, altas taxas de recidiva local, metástase a distância e prognóstico desfavorável, com sobrevida global em dois anos inferior a 50%, são características comuns aos sarcomas uterinos, mesmo quando diagnosticados precocemente (George *et al.*, 1986; Disaia e Creasman, 1993; Livi *et al.*, 2003).

1.2 Embriologia e histogênese dos sarcomas ginecológicos

Todos os tecidos presentes nos vertebrados adultos são formados a partir de três tipos de folhetos germinativos: endoderma, ectoderma e mesoderma. Cada um desses, durante o desenvolvimento embrionário, é responsável por uma genealogia de células especializadas quanto à forma e

função. Durante a embriogênese, os canais de Muller fundem-se para formar o útero, englobando células do mesênquima celômico. As células de origem mülleriana têm potencial variável de diferenciação, capazes de originar tumores de linhagem epitelial (carcinomas), mesenquimal (sarcomas) ou mistos (mülleriano mistos) (www.sobiologia.com.br/conteudos/Histologia/epitelio.php).

Os tumores mesenquimais ou de partes moles se desenvolvem em tecido conectivo de origem mesodérmica e apresentam grande heterogeneidade histológica e citogenética (Gill *et al.*, 1999; Ferguson *et al.*, 2011). Os tumores malignos que se desenvolvem em tecidos moles são chamados sarcomas – do grego *crescimento carnosos* (Cotran *et al.*, 1999).

1.3 Classificação histológica

O estadiamento do sarcoma uterino e sua classificação histológica foram revisados e, de acordo com a World Health Organization (WHO, 2014), apresentam dois grupos principais: tumores mesenquimais e tumores mistos (Tabela 1). Os tumores mesenquimais malignos puros podem ser classificados em: sarcoma do estroma endometrial (SEE) e leiomiossarcoma (LMS) – incluindo suas variantes epitelióide e mixóide. Já os tumores denominados mistos, incluem o carcinosarcoma (CS) e o adenossarcoma (AS) (Tropé *et al.*, 2012).

Atualmente, o CS é considerado um subconjunto de carcinomas do endométrio, pois se comporta de forma mais agressiva que o carcinoma endometrial habitual (Tropé *et al.*, 2012). Porém, ainda é incluído na maioria dos estudos retrospectivos de sarcomas uterinos, bem como, na classificação da WHO de 2014 (D'Angelo e Prat, 2010; Greer *et al.*, 2011; WHO, 2014).

Evidências clínicas, patológicas e moleculares indicam que a maioria dos CS uterinos tem origem monoclonal e que, durante seu desenvolvimento, sofre diferenciação epitelial e mesenquimal

separadamente (Disaia e Creasman, 2007; Vorgias e Fotiou, 2010; Gadducci, 2011). No entanto, o componente epitelial do tumor é quem determina seu comportamento biológico (Seddon e Davda, 2011).

Os SEEs, anteriormente, eram divididos em SEE de baixo grau (SEE-BG) e em tumores indiferenciados (SUI). Já o sarcoma do estroma endometrial de alto grau (SEE-AG) constitui tipo novo, em que o tumor é composto por células atípicas, semelhantes às células do estroma endometrial, mas sem o pleomorfismo necessário para o diagnóstico de SUI. Trata-se de um subconjunto de SEE com características morfológicas distintas, com prognóstico intermediário entre SEE-BG e SUI (Conklin e Longacre, 2014).

Tabela 1 - Classificação dos tumores mesenquimais (WHO, 2014)

Tumores mesenquimais	Tumores mistos epiteliais e mesenquimais
✓ Leiomioma e suas variantes	✓ Adenomioma
✓ Tumor do músculo liso de potencial maligno incerto (STUMP)*	✓ Adenomioma polipoide atípico
✓ Leiomiossarcoma	✓ Adenofibroma
Leiomiossarcoma epitelióide	✓ Adenossarcoma
Leiomiossarcoma mixóide	✓ Carcinossarcoma
✓ Tumores do estroma endometrial e relacionados	
Nódulo do estroma endometrial	
Sarcoma do estroma endometrial de baixo grau	
Sarcoma do estroma endometrial de alto grau	
Sarcoma uterino indiferenciado	

*STUMP (*Smooth muscle tumor of uncertain malignant potential*)

1.4 Incidência e etiologia

A incidência mundial, anual, dos tumores malignos do corpo do útero é de 319.605 (4,8%) com mortalidade de 76.155 (2,1%), de acordo com

Organização Mundial de Saúde (Globocan, 2012). Nos Estados Unidos (EUA), foram estimados para 2014, 52.630 casos de câncer do corpo do útero (Siegel *et al.*, 2014).

Os sarcomas uterinos constituem forma rara de neoplasia maligna que compreende de 3 a 7% de todos os tumores uterinos malignos e menos de 1% de todas as neoplasias malignas ginecológicas (Novetsky e Powell, 2013). Esses tumores ocorrem em uma taxa de 1,7 para 100.000 mulheres nos EUA a cada ano (Ayham *et al.*, 2009; Novetsky e Powell, 2013). Estudos apresentam estimativa de incidência do sarcoma uterino variando entre 1,55 e 1,95 por 100.000 mulheres por ano (Nordal e Thoresen, 1997; Toro *et al.*, 2006; Abeler *et al.*, 2009).

Inicialmente, os sarcomas uterinos foram classificados com base nos aspectos histológicos em CS (40% dos casos), LMS (40%), SEE (de 10% a 15%), e sarcoma indiferenciado (de 5% a 10%). Após a reclassificação dos CS, os LMS passaram a ser o subtipo mais comum de sarcoma uterino, com, aproximadamente, 67% dos casos (D'Angelo e Prat, 2010; Novetsky e Powell, 2013).

Pouco se sabe sobre a etiologia dos sarcomas uterinos. Porém, o histórico de radiação pélvica prévia é apontado como um fator de risco para o seu desenvolvimento. Obesidade, hipertensão, diabetes e exposição ao estrogênio são outros fatores associados, principalmente, ao carcinoma do endométrio, mas também são observados em mulheres com CS e SEE (Zelmanowicz *et al.*, 1998; Disaia e Creasman, 2007; D'Angelo e Prat, 2010; Tropé *et al.*, 2012). Aparentemente, o uso de contraceptivos orais aumenta o risco de desenvolver LMS (Thomas, 1991; Wysowski *et al.*; Wickerham *et al.*, 2002; Tropé *et al.*, 2012).

Embora o papel dos hormônios femininos na etiologia do SEE permaneça especulativo, associação com a exposição ao tamoxifeno, uso de estrogênio e outras condições, tais como ovários policísticos, também foram observadas (D'Angelo e Prat, 2010; Hiroshi *et al.*, 2013).

Outro aspecto importante a ser considerado são as características moleculares desses tumores. Os SEEs apresentam mutações somáticas

específicas. Já nos LMS foram observadas mutações e hiperexpressão de genes envolvidos no controle do ciclo celular. Os fatores genéticos parecem desempenhar papel importante, já que a incidência dos sarcomas, em geral, é duas vezes maior entre as mulheres negras, em relação às mulheres brancas (Toro *et al.*, 2006).

Alguns pesquisadores defendem a teoria de que os LMS possam surgir a partir da degeneração sarcomatosa entre 0,1 e 0,8% dos leiomiomas (Perri *et al.*, 2009; Novetsky e Powell, 2013). Porém, não há evidências de que tal transformação ocorra.

1.5 Estadiamento

De acordo com a Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO) de 1988, os critérios de estadiamento aplicados ao sarcoma uterino era uma versão modificada daqueles utilizados para o câncer endometrial. Em 2009, um novo sistema de estadiamento foi introduzido, a fim de refletir as diferenças no comportamento biológico (Prat, 2009; Tropé *et al.*, 2012). Três novas classificações foram estabelecidas para o estadiamento dos sarcomas uterinos e carcinossarcomas: (1) estadiamento para leiomiossarcoma e sarcoma do estroma endometrial; (2) adenossarcomas; e (3) carcinossarcomas. Ressaltando que o estágio I é subdividido, atualmente, de acordo com o tamanho do tumor na classificação para LMS e SEE, e a subdivisão do estágio I para adenossarcoma leva em conta a invasão do miométrio. O envolvimento anexial passou a ser incluído no estágio II (D'Angelo e Prat, 2010; Yim *et al.*, 2014). Muitos trabalhos sugerem que o estágio da FIGO é o fator prognóstico mais importante e deve ditar o tratamento (Yim *et al.*, 2014).

O novo sistema de estadiamento para os sarcomas uterinos, proposto pela FIGO e publicado em 2009, está apresentado nas Tabelas 2 e 3. Os carcinossarcomas são estadiados da mesma forma que os carcinomas de endométrio, conforme apresentado na Tabela 4 (Prat, 2009).

Tabela 2 - Estadiamento da FIGO para leiomiossarcoma e sarcoma do estroma endometrial

Estádio	Definição
Estádio I	Tumor limitado ao útero
IA	≤5cm
IB	>5cm
Estádio II	Tumor que se estende para a pelve
IIA	Envolvimento anexial
IIB	Envolvimento de outros tecidos pélvicos
Estádio III	Tumor invade tecidos do abdome
IIIA	Um local
IIIB	>Um local
IIIC	Metástases para linfonodos pélvicos e/ou para aórtico
Estádio IV	
IVA	Tumor invade bexiga e/ou reto
IVB	Metástases à distância

FONTE: Prat J. FIGO staging for uterine sarcomas. *Inter J Gynaecol/Obstet.* 2009;104(3):177-8.

Tabela 3 - Estadiamento da FIGO para adenossarcoma uterino

Estádio	Definição
Estádio I	Tumor limitado ao útero
IA	Tumor limitado ao endométrio/endocérvice sem invasão miometrial
IB	Invasão em menos da metade do miométrio
IC	Invasão em mais da metade do miométrio
Estádio II	Tumor que se estende para a pelve
IIA	Envolvimento anexial
IIB	Envolvimento de outros tecidos pélvicos
Estádio III	Tumor invade tecidos do abdome
IIIA	Um local
IIIB	>Um local
IIIC	Metástases para linfonodos pélvicos e/ou para aórtico
Estádio IV	
IVA	Tumor invade bexiga e/ou reto
IVB	Metástases à distância

FONTE: Prat J. FIGO staging for uterine sarcomas. *Inter J Gynaecol Obstet* 2009;104(3):177-178.

Tabela 4 - Estadiamento da FIGO para carcinossarcoma uterino

Estádio:	Achados patológicos pós-operatórios
I*	Tumor confinado ao corpo uterino
IA*	Tumor limitado ao endométrio ou invasão miometrial menor de 50%
IB*	Invasão miometrial igual ou maior de 50%
II*	Tumor invade o estroma do colo do útero, mas sem estender além do útero
III*	Tumor local e/ou regionalmente avançado
IIIA*	Tumor invade serosa e/ou anexos
IIIB*	Tumor invade vagina ou paramétrios
IIIC*	Metástases para linfonodos pélvicos e/ou para-aórticos
IIIC 1*	Linfonodos pélvicos positivos
IIIC 2*	Linfonodos para-aórticos positivos com ou sem Linfonodos pélvicos positivos
IV*	Tumor invade bexiga e/ou mucosa retal e/ou metástase a distância
IVA*	Tumor invade bexiga e/ou mucosa retal
IVB*	Metástase a distância incluindo metástase intra-abdominal e/ou para linfonodos inguinais

FONTE: Amant *et al.* FIGO Cancer Report 2012. *Int J Gynecol Obstetr.* 2012;119S2(2012):S110-7.

*G1, G2 e G3

1.6 Prognóstico e sobrevida

O prognóstico das pacientes com sarcoma uterino não mudou nas últimas duas décadas, e a sobrevida global em 5 anos varia entre 17,5% e 54,7%, em vários estudos. Numa série de 100 casos, recentemente publicada, as taxas de sobrevida global em 2, 5 e 10 anos foi de 62%, 51%, e 38%, respectivamente (Prat, 2009).

Segundo trabalho publicado por Tropé *et al.* (2012), a média de idade das pacientes acometidas foi de, aproximadamente, 51 anos para SEE; 57 anos para LMS; 59 anos para SUI e 66 anos para adenossarcoma. A

sobrevida em cinco anos para pacientes com um tumor localizado no útero foi: 84% para os SEE, 51% para LMS, 76% nos adenosarcomas, 57% nos SUI, e de 43% para os outros tipos de sarcomas (Tropé *et al.*, 2012). A baixa taxa de cura, mesmo em doença localizada, frequentemente, é devido a metástases a distância, em geral, para os pulmões.

Outros fatores determinantes do prognóstico em pacientes com sarcoma uterino são: tipo histológico, grau histológico e estágio da doença (O'Neill *et al.*, 2007).

Pacientes no estágio I (SUI) apresentam sobrevida em 5 anos de 57% e todas as pacientes em estádios maiores foram a óbito (Abeler *et al.*, 2009; Tropé *et al.*, 2012). A média de sobrevida para todos os pacientes com SUI foi de apenas 12 meses (Novetsky e Powell, 2013).

1.7 Diagnóstico

A propedêutica inicial para as pacientes com suspeita de neoplasia uterina requer análise de sua história, um exame físico completo, biópsia do endométrio e revisão anatomopatológica, a fim de caracterizar a extensão da invasão no miométrio, além de exames de imagem. Porém, a biópsia do endométrio não é útil no diagnóstico de malignidade dos tumores mesenquimais (Dizon e Birrer, 2014; NCCN, 2015). Nordal (1998) e Abeler e colaboradores (2009) observaram que a curetagem pré-operatória foi útil para o diagnóstico em 70% de pacientes com SEE, porém, nos LMS, esse número caiu para 30%.

É sempre importante determinar se o sarcoma está confinado ao útero ou se a paciente apresenta doença extrauterina, já que a via de disseminação hematogênica é frequente nestes tumores. O diagnóstico de SEE e LMS é, frequentemente, feito após histerectomia e o diagnóstico molecular tem ajudado na classificação das neoplasias do estroma endometrial (Dizon e Birrer, 2014; NCCN, 2015).

Com relação aos exames de imagem, nenhum deles é capaz de fornecer diagnóstico confiável (Amant *et al.*, 2009). O ultrassom transvaginal é a técnica de imagem padrão, mas a ressonância nuclear magnética (RNM) da pelve otimiza a avaliação da imagem de invasão de estruturas adjacentes. Já a avaliação da disseminação do tumor para estruturas extrapélvicas deve ser realizada por tomografia computadorizada de tórax e abdome, sendo a tomografia de tórax altamente sensível para detecção de metástases pulmonares (Seddon e Davda, 2011). Uma modalidade de imagem adicional é o PET-CT (tomografia por emissão de pósitrons) que, juntamente com a RNM são modalidades precisas, sensíveis e específicas para a detecção de recorrência (Hiroshi *et al.*, 2013).

Clinicamente, o desafio consiste em fazer o diagnóstico pré-operatório do sarcoma uterino para que o estadiamento cirúrgico seja realizado (Seddon e Davda, 2011). De modo geral, todos os sarcomas uterinos têm propensão para disseminação hematogênica, na maioria das vezes, para os pulmões. Outros locais incluem o fígado, os ossos e o cérebro. O marcador tumoral CA-125 é encontrado em níveis elevados em pacientes com sarcoma uterino, especialmente naquelas com LMS disseminado extrauterino (Tropé *et al.*, 2012).

1.8 Tratamento padrão dos sarcomas uterinos

Com o intuito de facilitar a leitura, será feita uma descrição do tratamento geral para sarcomas uterinos. Em seguida, serão descritos seus subtipos histológicos e suas peculiaridades relacionadas ao quadro clínico, tratamento específico e biologia do tumor.

O procedimento padrão para o tratamento dos sarcomas uterinos é a histerectomia total (HT). Em mulheres na pós-menopausa, também é recomendada a salpingooforectomia bilateral (SOB) (Nam, 2011). É imperativo que a cirurgia seja realizada visando a ressecção total do tumor (Perri *et al.*, 2009). A remoção laparoscópica de sarcoma, conhecido por

morcelamento, não é permitida pelo risco de disseminação de células tumorais na cavidade abdômino-pélvica (Tropé *et al.*, 2012).

Em caso de diagnóstico de sarcoma, após biópsia ou miomectomia, considerar HT com ou sem SOB se a doença estiver limitada ao útero. No caso de doença extrauterina, considerar também a ressecção dos focos de metástases (NCCN, 2015). Contudo, o papel da citorredução, linfadenectomia, conservação dos ovários em pacientes jovens, preservação da fertilidade e tratamento adjuvante é controverso e variam com a histologia, estadiamento e idade da paciente (Hensley, 2000; Kapp *et al.*, 2008).

Com relação ao tratamento adjuvante, a radioterapia apenas diminui a recidiva local, mas não aumenta a sobrevida. O papel da radioterapia na doença localizada é controverso e nenhum estudo mostrou benefício associado à radioterapia pós-operatória na sobrevida para pacientes com sarcoma uterino (Tropé *et al.*, 2012).

No estadiamento avançado dos sarcomas uterinos, há interesse no tratamento adjuvante com agentes sistêmicos. No entanto, a raridade destes tumores faz com que a condução de estudos prospectivos seja difícil e nenhum consenso quanto ao regime adjuvante existe até o momento. Na ausência de dados de nível I, a utilização de quimioterapia é com base nas preferências institucionais (Dizon e Birrer, 2014).

Para pacientes com sarcoma uterino inoperável, as seguintes opções existem: 1) radioterapia pélvica com ou sem braquiterapia e quimioterapia; 2) quimioterapia; e 3) terapia hormonal (apenas para SEE) (Tropé *et al.*, 2012).

1.9 Subtipos histológicos

1.9.1 Leimiossarcoma (LMS)

O LMS se desenvolve na camada muscular do útero – no miométrio. Tem como principal via de disseminação a hematogênica, ocorrendo,

principalmente, para pulmões e fígado (Cotran *et al.*, 1999; Novetsky e Powell, 2013). De acordo com Davidson *et al.* (2013), cerca de 10% das pacientes com LMS terão metástase pulmonar como apresentação inicial da doença.

Atualmente, acredita-se que a grande maioria surja como LMS, embora alguns pesquisadores acreditem na transformação a partir de um leiomioma pré-existente (Cotran *et al.*, 1999; Ayham *et al.*, 2009). Das pacientes submetidas a histerectomia com diagnóstico pré-operatório de mioma, 0,5% são posteriormente diagnosticadas como LMS (Seddon e Davda, 2011; Novetsky e Powell, 2013). A frequência de LMS em pacientes com mioma clínico é menor que 1%, mas aumenta em mais de 1% na sexta década de vida (Chu e Rubin, 2008). Por outro lado, os LMS têm vias moleculares distintas dos leiomiomas ou do miométrio normal (Quade *et al.*, 2004).

De acordo com a classificação da WHO de 2003, tumores uterinos que exibem diferenciação do músculo liso são diagnosticados como LMS baseados na presença de, pelo menos, duas das três seguintes características: moderada a severa atipia nuclear; índice mitótico (IM) $>$ ou $=$ 10 figuras de mitose por 10 campos de grande aumento (CGA); e/ou necrose de células de tumor (NC) (Tavassoli *et al.*, 2003). A sobrevida em cinco anos foi de 51% para as pacientes com LMS no estágio I e 25% para aquelas com estágio II (Hiroshi *et al.*, 2013). Já a taxa de recorrência para LMS de alto grau varia entre 50-70% (NCCN, 2015).

1.9.1.1 Quadro clínico

Os LMSs representam apenas 1-2% das neoplasias malignas do útero. Geralmente, as pacientes apresentam sangramento vaginal anormal (56%), massa pélvica palpável (54%), e dor pélvica (22%) (D'Angelo e Prat, 2010). São tumores de crescimento carnososo com áreas de hemorragia e necrose (Chu e Rubin, 2008). Uma característica dos LMSs é o crescimento uterino

em mulheres na menopausa que não estão em terapia de reposição hormonal (D'Angelo e Prat, 2010).

A maioria desses tumores (68%) é classificada no estágio I no momento do diagnóstico, e os demais nos seguintes estágios II (3%), III (7%), IV (22%) (Kapp *et al.*, 2008).

1.9.1.2 Particularidades do tratamento

Para os LMSs, a citorredução cirúrgica está associada com sobrevida livre de progressão, embora não esteja associada à sobrevida global. Na ausência de linfonodos aumentados ou outra doença metastática, o comprometimento dos linfonodos é raro e ocorre entre 3 a 9% dos casos (Vorgias e Fotiou, 2010; Novetsky e Powell, 2013). No LMS, a retirada dos anexos não parece influenciar na sobrevida, e a preservação do tecido ovariano na pré-menopausa não aumenta o risco de recorrência (Hensley, 2000; Bodner *et al.*, 2001; Kapp *et al.*, 2008).

Devido às incertezas em relação ao tratamento adjuvante para tumores de estágio I, as opções de conduta são: observação e quimioterapia. Nos casos de ressecção incompleta ou doença metastática, deve-se considerar a quimioterapia com ou sem radioterapia paliativa. Já os inibidores da aromatase podem ser considerados para o tratamento de LMS que expressem RE e RP (NCCN, 2015).

1.9.1.3 Biologia do tumor

O LMS é uma neoplasia maligna, geralmente, de alto grau, que pode se assemelhar ao SUI e SEE-AG. Um painel de marcadores imuno-histoquímicos interpretados em conjunto com a morfologia do tumor pode ser útil para o diagnóstico (WHO, 2014). Outros aspectos que podem ajudar no momento do diagnóstico são as alterações moleculares e, nesse sentido,

a perda do cromossomo 10 foi observada em amostras de leiomiossarcoma. A maioria dos LMS expressa o receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas-alfa (PDGFR-ALFA), o gene do tumor de Wilms (WT1), aromatase e receptor do hormônio liberador de gonadotrofinas (GNRH-R) (Amant *et al.*, 2009).

A forte expressão de p53, p16, Ki-67, TWIST1, FSCN1, ESR1 (receptor de estrogênio 1), PGR (receptor de progesterona), bem como uma baixa expressão de BCL-2 podem estar associadas com o pior prognóstico. A perda da função do BRCA1 e MED12, genes supressores de tumor, assim como, a perda da expressão de LMP2 (um interferon) já foram associadas ao desenvolvimento do leiomiossarcoma (Hiroshi *et al.*, 2013). Adicionalmente, nesses tumores, é frequente a perda de expressão dos receptores do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e do receptor do fator de crescimento epidérmico 2 (ERBB2) (Amant *et al.*, 2009).

1.9.2 Sarcoma do estroma endometrial (SEE)

Trata-se de tumor que ocorre, predominantemente, no útero, composto por células que se assemelham ao estroma endometrial na fase proliferativa e, caracteristicamente, exibe infiltração miometrial e permeação linfovascular. Compreende menos que 10% dos sarcomas do útero e menos que 1% de todos os tumores malignos primários do útero (Lee e Nucci, 2015 ; WHO, 2014).

A atual compreensão genética e molecular dos tumores do estroma endometrial defende uma nova classificação, baseada em translocações específicas que se correlacionam com a clínica e as características morfológicas. São elas: nódulo do estroma endometrial (NEE), sarcoma do estroma endometrial de baixo grau (SEE-BG), sarcoma do estroma endometrial de alto grau (SEE-AG), e sarcoma uterino indiferenciado (SUI) (WHO, 2014).

O NEE é um tumor benigno e tratado por excisão completa (WHO, 2014). Já o SEE-BG é um tumor de baixo grau, hormônio-sensível, com crescimento indolente e composto por células semelhantes às do estroma endometrial na fase proliferativa (Amant *et al.*, 2009; Prat, 2009; Seddon e Davda, 2011; Tropé *et al.*, 2012). São tumores que envolvem o endométrio, invadem o miométrio e mostram padrão de crescimento infiltrativo, e, muitas vezes, com invasão linfovascular. O fator prognóstico mais importante é o estágio da doença, com sobrevida em 5 anos superior a 90% para estágio I e II da FIGO. As recorrências são comuns (WHO, 2014).

Por outro lado, os SEEs-AG foram redefinidos como um subconjunto do SEE devido à recente descoberta de um rearranjo único de gene YWHAE-FAM22. Esses tumores apresentam características morfológicas distintas, e um prognóstico intermediário entre o SEE-BG e o SUI. Necrose em células tumorais e a invasão do espaço linfovascular ocorre, mais frequentemente, nesse grupo que no SEE-BG (Conklin e Longacre, 2014).

De acordo com a WHO (2014), os SUIs são sarcomas de alto grau, que, normalmente, se originam do endométrio e, às vezes, coexistem com o SEE-BG. Apresentam pior taxa de sobrevida quando comparados ao SEE-BG e SEE-AG, e constituem cerca de 25% dos sarcomas endometriais. Uma proporção significativa de mulheres com doença em estágio I morrem dentro de 2 anos após o diagnóstico.

Contudo, o diagnóstico de SUI é aplicado para os tumores que apresentam invasão miometrial, severo pleomorfismo nuclear, alta atividade mitótica, necrose das células do tumor e falta do músculo liso ou diferenciação do estroma endometrial (Cotran *et al.*, 1999; Gadducci, 2011). No exame microscópico, há invasão miometrial destrutiva (Tropé *et al.*, 2012). A aparência histológica desse tumor é mais próxima dos elementos mesenquimais de CS do que aqueles observados nos tumores de estroma endometrial convencional (Prat, 2009).

1.9.2.1 Quadro clínico

A maior incidência ocorre em mulheres na pré-menopausa. A apresentação clínica do SEE-BG e SEE-AG é, principalmente, sangramento uterino anormal em 90% das mulheres e aumento do volume uterino em 70% dos casos. Dor abdominal ou pélvica também pode ocorrer. Cerca de 10% das pacientes são assintomáticas, com diagnóstico realizado após histerectomia por outro motivo (El-Khalfaoui *et al.*; WHO, 2014). Extensão pélvica extrauterina, mais comumente, envolvendo o ovário, é encontrada em até 1/3 das pacientes (D'Angelo e Prat, 2010).

O SUI é um tumor agressivo, que, geralmente, se apresenta em mulheres na pós-menopausa e, a maioria das pacientes (>60%) encontra-se em estágio avançado da doença no momento do diagnóstico, com disseminação extrauterina para o abdome superior, linfonodos pélvicos, ou pulmões (WHO, 2014).

1.9.2.2 Particularidades do tratamento

O tratamento padrão para SEE-BG e SEE-AG é a histerectomia total com salpingooforectomia bilateral de rotina, pois altas taxas de recorrência foram descritas em mulheres com SEE que preservaram os ovários (50%) quando comparadas com aquelas que não preservaram o órgão (4%) (Hensley, 2000; Bodner *et al.*, 2001; Kapp *et al.* 2008). O *debulking* é reservado somente para os estádios avançados. Para as pacientes no estágio I ou II de SEE-BG, o seguimento cuidadoso é mandatório, pois a radioterapia é ineficaz nestes casos e o papel da quimioterapia é indefinido. O tratamento sistêmico de primeira escolha é sempre a terapia endócrina, quando os receptores hormonais são positivos (El-Khalfaoui *et al.*; WHO, 2014).

Uma importante característica desses tumores é sua elevada expressão de receptores de estrógeno e progesterona. Deste modo, o

tratamento hormonal também é recomendado para SEE recorrente ou irresssecável (Disaia e Creasman, 2007; NCCN, 2015). Nas pacientes que recidivam depois ou durante tratamento endócrino, a quimioterapia é o tratamento de primeira escolha (El-Khalfaoui *et al.*, 2014).

Com relação aos linfonodos, a incidência de positividade na ausência de aumento dos nódulos ou doença grosseira extrauterina são raros, alcançando de 0 a 10%, e, portanto, a linfadenectomia sistemática não demonstra benefício terapêutico (Novetsky e Powell, 2013). Já as recorrências podem ocorrer muitos anos após o diagnóstico primário, comumente para os pulmões (Davidson *et al.*, 2013).

O tratamento do SUI é, essencialmente cirúrgico, com ou sem adição de radioterapia ou quimioterapia adjuvante (D'Angelo e Prat, 2010). Pacientes com doença em estágio inicial que recebem radioterapia adjuvante apresentam menor recorrência pélvica e ligeira melhora na sobrevida. Um efetivo regime de quimioterapia não está estabelecido, e estes tumores não respondem à terapia hormonal (WHO, 2014). Nos casos de ressecção incompleta ou doença metastática, sugere-se quimioterapia com ou sem radioterapia paliativa (NCCN, 2015).

1.9.2.3 *Biologia do tumor*

Os tumores estromais endometriais são um grupo geneticamente heterogêneo de tumores que abrigam translocações cromossômicas recorrentes, produzindo rearranjos de genes específicos. A imunoistoquímica pode auxiliar significativamente na distinção dos tumores do estroma do endométrio com o painel de marcadores comumente utilizado: CD10, desmina, receptor de estrogênio (RE) e receptor de progesterona (RP) (WHO, 2014).

O estudo da biologia do SEE forneceu uma melhor visão sobre esta doença. Atualmente, sabe-se que a translocação t (7; 17) (p15; q21), produzindo o gene de fusão JAZF1- SUZ12 (anteriormente JAZF1-JJAZ1), é

a anomalia genética mais comum nesses tumores, ocorrendo em 65% dos nódulos (NEE) e em 48% dos SEE-BG. Adicionalmente, essa translocação parece ser específica para os sarcomas uterinos puros e não está presente em outras neoplasias mesenquimais. A translocação t (10; 17) (q22; p13) que envolve a fusão de YWHAE e FAM22 ocorre no SEE-AG (WHO, 2014; Lee e Nucci, 2015).

A expressão do RE e RP é difusa e com forte padrão nuclear no SEE-BG, mas ausente ou apenas focal e fraca no SUI. O mesmo ocorre com CD10. Tumores do estroma endometrial também podem expressar b-catenina, receptor de andrógeno, aromatase, PDGF-alfa, PDGF-beta, fator de crescimento endotelial vascular, receptor do fator crescimento epidérmico 2, e CD117, em graus variáveis, e WT1 (Amant *et al.*, 2009; WHO, 2014).

Os caso de SEE-AG, tal como definido pela translocação YWHAE-FAM22, pode-se encontrar positividade nuclear forte e difusa (> 70%) para ciclina D1 (BCL-1). CD10, ER e PR apresentam fraca ou ausência de reatividade. A expressão da ciclina D1 está ausente no SEE-BG clássico com rearranjos JAZF1, SUZ12, ou PDF1 e em <1% dos casos do LMS (WHO, 2014). A positividade do CD10 no SUI é variável, enquanto RE e RP podem apresentar fracamente positivos ou negativos. A ciclina D1 pode ser difusamente presente, mas, muitas vezes, coexiste com CD10, ao contrário do observado para os SEE-AG (WHO, 2014; Lee e Nucci, 2015).

1.9.3 Adenossarcomas (AS)

Os adenossarcomas são constituídos por componente epitelial benigno e componente mesenquimal sarcomatoso homólogo ou heterólogo, sendo mais comum em mulheres na pós-menopausa. Podem acometer, também, adolescentes e adultos jovens, compreendendo de 5,5-9,0% de todos os sarcomas uterinos (D'Angelo e Prat, 2010; Tropé *et al.*, 2012).

Geralmente, esses tumores se limitam ao endométrio e a invasão do miométrio é uma exceção. São neoplasias raras com baixo potencial

maligno, e a maioria dos casos é de baixo grau histológico ao diagnóstico (Cotran *et al.*, 1999; Novetsky e Powell, 2013). Por outro lado, podem apresentar supercrescimento sarcomatoso, definido como a presença de sarcoma puro, geralmente de alto grau e sem componente glandular, ocupando, pelo menos, 25% do tumor (D'Angelo e Prat, 2010). Neste caso, o prognóstico é semelhante ao das mulheres com CSs, com mortalidade superior a 50% (Kaku *et al.*, 1992; Krivak *et al.*, 2001; Tropé *et al.*, 2012).

1.9.3.1 Quadro clínico

O sintoma mais comum é o sangramento vaginal anormal, mas algumas pacientes apresentam dor pélvica, uma massa abdominal ou corrimento vaginal. Os adenossarcomas raramente exibem localização extrauterina, mas, quando ocorre disseminação, tende a envolver os ovários, tecidos pélvicos ou serosa intestinal (D'Angelo e Prat, 2010; Sutton, 2013). Esses tumores normalmente apresentam-se como massas polipoides grandes bem demarcadas, ocupando, assim, a cavidade endometrial, e, às vezes, salientes na cavidade vaginal (D'Angelo e Prat, 2010).

1.9.3.2 Particularidades do tratamento

O tratamento primário é a ressecção cirúrgica. Na ausência de doença extrauterina ou supercrescimento sarcomatoso, a observação é realizada, já que há poucos dados para apoiar o uso do tratamento de radioterapia (RT) ou quimioterapia (QT) nos adenossarcomas ressecados. Apresentam expressão dos receptores de estrogênio e progesterona, e, recentemente, o uso de agentes progestacionais foram reportados em relatos de caso (Novetsky e Powell, 2013).

1.9.3.3 *Biologia do tumor*

A análise imunoistoquímica do adenossarcoma sem supercrescimento sarcomatoso mostra a expressão de CD10, RE, RP, Receptor de androgênio, citoqueratina e marcadores musculares. Já o adenossarcoma com supercrescimento sarcomatoso apresenta positividade para WT1, Ki-67 e p53, sendo CD10, RE e RP negativos (Hiroshi *et al.*, 2013).

1.9.4 Carcinossarcoma (CS)

Os carcinossarcomas anteriormente denominados Tumores Müllerianos Mistos Malignos (TMMM) representam 2% dos tumores malignos do útero e são abordados como tumores epiteliais, em virtude de seu comportamento distinto quanto à resposta terapêutica e a aspectos moleculares (Cotran *et al.*, 1999; D'Angelo e Prat, 2010; Novetsky e Powell, 2013). As pacientes acometidas podem apresentar aumento na expressão do CA-125 (Novetsky e Powell, 2013). É caracterizado pela combinação de elemento carcinomatoso (epitelial) e sarcomatoso (mesenquimal) derivado de uma única célula epitelial precursora ou célula-tronco (Hiroshi *et al.*, 2013). O componente carcinomatoso desempenha um papel importante no comportamento biológico agressivo e na determinação do prognóstico (D'Angelo e Prat, 2010; Hiroshi *et al.*, 2013).

1.9.4.1 *Quadro clínico*

A apresentação clínica é semelhante ao adenocarcinoma endometrial, embora o sangramento possa estar associado a uma massa protuberante. Geralmente, são diagnosticados em estágio avançado e os sintomas podem incluir ascite e carcinomatose peritoneal (Sutton, 2013). Em alguns casos, grandes massas polipoides volumosas preenchem a cavidade uterina e

podem prolapsar através do orifício cervical (Ferguson *et al.*, 2007; D'Angelo e Prat, 2010). Trata-se de tumores muito agressivos e, frequentemente, apresentam disseminação para linfonodos, e metástase a distância para fígado e pulmões (Cotran *et al.*, 1999; D'Angelo e Prat, 2010; Novetsky e Powell, 2013).

1.9.4.2 Particularidades do tratamento

Para os CSs, o tratamento adequado inclui, além da histerectomia total com salpingooforectomia bilateral, a remoção dos linfonodos pélvicos, e retroperitoneais, omentectomia e citologia peritoneal. O papel da radioterapia e quimioterapia adjuvante é incerto, e alguns estudos demonstraram a vantagem da radioterapia para sobrevida em tumores no estágio inicial, bem como o controle local em tumores em estágio avançado (D'Angelo e Prat, 2010).

O comportamento desses tumores é similar aos adenocarcinomas endométrioes de alto grau, sendo seu estadiamento cirúrgico semelhante. O comprometimento ganglionar ocorre entre 14% a 38% e parecem responder melhor à quimioterapia do que os sarcomas puros (Gadducci, 2009; Vorgias e Fotiou, 2010).

1.9.4.3 Biologia do tumor

A amplificação cromossômica para CSs está estreitamente relacionada com os cromossomos 8q e 20q (42 e 70%). Os dois cromossomos contêm os oncogenes *c-Myc* (8q24.12) e *ZNF217* (20q13.2). De acordo com Hiroshi *et al.* (2013), a superexpressão de genes específicos que foram detectados em diversos CSs, inclui o fator de crescimento transformante (TGF)- β , retinoblastoma (Rb), p53, HER-2, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), RE, RP, antígenos associada ao câncer de testículo (CATs), β -

catenina, B-CLL/linfoma de células B (BCL-2), da ciclooxigenase (COX) -2, p16, homólogo de angiotensina (PTEN) e vimentina.

Mutações somáticas também foram descritas com baixa frequência em genes da família do fator de crescimento de tirosina-quinase e os seus alvos. Mutações nestes genes foram identificadas como biomarcadores no tratamento de carcinomas com inibidores de moléculas pequenas ou anticorpos monoclonais contra o receptor do fator de crescimento específico (Hiroshi *et al.*, 2013).

1.10 Aspectos moleculares dos sarcomas uterinos

Os sarcomas despertam, também, grande interesse devido às suas múltiplas características morfológicas e clínicas. Embora sejam tumores raros, como já foi descrito anteriormente, apresentam altas taxas de mortalidade e morbidade. Outro aspecto que deve ser ressaltado é o benefício limitado da quimioterapia, reforçando a importância e a necessidade de desenvolvimento de terapias-alvo (Lancet, 2009). Os poucos agentes quimioterápicos eficazes, e sua toxicidade, fizeram com que a identificação de novos agentes-alvos efetivos para sarcomas uterinos fosse uma prioridade (Seddon e Davda, 2011). A individualização do tratamento é mandatória, já que os ensaios randomizados são quase inexistentes. O conhecimento da biologia do tumor constitui a base para delinear formas de tratamento específicas/alvo, que estão, atualmente, sob investigação (Lancet, 2009).

Sabemos que os cânceres são causados por mutações em um número limitado de genes críticos, e que agem em vias bioquímicas e reguladoras diferentes. Nesse contexto, o ciclo celular é controlado por proteínas altamente específicas denominadas fatores de crescimento, que regulam a proliferação celular por meio de uma rede complexa de cascatas bioquímicas que, por sua vez, regulam a transcrição gênica (Renard e Chies, 2010).

Foi realizada uma vasta pesquisa na literatura sobre marcadores moleculares para fins de diagnóstico, prognóstico ou tratamento desses tumores. Dentre todas as descrições na literatura relacionadas à biologia molecular do sarcoma/carcinossarcoma uterino, despertou-nos o interesse em estudar o fator de crescimento HER-2. Isso, devido à terapêutica já existente e eficaz para os casos de câncer de mama positivos para este marcador. Outro marcador interessante, e ainda não avaliado nesses tumores, foi o fator de transcrição FOXO3a, cuja regulação da expressão já foi associada ao desenvolvimento de câncer.

Algumas características de HER-2 e FOXO3, bem como sua importância biológica serão abordados nos itens a seguir.

1.10.1 Receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2 – HER-2

O receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2 (HER-2), também denominado ErbB2, c-erbB2 ou HER-2/neu, é um dos membros da família dos receptores tirosina quinase, localizado na banda 21 do cromossomo 17, com 185 kDa (Slamon *et al.*, 1987; Amant *et al.*, 2004; Guzzo *et al.*, 2012;). Pertence à família HER/ErbB de receptores, que inclui quatro membros: EGFR/HER-1, HER-2, HER-3 e HER-4 (também nomeados erbB1, erbB2, erbB3, erbB4, respectivamente) (Hynes e Lane, 2005; Moasser, 2007; DeVita *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2015).

A família de proteínas erbB tem seu nome originário da homologia com produto gênico do vírus da eritroblastose aviária (v-erbB) e com o receptor do fator de crescimento epidérmico EGFR (Citri e Yarden, 2006; Moasser, 2007). Essas proteínas ativam suas vias de sinalização em resposta a sinais extracelulares e, em condições normais, regulam o crescimento, a proliferação e a sobrevivência celular (Rossi e Pinho, 1999).

Como receptores, apresentam um domínio extracelular N-terminal com quatro subunidades (I-IV), um domínio transmembrana, um domínio intracelular tirosina quinase e uma cauda carboxi-terminal (que contém, pelo

menos, seis sítios de autofosforilação de tirosina, Figura 1) (Guzzo *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2015). O receptor HER-2/erbB2 exerce sua função somente quando associado a outros membros da família (EGFR, erbB3 e erbB4). Possui conformação do domínio extracelular fechada e fixa, portanto, nenhum dos peptídeos da família EGF liga-se ao erbB2 (Roskoski, 2004; Hynes e Lane, 2005; Wang *et al.*, 2015).

Figura 1 - Estrutura dos receptores do fator de crescimento epidérmico (FONTE: Celestino J., jul./set.2012).

Uma característica conferida ao HER-2 é a capacidade de formar dímeros (homodímeros ou heterodímeros). Apresenta-se constitutivamente na forma ativada e sua função de sinalização é dependente de um ligante (fatores de crescimento – Fc). Exemplificando, HER-2 é capaz de formar heterodímeros com HER-1 constituindo a quinase ativa HER-1:2, assim, fosforilando HER-1, mesmo na ausência de seus ligantes extracelulares. Os heterodímeros que contém HER-2 são considerados mais potentes, e aqueles que apresentam maior afinidade e especificidade (Hynes e Lane, 2005; Moasser, 2007; Freitas, 2008; Wang *et al.*, 2015).

Para iniciar a complexa rede de eventos intracelulares, há necessidade da ligação do fator de crescimento epidérmico aos receptores do tipo tirosina quinase, localizado na membrana plasmática. Após a interação entre o ligante (Fc) e seu receptor, o domínio extracelular torna-se ativo e ocorre o processo de dimerização, e, conseqüentemente, ativação do domínio quinase intracelular, resultando na fosforilação de proteínas-alvo (Hynes e Lane, 2005; Moasser, 2007; Leite *et al.*, 2012). Estas proteínas ativam as vias de sinalização responsáveis pelo desenvolvimento de diversos órgãos e sistemas, e estão expressas em tecidos de diferentes origens (Hynes e Lanes, 2005). A Figura 2 ilustra as vias de sinalização dos fatores de crescimento e seus receptores.

Figura 2 - Perspectiva de sistema da família de proteínas ERBB (FONTE: Citri e Yarden, 2006).

As principais vias de sinalização da família de receptores ErbB são as vias PI3K/AKT (fosfatidilinositol 3 – quinase) e RAS/RAF/MEK/MAPK (proteína quinase mitógeno ativada) (Citri e Yarden, 2006; Freitas, 2008). Através de várias etapas, a via PI3K e Ras ativam, respectivamente, as

enzimas AKT e MAPK, conforme ilustra a Figura 3. Estas agem sobre as vias de transcrição no núcleo regulando as diversas respostas biológicas, como proliferação celular, sobrevivência, apoptose, entre outros (Roskoski, 2004; Hynes e Lanes, 2005; Leite *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2015).

Figura 3 – Ativação das vias de sinalização envolvidas na programação celular (FONTE: Silva C M *et al.*, 2010)

HER-2 foi a primeira molécula-alvo explorada com sucesso em novas terapias biomoleculares para tumores sólidos. Apresenta-se superexpresso em diferentes tipos de câncer, em particular, no câncer de mama, em que sua expressão tem importante papel prognóstico (Cimbaluk *et al.*, 2006).

Slamon *et al.* (1987) e Amant *et al.* (2004) demonstraram que o aumento da expressão proteica de HER-2 ocorre em, aproximadamente, 20-30% dos casos de câncer primário de mama, apresentando correlação com o comportamento da doença, risco de recorrência, sobrevida e prognóstico. Nesses tumores, hiperexpressão de HER-2 está relacionada com o número de linfonodos metastáticos, tamanho do tumor, estágio da doença, pior grau histológico, ausência de receptores hormonais, entre outros.

A hiperexpressão e amplificação do HER-2 também ocorre, além do câncer de mama, nos tumores de ovário, pulmão, cólon, estômago, esôfago, endométrio e colo uterino (Bellone *et al.*, 2003; Kristensen *et al.*, 2006; Moasser, 2007; Leite *et al.*, 2012).

No caso do sarcoma uterino a expressão do HER-2 envolvendo o trato genital, foi relatado em 0-65% e a amplificação do gene pode variar entre <1%-20% dos casos (Saglam *et al.*, 2013). Nos carcinosarcomas uterinos, a expressão do HER-2 apresenta-se entre 17-43% dos casos (Guzzo *et al.*, 2012).

Em relação ao papel prognóstico da expressão de HER-2, os resultados são conflitantes. Enquanto Livasy *et al.* (2006) mostraram potencial papel na carcinogênese dos carcinosarcomas endometriais (20% dos casos com amplificação do gene HER-2), não houve correlação significativa com progressão da doença, sobrevida livre de doença ou sobrevida global (Livasy *et al.*, 2006; Saglam *et al.*, 2013). A expressão de HER-2 também foi avaliada nos LMS e sua positividade foi observada em 20% dos casos (Layfield *et al.*, 2000). Já Amant *et al.* (2004) demonstraram ausência da expressão tanto nos LMS primários quanto recorrentes. O mesmo foi verificado para os adenossarcomas e SEE. Os mesmos autores realizaram, também, o primeiro estudo sobre expressão imunoistoquímica de HER-2 no SUI, e observaram hiperexpressão e amplificação do gene ERBB2 em ¼ (25%) dos casos, num total de quatro casos, sendo três negativos e um positivo (2+).

Com relação aos CSs, a expressão de HER-2 foi descrita, mais comumente, no componente carcinomatoso (Amant *et al.*, 2004, Cimbaluk *et al.*; Livasy, 2006; Saglam *et al.*, 2013). A Tabela 5 apresenta uma síntese de trabalhos que descreveram a expressão de HER-2 nos carcinosarcomas uterinos, com variação na expressão entre 0-56%, com predomínio no componente carcinomatoso.

Tabela 5 - Estudos sobre expressão de HER-2 nos carcinossarcomas uterinos

Estudos (carcinossarcomas)	Superexpressão HER-2	Componente Carcinomatoso	Componente Sarcomatoso
Raspollini <i>et al.</i> (2005)	7/24 (29%)	7/24	7/24
Sawada <i>et al.</i> (2003)	9/16 (56%)	8/16	1/16
Amant <i>et al.</i> (2004)	6/22 (27%)	5/22	1/22
Cimbaluk <i>et al.</i> (2006)	14/55 (25%)		
Saglam <i>et al.</i> (2013)	2/30 (6%)	2/30	0/30
Swisher <i>et al.</i> (1995)	1/37 (3%)	1/37	1/37
Livasy <i>et al.</i> (2006)	0/20	0/20	0/20
Raspollini <i>et al.</i> (2005)	15/55 (25%)		

1.10.2 Fator de transcrição – FOXO3a

Fatores de transcrição são proteínas que se ligam à sequências específicas do DNA para ativar ou reprimir a expressão de genes alvos. As proteínas FOXO pertencem a um subgrupo da família dos fatores de transcrição Forkhead, caracterizada por uma região de “cabeça de forquilha” de ligação ao DNA e constituída por uma estrutura em “hélice alada”, resultando numa aparência semelhante à uma borboleta (Weigel *et al.*, 1989; Maiese *et al.*, 2008).

O fator de transcrição FOXO foi descrito em *Caenorhabditis elegans* como DAF16, único ortólogo em nematoides desta família. Em *C. elegans* a proteína atua como fator de transcrição primário, responsável pela sinalização para o metabolismo da insulina e por aumentar a longevidade (Lin *et al.*; Ogg *et al.*, 1997). As proteínas Forkhead conservam essa propriedade de ligação do DNA em invertebrados e mamíferos (Maiese *et al.*, 2008; Hun *et al.*, 2009).

Desde a descoberta inicial do gene Forkhead, na mosca *Drosophila melanogaster*, há cerca de 9 anos, mais de 100 genes Forkhead e 19 subgrupos foram identificados em humanos (desde FoxA à FoxS) (Maiese, 2008; Kaestner *et al.*, 2000). Existem 4 membros da família FOXO descritas em mamíferos: FOXO1 (FKHR-Forkhead em rabdomiossarcomas), FOXO3a (FKHRL1 - forkhead em rabdomiossarcoma como proteína 1), FOXO4 (AFX-

gene de fusão da leucemia aguda localizada no cromossomo X) e FOXO6 (Huang e Tindall, 2007; Calnan e Brunet; Maiese *et al.*, 2008).

A Figura 4 ilustra as subfamílias das proteínas Fox de acordo com sua homologia.

Figura 4 - Subfamílias das proteínas Fox descritas em diferentes espécies (FONTE: Kaestner *et al.*, 2000).

A primeira Reunião Internacional, realizada na Califórnia, em novembro de 1998, apresentou uma proposta de padronização de nomenclatura para essas proteínas. Fox (Forkhead box) foi adotada para todos os fatores de transcrição com hélice alada. As abreviaturas para as proteínas Fox contêm todas as letras maiúsculas, em humanos (ex: FOXOD3) (Kaestner, 2000).

Nos mamíferos, os fatores de transcrição desempenham um papel importante na regulação de uma infinidade de funções celulares relacionados à longevidade, à supressão de tumores, à regulação do metabolismo de energia e ao desenvolvimento de uma série de tecidos como ilustrado na Tabela 6 e Figura 5 (Calnan e Brunet, 2008; Yang e Hung, 2009).

Tabela 6 - Relação de órgãos que expressam as proteínas FOXO

Órgão	Localização dentro do órgão
Cérebro	Cerebelo, córtex, hipocampo
Sistema imune e hematopoiético	Mucosa Intestinal, megacariócitos, células progenitoras, reticulócitos, timo, baço
Órgãos periféricos	Tecido adiposo, tecido cardíaco, fígado embrionário, rim, pâncreas, músculo esquelético
Tecido reprodutivo	Ovário, próstata, testículo

FONTE: Maiese K, Chong ZZ, Shang YC. OutFOXOing disease and disability: the therapeutic potential of targeting FOXO proteins. Elsevier Ltd. All rights reserved. doi:10.1016/j.molmed.2008.03.002

Figura 5 - Funções dos fatores de transcrição FOXO nas células e nos organismos (FONTE : Calnan e Brunet, 2008).

De acordo com Maiese *et al.* (2008), a expressão das proteínas FOXOs é regulada por inúmeros estímulos externos, tais como receptores do fator de crescimento insulina-like e EGFR, nutrientes, citocinas e estresse oxidativo. Esta regulação ocorre por meio das modificações pós-traducionais, incluindo fosforilação, acetilação, ubiquitinação e, possivelmente, outras modificações ainda não identificadas.

As funções das proteínas FOXO são controladas por complexas vias de sinalização, e sua perda de função leva à desregulação da proliferação

celular e ao acúmulo de DNA danificado, resultando em doenças como o câncer (Huang e Tindall, 2007). Sua inativação está associada à formação de tumores como o câncer de mama, câncer de próstata, glioblastoma, rabdomiossarcoma e leucemia. O aumento da atividade de FOXO representa uma estratégia terapêutica promissora (Yang e Hung, 2009).

AKT, IKK e ERK são três quinases oncogênicas comumente ativadas no câncer em humanos e tem como alvo o gene supressor de tumor, FOXO3a. Essas quinases fosforilam FOXO3a, por diferentes vias, em resposta ao fator de crescimento. A fosforilação resulta na translocação de FOXO3a do núcleo para o citoplasma, levando a sua ubiquitinação e posterior degradação com, consequentemente, inibição de sua função transcricional. A inibição de AKT, IKK, e ERK parece ser suficiente para restaurar a função do FOXO (Yang e Hung, 2009). A Figura 6 demonstra as vias de sinalização das quinases e de seu alvo - FOXO3a.

Figura 6 - Vias de sinalização das quinases oncogênicas (Akt, IKK e ERK) e seu alvo FOXO3a (FONTE: Yang e Hung, 2009).

O papel e o perfil de expressão de FOXO3a foram descritos em alguns tumores. Dentre eles, foi observado que, no câncer de mama, a localização citoplasmática do FOXO3a parece estar relacionada com baixa sobrevida e, no câncer de próstata, a supressão da atividade FOXO3a pode resultar em maior crescimento das células tumorais (Yang e Hung, 2009). Por outro lado, a ativação de FOXO3a pode inibir a progressão do ciclo celular e proliferação de crescimento do tumor em linhagens de carcinoma de cólon (Maiese *et al.*, 2008).

No caso do câncer de ovário, a perda da função do FOXO3a pode limitar a sensibilidade das células do câncer de ovário à quimioterapia. Alguns quimioterápicos, atualmente usados no tratamento do câncer de mama e na leucemia mieloide aguda, podem ativar a FOXO3a por redução da atividade de AKT (Zeng *et al.*, 2006; Yang e Hung, 2009). A ativação de FOXO3a também pode ser eficaz em vencer a resistência do tumor à radioterapia, como demonstrado por induzir Bim e apoptose em linhagens celulares de osteossarcoma expostas à radiação ionizante. De acordo com Yang e Hung (2009), a atividade antitumoral potente de FOXO3a pode sensibilizar as células tumorais resistentes à radioterapia por meio de tratamento combinado da radiação com a quimioterapia.

Não foram encontrados na literatura estudos referentes à expressão de FOXO em sarcomas uterinos. Desse modo, nosso projeto teve como objetivo avaliar a expressão de FOXO3a nos diferentes tipos histológicos de sarcomas e nos carcinosarcomas, visando avaliar essa proteína como futuro alvo terapêutico. Além disso, o HER-2 também foi analisado, por ser considerado um dos principais ativadores da via de fosforilação de FOXO3.

2 OBJETIVOS

---

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Analisar a expressão do fator de crescimento HER-2 e do fator de transcrição FOXO3a em amostras de pacientes com sarcomas e carcinosarcomas uterinos.

2.1 Específicos

- Avaliar o padrão de expressão imunoistoquímica de HER-2 e FOXO3a nas amostras, em relação ao miométrio normal;
- Avaliar a presença de alterações gênicas (deleções, polissomias ou amplificações) em HER-2, por meio das técnicas de FISH (*Fluorescent in Situ Hybridization*) e SISH (*Hibridização In Situ Cromogênica*);
- Comparar todos os resultados obtidos com os dados clínicos e anatomopatológicos das pacientes.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

---

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob o nº 143/11; do Instituto Brasileiro de Controle do Câncer; do Hospital A C Camargo Câncer Center e do Hospital Santa Marcelina (Anexo A). Não foi necessário o termo de consentimento livre e esclarecido devido ao caráter retrospectivo do levantamento de dados.

Todas as técnicas que foram empregadas no desenvolvimento deste trabalho foram realizadas no Laboratório de Ginecologia Estrutural e Molecular da Disciplina de Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – LIM 58 – e no Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A. C. Camargo.

3.1 Seleção dos casos

Foram selecionados 156 casos com diagnóstico de sarcoma uterino, em seus diversos tipos histológicos, e de carcinosarcoma. O número de amostras de pacientes, por tipo histológico de tumor, ficou assim distribuído: 56 amostras de leiomiossarcoma (LMS), 24 de carcinosarcoma (CSS), 18 de sarcoma do estroma endometrial (SEE) e 2 de adenossarcoma. As análises foram realizadas utilizando amostras obtidas por meio de cirurgia, no período de 2000 a 2012.

Após seleção e revisão dos tecidos, foram excluídos 56 casos devido à má condição de conservação do material ou por informações incompletas no prontuário. Foram utilizados tecidos emblocados em parafina. As amostras foram cedidas pelo Instituto Brasileiro de Controle do Câncer, Hospital Santa Marcelina – Unidade Itaquera, Departamento de Patologia do Hospital das Clínicas da FMUSP e do Hospital A C Camargo Câncer Center.

3.2 Coleta de dados

Os prontuários das pacientes foram analisados e coletaram-se os seguintes dados: idade, queixa principal, uso de terapia de reposição hormonal, doenças de base associadas, cirurgia realizada, tratamento, recidivas e ocorrência de metástases.

Os dados clínicos e alguns dados anatomopatológicos foram obtidos a partir de prontuários médicos arquivados no Serviço de Arquivo Médico e Estatística das instituições colaboradoras correspondentes (Anexo B). Os blocos e as lâminas foram separados e revistos por dois patologistas, um do Hospital das Clínicas e o segundo do Hospital A C Camargo Câncer Center, confirmando o diagnóstico histopatológico das neoplasias.

3.3 Variáveis coletadas

a) Variáveis demográficas e clínicas coletadas nos prontuários das pacientes, e sua categorização:

- Idade; agrupada em duas categorias (≥ 50 anos e < 50 anos);
- Sintomas/Queixa principal;
- Recidiva (não, sim – local/distância);
- Tratamento cirúrgico (sim/não);
- Necessidade de tratamento com radioterapia e/ou quimioterapia;
- Situação atual (óbito, vivo com ou sem doença e perda de seguimento).

b) Variáveis anatomopatológicas:

- Estadiamento inicial pela FIGO, de acordo com a última edição da FIGO (Prat, 2009);
- Classificação dos tumores em alto e baixo grau, baseado no pleomorfismo nuclear e índice mitótico (Diagnostic Pathology Gynecological, 2014);

- Determinação da expressão do fator de crescimento HER-2 e do fator de transcrição FOXO3a, por meio de imunoistoquímica, em tecido parafinado, antes de qualquer tratamento adjuvante;
- Determinação do estado do gene HER-2 por FISH e SISH.

3.4 Construção do *Tissue Microarray* –TMA

Os blocos, contendo as áreas de tumor selecionadas pelo patologista, foram utilizados para construção do TMA, contendo 56 amostras de LMS, 24 de CS, 18 de SEE e 02 de adenossarcoma. As áreas representativas dos tecidos foram retiradas do bloco doador e adicionadas ao bloco receptor com auxílio do *Manual Tissue Arrayer 1 (Benchmer Instruments Micro-array Technology, EUA)*. Foram utilizados dois fragmentos de cada amostra, compreendendo regiões diferentes dos tecidos e depositados de forma coordenada no bloco receptor. Os fragmentos tumorais de 1,0 mm foram arranjados em duplicata com espaço de 0,2 mm entre as amostras. Os cortes seriados do bloco de TMA (4µm) foram depositados em lâminas silanizadas (Starfrost®), recobertas com adesivo e submetidas à fixação por UV (Instrumedics Inc®, NJ). Posteriormente, as lâminas passaram por um banho de parafina e armazenadas em freezer a - 20°C. Um mapa com a identificação detalhada foi construído em planilha Excel, permitindo a localização exata de cada caso (Anexo C e D).

3.5 Reações de imunoistoquímica (IIQ)

Inicialmente, foram realizadas as reações para padronização das condições ideais de diluição e recuperação antigênica para cada um dos anticorpos avaliados, em lâminas de corte convencional contendo os tecidos indicados pelos fabricantes como controle positivo. Posteriormente, as reações foram realizadas nas lâminas de TMA e analisadas como segue.

As lâminas foram desparafinizadas em três banhos de Xilol, reidratadas em álcool etílico a 100%, 80% e 70%; e lavadas em água corrente. Foi utilizado o método da Estreptovidina-biotina-peroxidase. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada pela imersão das lâminas em três banhos com água oxigenada 3%, 5 minutos cada. O bloqueio da proteína foi concluído após incubação das lâminas por 30 minutos em 100 ml de leite Molico (5g de leite + 100 ml de PBS 1x). A recuperação antigênica das lâminas tratadas em tampão citrato (pH 6.0) foi realizada por meio do calor úmido em panela de pressão elétrica com 800 ml de água destilada a 98°C por 25 minutos.

As lâminas foram bloqueadas para peroxidase endógena (H_2O_2) e; para proteínas inespecíficas (*Dako Protein Block Serun – Free*); por 15 minutos e 30 minutos, respectivamente.

As reações foram realizadas seguindo as especificações dos fabricantes para cada anticorpo utilizado. Foram utilizadas duas lâminas para cada anticorpo. As condições padronizadas para as reações com FOXO 3a e HER-2 estão apresentadas na Tabela 7. As lâminas foram levadas para capela e o anticorpo já preparado foi aplicado nas respectivas lâminas, onde permaneceu a 4°C por toda uma noite. Após esta e cada etapa seguinte, as lâminas foram lavadas por 3 vezes de 5 minutos cada com PBS (1X). No dia seguinte; foi realizada a incubação com a biotina em temperatura ambiente por 30 minutos. O mesmo processo foi realizado para a peroxidase (kit LSAB Streptovidina). Em seguida, as lâminas foram lavadas, os cortes foram cobertos com 3,3 diaminobenzina (DAKO) por até 5 minutos, contracoradas com hematoxilina de Harris (MERK) e montadas com Permaunt (*Fisher Scientific*).

Tabela 7 - Anticorpos e condições padronizadas para cada um dos anticorpos utilizados nas reações de imunoistoquímica

Anticorpo	Marca	Fonte	Diluição	Recuperação antigênica
FOXO 3	Novus Biological	Policlonal de coelho	1:50	Panela de Pressão
HER-2	LifeSpan	Monoclonal de camundongo	1:100	Banho-Maria

3.6 Avaliação da expressão das proteínas

As lâminas foram analisadas no Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A. C. Camargo Câncer Center pela patologista Dra. Isabela W da Cunha, sob supervisão do Dr. Fernando A Soares, e Dr. Luciano Bottura do Hospital Santa Marcelina. A leitura foi realizada com auxílio de microscópio óptico comum, sendo que a patologista não teve acesso aos dados clínicos das pacientes. Os resultados foram classificados em relação à intensidade e frequência da reação positiva para cada tecido.

A expressão em membrana celular do HER-2 foi interpretada por meio de padronização semiquantitativa seguindo método de avaliação já padronizado para esse marcador (Wolff *et al.*, 2007). A reação foi considerada negativa quando não houve expressão da proteína em menos de 30% das células neoplásicas; 1+ (uma cruz) quando houve fraca intensidade de expressão focal em mais de 30% das células tumorais; 2+ (duas cruzes) quando houve fraca ou moderada intensidade de expressão em toda membrana – em mais de 30% das células – e 3+ (três cruzes) quando houve forte intensidade de expressão imunohistoquímica em toda membrana celular – em mais de 30% das células tumorais.

A expressão nuclear de FOXO3a foi interpretada por meio da coloração imunorreativa e caracterizada semiquantitativamente de acordo com a percentagem de células positivas e sua intensidade da coloração. Foram atribuídas as seguintes pontuações para frequência: 0 se 0 -10% das células tumorais apresentaram coloração positiva; um, se > 10 - 25% coradas; 2, se >25 a 50% coradas; 3, se >50-75% coradas, e 4, se > 75 % das células estiverem coradas. Para a intensidade da coloração, foi considerada a escala de 0 a 3, em que: 0, negativo; 1, fraco; 2, moderada; e 3, forte.

Os valores de intensidade e frequência foram multiplicados, e foi obtida uma faixa de valores de expressão variando de 0 a 12. Como escore final, para análise estatística, classificamos a expressão das proteínas como: fraca (escore 0- 4), moderada (escore 5-8) e forte (escore 9-12).

3.7 Protocolo de Hibridização *in Situ* Fluorescente (FISH)

Lâminas silanizadas contendo os cortes histológicos de 3 µm de espessura foram submetidas à desparafinização em xilol por 10 minutos cada temperatura ambiente. Procedeu-se, então, a 3 passagens em álcool absoluto e lavagem em água destilada (3 passagens de 5 minutos cada). As lâminas permaneceram em solução de 0,2N HCL (ácido clorídrico), por 20 minutos, à temperatura ambiente, e, posteriormente, lavada em água corrente, por 5 minutos. As lâminas foram pré-tratadas em solução de Citrato 0,1N (ácido cítrico/MERCK), pH 6,0 em banho-maria pré-aquecido a 80°C, por uma hora. Posteriormente, foram submetidas à digestão enzimática com pepsina (pronta para uso – DAKO), em concentração estabelecida pelo fabricante, por 8 minutos, à temperatura ambiente. Após serem lavadas com solução 2X de SSC (*Sodium Citrate, Sodium Chloride*/DAKO) por 2 minutos, foram desidratadas em álcool em concentrações crescentes (75%, 80% e 100%, por 2 minutos cada) e secas em temperatura ambiente, por 5 minutos. Após essa etapa, foram aplicados 10 microlitros da sonda, em concentração pré-estabelecida pelo fabricante (HER-2/CEN17 – Vysis), as lâminas foram recobertas com lamínula 22 x 22 mm e vedadas com selante (DAKO). Seguiu-se a co-denaturação por 5 minutos a 82°C e hibridização por 20 horas a 45°C em aparelho específico (Hybridizer – DAKO®), conforme indicações do fabricante. No segundo dia, as lâminas foram retiradas do equipamento, o selante e a lamínula foram removidos, e os tecidos mergulhados em solução pré-aquecida de UREA (Merck) a 1,5M/0,1X de SSC em banho-maria, pré-aquecido a 45°C por 30 minutos. As lâminas foram lavadas em solução 2X de SSC por 2 minutos à temperatura ambiente e em banhos de álcool em concentrações crescentes (75%, 80%, 100%, por 2 minutos cada) para desidratação. As lâminas secaram à temperatura ambiente, para, então, serem contracoradas com 15 µl de DAPI (Vysis), para a identificação dos núcleos, e cobertas com lamínula 24 x 40 mm.

As lâminas foram analisadas utilizando-se o microscópio de fluorescência (BX61, Olympus, Center Valley, PA, USA), e as imagens capturadas usando o programa Image Pro Plus®. Para cada caso, foram contadas 20 células e os resultados foram informados de acordo com o número de sinais obtidos para a sonda centromérica e para o gene-alvo. O caso foi considerado normal (não amplificado) quando houve 2 sinais para sonda centromérica e 2 sinais para a sonda-alvo; a amplificação foi considerada quando foram observados 5 sinais ou mais da sonda alvo e 2 sinais da sonda centrométrica (razão $\geq 2,5$).

3.8 Protocolo de Hibridização *in Situ* Cromogênica (SISH)

Essas reações foram realizadas apenas com as lâminas dos casos de carcinosarcoma que apresentaram amplificação na técnica FISH. O objetivo era avaliar o corte convencional (tumor inteiro) para checar se havia amplificação também no componente epitelial. Foi utilizado o equipamento Benchmark XT (Ventana), seguindo protocolo pré-estabelecido e padronizado. Após a desparafinização, as lâminas foram submetidas a 3 ciclos de incubação em solução *Cell Conditionin CC2*. Foram realizados: ciclo 1 de incubação de 8 minutos, ciclo 2 de incubação de 12 minutos e ciclo 3 de incubação de 12 minutos. A digestão enzimática foi realizada com *ISH Protease 3* por 12 minutos, seguida da aplicação da sonda *HER-2 DNP CHR17 DIG* com desnaturação a 80°C, durante 20 minutos, e hibridização a 72°C, por 6 horas. Na sequência, procedeu-se a incubação com *Multimer SISH*, consistindo de 1 gota *SIL ISH DNP HRP*, por 16 minutos, 1 gota do cromógeno de prata *SIL ISH DNP CHRC*, por 4 minutos, incubação com *Multimer ISH* vermelho contendo 1 gota do *RED ISH DIG AP*, por 24 minutos, e 1 gota do cromógeno vermelho *RED ISH DIG FR*, por 8 minutos. A contracoloração foi realizada com Hematoxilina II, por 24 minutos, seguido de incubação pós-contrastante com *Bluing Reagent*, por 4 minutos. As lâminas foram lavadas em água corrente, e secas em estufa a 60°C por 15

minutos e montadas em equipamento com *Tissue Tek film* (Sakura). Entre cada etapa do processo, foram realizados múltiplos banhos em tampão de lavagem *Reaction Buffer* (Ventana). A leitura da lâmina foi realizada por um patologista em microscópio convencional.

3.9 Análise Estatística

A confecção do banco de dados e as análises foram feitas no programa estatístico “*Statistical Package for Social Sciences*” versão 21.0 for Mac (SPSS, Inc., Chicago, IL).

As associações entre as variáveis categóricas foram analisadas pelo teste qui-quadrado bicaudal ou pelo teste exato de Fisher quando, pelo menos, uma frequência esperada foi < 5 . Foi calculada, inicialmente, a frequência simples de todas as variáveis.

Dentre as variáveis clinicopatológicas analisadas, estão: idade, sintoma principal, presença de persistência ou recidiva tumoral, metástase local ou distância, grau de diferenciação do tumor, tratamento cirúrgico, tratamento adjuvante, situação atual.

Utilizou-se o método de Kaplan-Meier para os cálculos de probabilidade de sobrevida global e livre de doença, e o teste de log-rank para se comparar as curvas de sobrevida entre os grupos (Kaplan e Meier, 1958). A data da cirurgia foi considerada como o momento inicial do seguimento e, com a data da última informação, temos o tempo de seguimento calculado para cada paciente em questão. A sobrevida livre de doença foi calculada com base no período de tempo, em meses, decorridos entre a data da cirurgia e data do diagnóstico da primeira metástase (local ou a distância) ou último seguimento. Já, as taxas de sobrevida foram calculadas com base no período de tempo, em meses, decorridos entre a data da cirurgia e data do óbito, ou última informação em prontuário. Já a recidiva foi calculada com base no período de tempo entre a data do anatomopatológico e o diagnóstico da recorrência da doença (local ou

distância) num período maior que 6 meses. A persistência de doença foi calculada com base nos casos que apresentaram evidência de doença (local ou distância) já ao diagnóstico anatomopatológico ou em até, no máximo, 6 meses do diagnóstico. Ocorrência de metástase foi considerada nos casos que apresentaram doença a distância, ou locorregional, independente do período.

Para todos os testes estatísticos, o nível de significância foi igual ou menor a 5% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

---

4 RESULTADOS

4.1 Dados demográficos, clínicos e cirúrgicos

A média de idade das pacientes estudadas foi de 58 anos, variando de 27 a 91 anos. A queixa principal foi sangramento (60%), seguido por dor pélvica (27%). A recorrência da doença foi observada em 65% das pacientes incluídas no estudo. As demais características demográficas, clínicas e cirúrgicas das pacientes de acordo com o tipo histológico do tumor estão descritas nas Tabelas 8 e 9.

Quanto aos tipos histológicos analisados e estágio clínico mais prevalente, identificamos: LMS com estágio clínico (EC) I (35,6%) e IV (30,2%); SEE com EC I e III (38,9%, ambos); AS com EC I (100%) e CS com EC III (45,5%).

A cirurgia primária realizada em 98 (98%) dos casos incluiu a histerectomia, enquanto em 2 (2%) dos casos foi realizada apenas curetagem uterina. Da série total, 32 casos (39,5%) não realizaram tratamento adjuvante. Das 68 (68%) pacientes que receberam tratamento adjuvante, 27 (39,7%) realizaram apenas radioterapia; 24 (35,3%) apenas quimioterapia e 17 (25%) realizaram rádio e quimioterapia. A relação entre as pacientes que realizaram quimioterapia e radioterapia conforme o tipo histológico está demonstrada na Tabela 10.

Tabela 8 - Características clínicas, anatomopatológicas e tratamento cirúrgico das pacientes com sarcoma e carcinosarcoma uterino.

Variáveis	Categorias	N (%)
Queixa Principal	Sangramento	60 (60)
	Dor pélvica	27 (27)
	Ignorado	13 (13)
Idade	> 50	71 (71)
	≤ 50	29 (29)
Patologia de Base	Sim	18 (18)
	Não	38 (38)
	Ignorado	44 (44)
Tratamento Cirúrgico	Sim	98 (98)
	Não	2 (2)
Recorrência	Sim	65 (65)
	Não	28 (28)
	Ignorado	07 (07)

Tabela 9 - Características do estadiamento, tratamento adjuvante e recorrência de acordo com tipo histológico para as pacientes com sarcoma e carcinosarcoma uterino.

Variáveis	Categorias	CS N (%)	AS N (%)	LMS N (%)	SEE N (%)
Idade	≤50 anos	0 (0)	0 (0)	22 (39,3)	5 (27,8)
	>50 anos	24 (100)	2 (100)	34 (60,7)	13 (62,2)
Estadiamento	I	4 (18,2)	2 (100)	19 (35,8)	7 (38,9)
	II	2 (9,1)	0 (0)	10 (18,9)	3 (16,7)
	III	10 (45,5)	0 (0)	8 (15,1)	7 (38,9)
	IV	6 (27,3)	0 (0)	16 (30,2)	1 (5,5)
Grau Histológico	Alto	23 (100)	1 (50)	43(76,8)	13 (72,2)
	Baixo	0 (0)	1 (50)	13(23,2)	5 (27,8)
Recorrência	Não	8 (33,4)	1 (50)	10 (17,9)	3 (16,6)
	Persistência	6 (25)	0	13 (23,2)	7 (38,9)
	Recidiva	5(20,8)	0	21 (37,5)	7 (38,9)
	Ignorado	5 (20,8)	1 (50)	12 (21,4)	1 (5,6)
Tipo de Metástase	Local	2 (18,2)	0 (0)	9 (26,5)	3 (21,4)
	Distância	9 (81,8)	0 (0)	25 (73,5)	11 (78,6)

Tabela 10 - Relação entre as pacientes que realizaram quimioterapia e radioterapia conforme o tipo histológico.

Variáveis	Categorias	CS N (%)	AS N (%)	LMS N (%)	SEE N (%)
Tratamento adjuvante	Não	5 (20,8)	0	22 (39,3)	5 (27,8)
	RT	8 (33,3)	2 (100)	11 (19,6)	6 (33,3)
	QT	3 (12,6)	0	17 (30,4)	4 (22,2)
	QT+RT	8 (33,3)	0	6 (10,7)	3 (16,7)

O tempo médio de seguimento foi de 36 meses, variando de 0,1 a 237 meses. Recidiva ocorreu em 33 casos (33%) e, persistência da doença, em 26 (26%). Vinte dois (22%) casos não apresentaram recidiva ou persistência e, em 19 (19%) casos, não foi possível avaliar.

Ocorrência de metástase foi observada em 59 (59%) pacientes, sendo em sítio único em 19 (19%), e em 2 ou mais sítios em 21 (35,6%) das mulheres. Os principais sítios de metástases foram: pulmão 27 (45,8%); fígado 13 (22%) e ossos 5 (8,5%). O estado atual das pacientes pode ser visualizado na Tabela 11.

Tabela 11 - Estado atual das pacientes com sarcoma e carcinosarcoma uterino.

Variáveis	Categorias	CS N (%)	AS N (%)	LMS N (%)	SEE N (%)
Estado	Viva	3 (12,5)	1 (50)	12 (21,4)	4 (22,2)
	Óbito	17 (70,8)	0 (0)	40 (71,4)	13 (72,2)
	Perda de seguimento	4 (16,7)	1 (50)	4 (7,2)	1 (5,6)

4.2 Expressão imunoistoquímica (IIQ) de HER-2 e FOXO3a

Cortes histológicos de todas as amostras foram corados por HE (Hematoxilina e Eosina) e o diagnóstico foi revisto por dois patologistas. Fotomicrografias representativas dos tipos histológicos avaliados podem ser observadas na Figura 7.

Figura 7 - Fotomicrografias dos tecidos corados por HE (40x) dos seguintes tipos histológicos: Leiomiossarcoma (LMS), Carcinossarcoma (CS), Sarcoma do Estroma Endometrial (SEE) e Adenosarcoma (AS).

Em relação à expressão do fator de transcrição FOXO3a, 67 (72%) das amostras apresentaram forte expressão nuclear, enquanto 12 (12,9%) expressão moderada e, 14 (15,1%), fraca. Como amostras para referência do perfil de expressão da proteína foram utilizados miométrios normais e leiomiomas uterinos.

Não foi possível a avaliação de 7 casos (7%) devido ao descolamento do tecido da lâmina. A Tabela 12 resume as frequências de expressão imunoistoquímica do FOXO3a entre as pacientes estudadas de acordo com o tipo histológico dos tumores.

Tabela 12 - Frequências das expressões imunoistoquímicas do FOXO3a entre as pacientes estudadas e os diferentes tipos histológicos sarcoma e CS uterino.

Tipo histológico	FOXO3A		
	Fraca N (%)	Moderada N (%)	Forte N (%)
CS	2 (8,3)	2 (8,3)	20 (83,3)
AS	0 (0)	0 (0)	2 (100)
LMS	9 (16,1)	10 (17,9)	30 (53,6)
SEE	3 (16,7)	0 (0)	15 (83,3)

O padrão de expressão de FOXO3a observado nos diferentes tipos histológicos de sarcomas e CS uterinos por imunoistoquímica pode ser visto na Figura 8. Todas as amostras apresentaram expressão do marcador exclusivamente no núcleo.

Figura 8 - Forte expressão nuclear do FOXO3a (40x) dos seguintes tipos histológicos: Leiomiossarcoma (LMS), Carcinosarcoma (CS), Sarcoma do Estroma Endometrial (SEE) e Adenosarcoma (AS).

Em relação à expressão de HER-2, apenas um dos tumores avaliados (1%) apresentou expressão positiva, tornando estatisticamente impossível a realização de testes de associação entre as variáveis clínicas e anatomopatológicas. A Figura 9 apresenta o perfil obtido nas reações de imunohistoquímica para esse marcador. O único caso com expressão positiva foi de carcinossarcoma uterino (3+).

Figura 9 - Expressão negativa de HER-2 em Leiomiossarcoma (LMS), Sarcoma do Estroma Endometrial (SEE), Adenossarcoma (AS) e Sarcoma uterino indiferenciado (SUI). Carcinossarcoma uterino mostrando forte expressão imunohistoquímica na membrana celular (3+) para HER-2.

4.3 Avaliação de alterações no número de cópias de *HER-2*

Foram encontradas 14 amostras (25,9%) com ganho de cópias cromossômicas do gene. Porém, somente o caso com expressão 3+ à

imunohistoquímica mostrou amplificação gênica expressiva no FISH (razão $\geq 2,5$).

Na Tabela 13 podem ser observados os dados obtidos na hibridização *in situ* fluorescente (FISH) para os diferentes tumores avaliados. As Figuras 10 e 11 ilustram o perfil das reações para detecção de HER-2 por FISH.

Tabela 13 - Dados de FISH para os diferentes tipos histológicos de sarcoma e CS uterino

Tipo histológico	FISH	
	Sem amplificação N (%)	Amplificado N (%)
CS	10 (41,7)	6(25)
AS	0 ( )	0 (0)
LMS	24 (42,9)	6 (10,7)
SEE	6 (33,3)	2 (11,1)

Figura 10 - Amplificação de HER-2. Sinais vermelhos - HER-2, verdes - cromossomo 17. (A) Integridade nuclear; (B) Ausência de amplificação; (C) sinal amplificado na amostra de carcinossarcoma; (D) Amplificação de pelo menos 10 cópias.

Posteriormente, todos os casos de carcinosarcomas com amplificação no FISH foram analisados em corte convencional por SISH. O intuito foi avaliar o componente epitelial desses tumores (Figura 12), uma vez que o caso com hiperexpressão da proteína mostrou amplificação gênica no componente epitelial. Na montagem do TMA, foram selecionadas áreas com maior representatividade de componente mesenquimal.

Figura 11 - Leiomiossarcoma uterino com sonda *Vysis LSI Dual Color* (HER-2 em vermelho; cromossomo 17 em verde). (A), Integridade nuclear. (B e C) Ausência de amplificação de sinal, na proporção 2:2 (x100).

Figura 12 - Amplificação de HER-2 por SISH em amostras de carcinosarcomas. (A) seta azul - componente mesenquimal sem reatividade; seta verde - componente epitelial reativo para HER-2 (20X). (B) Núcleos positivos para amplificação gênica no componente epitelial. (C) seta vermelha - célula com alta amplificação. (D) Amostra de carcinosarcoma sem amplificação.

Novamente, somente o caso de CS com expressão 3+ na imunohistoquímica para HER-2 e razão de amplificação do gene maior que 2,5 por FISH (2; 10), apresentou positividade no SISH. A amplificação foi restrita ao componente carcinomatoso. Os demais casos amplificados foram negativos tanto no componente mesenquimal quanto no epitelial conforme pode ser observado na Figura 12.

4.4 Correlação dos achados moleculares e dados clínico- patológicos

As taxas de sobrevida global (SG) e de sobrevida livre de doença (SLD) em 5 anos foram calculadas para cada um dos tipos de tumor avaliados. A SG mediana para os casos de CS, LMS e SEE foi de 7,7; 20,8 e 16,4 meses, respectivamente. A SLD apresentou mediana de 9,3 meses para os CS; 14,3 para LMS e de 16,4 para os SEE. As Figuras 13 a 15 apresentam as curvas de sobrevidas global e livre de doença obtidas para cada tipo histológico.

Cerca de 26 (26%) casos já apresentavam metástase à distância no momento do diagnóstico ou antes de completar 6 meses de seguimento.

Figura 13 - Curvas de Kaplan-Meier mostrando as taxas de sobrevida global e sobrevida livre de doença para as pacientes com carcinossarcoma.

Figura 14 - Curvas de Kaplan-Meier mostrando as taxas de sobrevivência global e sobrevivência livre de doença para as pacientes com leiomiossarcoma.

Figura 15 - Curvas de Kaplan-Meier mostrando as taxas de sobrevivência global e sobrevivência livre de doença para as pacientes com sarcoma do estroma endometrial.

A média de SG para os casos de LMS com forte expressão de FOXO3a foi a menor entre os diferentes padrões de expressão (32 meses). Porém, não houve diferença significativa na comparação entre as amostras com expressão fraca e forte ($p=0,157$). Para os casos de SEE, maior média

de sobrevida foi registrado para os casos com forte expressão do marcador (33,6 meses). Mais uma vez, não foi observada diferença significativa entre os diferentes perfis de expressão de FOXO3a ($p=0,882$). O mesmo foi detectado para as amostras de CS ($p=0,762$), em relação à sobrevida global.

Pouca diferença foi observada entre as médias de SLD nos casos de SEE ($p=0,919$). Porém, os casos de LMS com forte expressão de FOXO3a apresentaram sobrevida livre de doença significativamente maior que os com expressão fraca e moderada dessa proteína ($p=0,050$). A SG e SLD não foram calculadas para os casos de AS devido ao pequeno número em cada grupo.

A avaliação das SG e SLD dos casos de LMS, SEE e CS, em relação à expressão de HER-2, também não foi possível, uma vez que somente um caso apresentou positividade para essa proteína. As Figuras 16, 17 e 18 mostram as curvas de sobrevida global e livre de doença em relação à expressão da proteína FOXO3a nos diferentes tumores avaliados.

p = *Não foi possível calcular o valor de p

Figura 16 - Curvas de Kaplan-Meier mostrando as taxas de sobrevida global e livre de doença referentes à expressão da proteína FOXO3a nos carcinosarcomas.

Figura 17 - Curvas de Kaplan-Meier mostrando as taxas de sobrevida global e livre de doença referentes à expressão da proteína FOXO3a nos Leiomiossarcomas.

Figura 18 - Curvas de Kaplan-Meier mostrando as taxas de sobrevida global e livre de doença referentes à expressão da proteína FOXO3a nos sarcomas do estroma endometrial.

Foi realizada análise da expressão de FOXO3a nos CS e nos sarcomas uterinos, assim como no miométrio normal (total de 13 casos), para fins comparativos já que o miométrio é um tecido normal que está sujeito às mesmas condições biológicas que os tumores. Na Tabela 14 podem ser vistos os valores de expressão de FOXO3a em ambas as condições biológicas (tumores x tecido normal), e na Tabela 15 os valores

obtidos nas comparações entre os diferentes tipos de tumor analisados neste trabalho. Todos os tumores apresentaram maior expressão da proteína em relação ao miométrio normal. Já entre os tumores, não houve diferença significativa.

Tabela 14 - Expressão de FOXO3a em tecidos tumorais em relação ao miométrio normal.

Variável		FOXO3A			P
		Fraca N (%)	Moderada N (%)	Forte N (%)	
Tipo Histológico	CS	2 (8,3)	2 (8,3)	20 (83,4)	0,001
	MM	8 (62,5)	1 (7,7)	4 (30,8)	
	LMS	9 (18,4)	10 (20,4)	30 (61,2)	0,011
	MM	8 (61,5)	1 (7,7)	4 (30,8)	
	SEE	3 (16,7)	0 (0)	15 (83,3)	0,008
	MM	8 (61,5)	1 (7,7)	4 (30,8)	

MM – miométrio

Tabela 15 - Expressão de FOXO3a entre os tipos histológicos de sarcoma e CS uterino.

Variável		FOXO3A		P
		Negativo N (%)	Positivo N (%)	
Tipo Histológico	CS	2 (8,3)	22 (91,7)	0,320
	LMS	9 (18,4)	40 (81,6)	
	CS	2 (8,3)	22 (91,7)	0,636
	SEE	3 (16,7)	15 (83,3)	
	LMS	9 (18,4)	40 (81,6)	1
	SEE	3 (16,7)	15 (83,3)	

Nas análises considerando o estadiamento clínico das pacientes, foi observado que, das pacientes com LMS e SEE em estágio I, 15 (62,5%) apresentavam forte expressão do fator de transcrição FOXO3a (Tabela 16). Para os estádios II, III e IV, forte expressão da proteína foi encontrada em 76,9%; 66,7% e 64,3%, respectivamente ($p=0,974$). Nas pacientes com CS no estágio I e II, 100% mostraram forte expressão; no estágio III, forte expressão foi encontrada em 80%; no estágio IV, 83,3% ($p=0,662$).

Tabela 16 - Associação entre a expressão proteica de FOXO3a e variáveis clinicopatológicas nas pacientes avaliadas com sarcoma e CS uterino

Tipo histológico	Variável	FOXO3A			P
		Fraca N (%)	Moderada N (%)	Forte N (%)	
CS	Estadiamento				
	I	0 (0)	0 (0)	4 (100)	
	II	0 (0)	0 (0)	2 (100)	
	III	2 (20)	0 (100)	8 (80)	0,662
	IV	0 (0)	1 (16,7)	5 (83,3)	
LMS/SEE	Estadiamento				
	I	4 (16,7)	3 (20,8)	15 (62,5)	
	II	1 (7,7)	2 (15,4)	10 (76,9)	
	III	4 (26,7)	1 (6,7)	10 (66,7)	0,837
	IV	3 (21,4)	2 (14,3)	9 (64,3)	
CS	Idade				
	<50 anos	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
	≥50 anos	2 (8,3)	2 (8,3)	20 (83,4)	NA
LMS	Idade				
	<50 anos	1 (5)	7 (35)	12 (60)	
	≥50 anos	8 (27,6)	3 (10,3)	18 (62,1)	0,033
SEE	Idade				
	<50 anos	2 (28,6)	0 (0)	5 (71,4)	
	≥50 anos	1 (9,1)	0 (0)	10 (90,9)	0,528
CS	Grau Histológico				
	Baixo	1 (100)	0 (0)	0 (0)	
	Alto	1 (4,3)	2 (8,7)	20 (87)	0,167
LMS	Grau Histológico				
	Baixo	4 (33,3)	1 (8,3)	7 (58,3)	
	Alto	5 (13,5)	9 (24,3)	23 (62,2)	0,257
SEE	Grau Histológico				
	Baixo	3 (60)	0 (0)	2 (40)	
	Alto	0 (0)	0 (0)	13 (100)	0,012
CS	Recorrência				
	Não	0 (0)	0 (0)	8 (100)	
	Sim	1 (9,1)	1 (9,1)	9 (81,8)	1

continua

					conclusão
Tipo histológico	Variável	FOXO3A			P
		Fraca N (%)	Moderada N (%)	Forte N (%)	
LMS	Recorrência				
	Não	4 (30,8)	3 (23,1)	6 (46,2)	
	Sim	5 (13,9)	7 (19,4)	24 (66,7)	0,276
SEE	Recorrência				
	Não	1 (33,3)	0 (0)	2 (66,7)	
	Sim	2 (14,3)	0 (0)	12 (85,7)	0,465
CS	Local da Recidiva				
	Local	0 (0)	1 (50)	1 (50)	
	Distância	1 (11,1)	0 (0)	8 (88,9)	0,345
LMS	Local da Recidiva				
	Local	1 (11,1)	2 (22,2)	6 (66,7)	
	Distância	3 (13,6)	4 (18,2)	15 (68,2)	1
SEE	Local da Recidiva				
	Local	0 (0)	0 (0)	3 (100)	
	Distância	2 (14,3)	0 (0)	12 (85,7)	1

Em relação ao grau histológico, as pacientes portadoras de SEE apresentaram diferenças significativas na expressão de FOXO3a. Tumores classificados como de baixo grau tiveram menor expressão de FOXO3a, quando comparados aos de alto grau histológico ($p=0,012$).

Outro dado significativo foi quanto à categorização da idade das pacientes. As amostras de LMS de mulheres com mais de 50 anos apresentaram maior expressão de FOXO3a.

O tipo de recidiva também foi avaliado quanto à expressão de FOXO3a; contudo, a expressão dessa proteína não foi significativamente diferente entre os grupos das pacientes que apresentaram recidiva local ou à distância ($p=1$ para SEE; $p=1$ para LMS; $p=0,345$ para CS). A Tabela 16 mostra a associação entre as variáveis clinicopatológicas e a expressão de FOXO3a.

5 DISCUSSÃO

---

5 DISCUSSÃO

Sarcomas uterinos são tumores de baixa prevalência, porém, com elevada mortalidade. Neste estudo foram avaliados os leiomiossarcomas (LMS), sarcomas do estroma endometrial (SEE) e adenossarcomas (AS). Embora, atualmente, os carcinossarcomas (CS), por meio de evidências moleculares e patológicas, não seja classificados como sarcomas, foram incluídos em nosso trabalho pois: 1) apresentam componente mesenquimal em sua constituição, 2) ainda são considerados na maioria dos estudos sobre sarcomas uterinos e 3) devido a sua classificação pela WHO.

Sabe-se que o estudo molecular dos eventos envolvidos no desenvolvimento do câncer tem conduzido a novas estratégias utilizadas no diagnóstico, prognóstico e no tratamento. Cada tipo histológico de sarcoma apresenta uma peculiaridade relacionada a eventos moleculares. Neste trabalho, foram avaliadas 100 pacientes, portadoras de carcinossarcoma e sarcomas uterinos, quanto à expressão do receptor de membrana HER-2 e do fator de transcrição FOXO3a (ainda não avaliado nesse tipo de tumores). Infelizmente, não pudemos incluir outras 56 casos (de um total de 156), devido à má conservação do material emblocado em parafina ou falta de informações nos prontuários das pacientes.

A análise dos dados clínicos e anatomopatológicos das pacientes mostrou que, em nossa casuística, a média de idade foi de 58 anos. Para os casos com idade menor que 50 anos, 7 (7%) eram SEE (sarcoma do estroma endometrial) e 22 (22%) LMS (leiomiossarcoma). Todas as pacientes com CS (carcinossarcoma) tinham mais de 50 anos ao diagnóstico. Segundo D'Angelo e Prat (2010), a maioria dos LMS são encontrados em mulheres com mais de 40 anos de idade, enquanto os SEE afetam mulheres relativamente jovens, geralmente com idade entre 40 e 55 anos. Outro trabalho englobando o banco de dados da SEER, no qual foram estudadas 831 pacientes com SEE, a média de idade no momento do

diagnóstico foi de 52 anos (Chan *et al.*, 2008). Enquanto a faixa de idade das pacientes com CS foi de 62 a 67 anos (Ali *et al.*, 1993; Sartori *et al.*, 1997)

Em nossa casuística, a queixa principal das pacientes foi sangramento vaginal, dado que corrobora com a literatura ao analisarmos todos os tipos histológicos de tumor, em conjunto (D'Angelo e Prat, 2010; Kobayashi *et al.*, 2013). O tratamento de escolha também foi a histerectomia (98% das pacientes), que é considerado tratamento de escolha para os sarcomas uterinos (NCCN, 2015).

Nossos resultados mostraram ocorrência de metástase em 59% casos, sendo 76% à distância. O principal sítio de metástases foram os pulmões 46%. Na literatura, está muito bem documentada a alta tendência de recorrência desses tumores, principalmente à distância (Sartori *et al.*, 1997; LIVI *et al.*, 2003; Gadducci *et al.*, 2008). A sobrevida global, em 2 anos, geralmente é menor que 50%, com metástases pela via hematogênica, principalmente, para os pulmões. Salazar e Dunne (1980) apresentaram uma série com 250 pacientes portadoras de sarcomas uterinos com 14% de recorrência pélvica e 33% à distância.

O estudo da complexa via de sinalização de HER-2 e FOXO3a mostra-se importante, uma vez que esses marcadores estão relacionados com o crescimento, a proliferação e a sobrevida celular. Além disso, diversos trabalhos mostram que a expressão das proteínas FOXO é crucial para manter a homeostase no tecido, e sua perda de atividade está associada com a formação de diversos tumores (Huang e Tindall, 2007; Maiese *et al.*, 2008). Taylor *et al.* (2015) analisaram o papel do fator transcrição FOXO3a nos tumores de mama triplo negativos. Os autores concluíram que a expressão de FOXO3a poderia servir como marcador de melhor prognóstico, especialmente em tumores positivos para o receptor de estrogênio (ER).

Quando a via de PI3K é ativada, em resposta aos fatores de crescimento, ocorre inibição da atividade de FOXO3a, impedindo sua translocação para o núcleo da célula. A perda de expressão de FOXO também está associada com pior prognóstico em diversos tipos de câncer,

incluindo neuroblastoma, adenocarcinoma gástrico e hepatocarcinoma (Yang *et al.*, 2013; Taylor *et al.*, 2015).

Apesar das evidências da regulação negativa de FOXO via HER-2, em diversos tipos de câncer, no tumor triplo negativo, essa regulação também pode ocorrer via AMPK-FOXO3a. Esses achados reforçam o potencial dessa proteína como alvo terapêutico, independente do estado do receptor HER-2 (Chiacchiera e Simone, 2010; Taylor *et al.*, 2015).

Foi observada que a expressão de FOXO3a nos casos de LMSs associou-se a maior SLD. Quando avaliamos e comparamos os gráficos de SLD entre os diferentes tipos histológicos de tumores, nota-se que as pacientes portadoras de LMS com forte expressão de FOXO3a tiveram recidiva mais tardiamente. Esses dados sugerem um potencial papel de FOXO3a como marcador de melhor prognóstico.

De acordo com Yu *et al.* (2015), pacientes portadores de câncer gástrico, com menor expressão de FOXO3a, mostraram SG significativamente menor que os com maior expressão FOXO3a. Porém, pacientes com expressão aumentada de FOXO3a no núcleo das células do tecido normal adjacente ao tumor tiveram SG significativamente menor que os demais pacientes.

Em nossa avaliação, procedemos a comparação da expressão de FOXO3a entre o miométrio normal e os tecidos tumorais (LMS,CS e SEE). Verificamos que a maioria dos casos de miométrio normal apresentam fraca ou nenhuma expressão de FOXO3a, com diferença estatisticamente significativa em relação ao tumores, que, em geral, mostraram forte expressão dessa proteína.

Esses resultados sugerem que, nos tecidos mesenquimais, a presença de expressão nuclear de FOXO3a indica perfil de malignidade do tumor ou um potencial de malignização. Outro dado que reforça essa teoria é a análise da expressão desse marcador em leiomiomas uterinos. Os dados não foram apresentados neste trabalho, mas encontramos os leiomiomas convencionais e atípicos com expressão crescente dessa proteína, em relação ao miométrio, porém menor, em comparação aos LMS.

No tocante às variáveis clínico-patológicas estudadas, registramos haver diferença estatisticamente significativa na expressão de FOXO3a entre as mulheres com mais e menos de 50 anos de idade nos LMSs. Essa divisão foi realizada a fim de avaliar separadamente as mulheres pós-menopáusicas daquelas não menopausadas. As pacientes no grupo com mais 50 anos apresentaram menor expressão nuclear de FOXO3a. Em relação a esta variável, outros trabalhos não descrevem a mesma associação com a expressão de FOXO3a, tanto para o câncer gástrico (pacientes agrupadas entre maior e menor de 65 anos) como para o câncer de ovário (Lu *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2015).

Comprovamos diferença significativa em relação ao grau histológico e à expressão de FOXO3a nos SEE; os tumores de baixo grau apresentaram menor expressão. Dado semelhante foi observado em pacientes com hepatocarcinoma, onde os autores encontraram correlação entre a expressão de FOXO3a e o grau histológico (Lu *et al.*, 2009).

Em relação à expressão de HER-2, em nossa casuística, apenas um caso (1%) apresentou expressão positiva por imunoistoquímica (3+). Foi realizada, então, a hibridização *in situ* fluorescente (FISH) para todos os casos, a fim de avaliar se havia deleção ou perda de cópias do gene nas amostras negativas. Nenhuma deleção foi observada e amplificação com razão $\geq 2,5$ foi encontrada no único caso positivo de CS por IIQ. Todos os casos de CS, com alguma amplificação, foram analisados em corte convencional por SISH para verificar os componentes epitelial e mesenquimal desses tumores. Ressaltamos que, na montagem do TMA, foi dada preferência para área mesenquimal dos tumores mistos, justificando a necessidade de utilizar cortes convencionais para o SISH. Novamente, somente o caso de CS positivo na imunoistoquímica foi positivo para a amplificação por SISH. Os demais casos amplificados foram negativos em ambos os componentes.

Segundo Bellone *et al.*(2003); Moasser (2007); e Leite *et al.*(2012), a hiperexpressão e amplificação de HER-2 ocorre no câncer de mama e nos tumores de ovário, pulmão, cólon, estômago, esôfago, endométrio e colo

uterino. A expressão de HER-2 também foi estudada nos LMS, com positividade em 20% dos casos (Layfield *et al.*, 2000). Já Amant *et al.* (2004) demonstraram ausência da expressão nos LMS, adenossarcomas e SEE. Os autores também avaliaram HER-2 em SUI e observaram hiperexpressão e amplificação do gene ERBB2 em 25% dos casos. Foram avaliados quatro casos, sendo três negativos e um positivo (2+).

Com relação aos CSs, HER-2 é descrito em diversos trabalhos como sendo expresso, mais comumente no componente carcinomatoso, com variação na expressão entre 0 e 56% (Amant *et al.*, 2004, Cimbaluk *et al.*, 2007; Livasy *et al.*, 2006; Saglam *et al.*, 2013).

Chakrabasty *et al.* (2013) relataram que a amplificação do gene HER-2 no câncer de mama está associada ao aumento da proliferação celular, invasão tumoral, metástase, aumento da angiogênese, diminuição da apoptose e resistência ao tratamento. O trastuzumab, um anticorpo monoclonal dirigido contra o domínio extracelular do receptor HER-2, tem sido amplamente utilizado para o tratamento do câncer de mama com amplificação e forte expressão de HER-2 (Burstein *et al.*, 2001; revisão em Sun Z *et al.*, 2015).

Apesar da baixa incidência de tumores expressores de HER-2 em nosso trabalho, é interessante avaliar em futuros estudos, a associação de anticorpo monoclonal à quimioterapia convencional nos casos de sarcoma e carcinosarcoma uterinos HER-2 positivos.

6 CONCLUSÕES

---

6 CONCLUSÕES

- Não houve diferenças significantes na expressão de HER-2 em amostras de sarcomas e carcinosarcomas uterinos.
- Expressão positiva de HER-2 foi observada em uma amostra de carcinosarcoma.
- A expressão de FOXO3 foi maior nos sarcomas e carcinosarcomas uterinos, em relação ao tecido miometrial.
- Observou-se amplificação de Her-2 pela técnica de FISH em 14% dos casos, a qual foi confirmada por SISH e imunoistoquímica apenas em um caso de carcinosarcoma, e exclusivamente no componente epitelial.
- A expressão protéica de FOXO3a nos leiomiossarcomas mostrou correlação com maior sobrevida livre de doença.
- Os sarcomas do estroma endometrial apresentaram diferenças significativas na expressão de FOXO3a de acordo com o grau histológico; os tumores de alto grau mostraram maior expressão.
- Com relação aos dados clínicos, houve significância estatística apenas com a idade, nas mulheres com leiomiossarcomas; aquelas com mais de 50 anos apresentaram menor expressão de FOXO3a.

7 ANEXOS

7.1 ANEXO A - Carta de aprovação do projeto no Comitê de Ética em Pesquisa CEP-FMUSP

MEDICINA

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

APROVAÇÃO

O Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em **23.11.11**, após atendimento a diligência encaminhada **APROVOU *ad-referendum*** o Protocolo de Pesquisa nº **143/11**, intitulado: **"ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS FATORES DE CRESCIMENTO EGF, VEGF, HER2 E DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO FOXO 3 EM SARCOMAS UTERINOS"**, apresentado pelo Departamento de **Obstetrícia e Ginecologia**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa .

Pesquisador (a) Responsável: Katia Candido Carvalho
Pesquisador (a) Executante: Thais Gomes de Almeida

CEP-FMUSP, 23 de novembro de 2011.

Prof. Dr. Paulo Eurípedes Marchiori
Vice-Coordenador Interino
Comitê de Ética em Pesquisa

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Av. Dr. Arnaldo, 455 – Instituto Oscar Freire 1º andar CEP 01246903 – Fone : 3061-8004
mail: cep_fmusp@hcnnet.usp.br

7.2 ANEXO B - Ficha de coleta de dados das pacientes**Ficha de coleta de dados
(sarcoma uterino)**

1. Identificação:

2. Registro hospitalar:

3. Idade:

4. Queixa principal:

5. Sangramento pós menopausa: ( ) sim ( ) não

6. Anticoncepcinal: ( ) sim ( ) não

7. TRH: ( ) sim ( ) não

8. Tabaco: ( ) sim ( ) não ( ) ex tabagista ( ) ignorado

9. Paridade: ___G___P___A

10. Patologia de base: ( ) HAS ( ) DM ( ) outras _____

11. Cirurgia realizada:

---

12. A.P (data ___/___/___) Nº Lâmina: _____.

útero: corpo _____ colo _____

ovário: D _____ E _____

tuba: D _____ E _____

omento: _____

linfonodos: _____

outros: _____

---

13. Tratamento adjuvante: ( ) não ( ) sim → ( ) RT

→ ( ) QT drogas:

sessões:

14. metástase/recidiva: ( ) sim → local _____ data ___/___/___

( ) não

15. Tratamento da metástase/recidiva: _____

---

16. Óbito: ( ) não ( ) sim data ___/___/___

17. Data da última consulta ___/___/___

7.3 - ANEXO C - Mapa de TMA - Tissue microarray- de sarcomas e carcinosarcomas uterinos

8 REFERÊNCIAS

---

8 REFERÊNCIAS

1. Abeler VM, Royne O, Thoresen S, Danielsen HE, Nesland JM, Kristensen GB. Uterine sarcomas in Norway. A histopathological and prognostic survey of a total population from 1970 to 2000 including 419 patients. *Histopathology*. 2009;54(3):355-64.
2. Ali S, Wells M. Mixed mullerian tumors of the uterine corpus - a review. *Int J Gynecol Cancer*. 1993;3(1):1-11.
3. Amant F, Coosemans A, Debiec-Rychter M, Timmerman D, Vergote I. Clinical management of uterine sarcomas. *Lancet Oncol*. 2009;10(12):1188-98.
4. Amant F, Vloeberghs V, Woestenborghs H, Debiec-Rychter M, Verbist L, Moerman P, *et al*. ERBB-2 gene overexpression and amplification in uterine sarcomas. *Gynecol Oncol*. 2004;95(3):583-7.
5. Ayhan A, Aksan G, Gultekin M, Esin S, Himmetoglu C, Dursun P, *et al*. Prognosticators and the role of lymphadenectomy in uterine leiomyosarcomas. *Arch Gynecol Obstetr*. 2009;280(1):79-85.
6. Begnami MDFS, Soares FA. O diagnóstico do câncer no laboratório de patologia. In: Brentani MM, Coelho FRG, Kawdski LP. *Bases da oncologia*. 2º Ed. Editora Maria e Tec Medd. São Paulo. Brasil; 2003.
7. Bellone S, Palmieri M, Gokden M, Joshua J, Roman JJ, Pecorelli S, *et al*. Selection of HER-2/neu-positive tumor cells in early stage cervical cancer: implications for Herceptin-mediated therapy. *Gynecol Oncol*. 2003;91(1):231-40.
8. Bodner K, Bodner-Adler B, Obermair A, Windbichler G, Petru E, Mayerhofer S, *et al*. Prognostic parameters in endometrial stromal sarcoma: A clinicopathologic study in 31 patients. *Gynecol Oncol*. 2001;81(2):160-5.
9. Burstein HJ, Kuter I, Campos SM, Gelman RS, Tribou L, Parker LM, *et al*. Clinical activity of trastuzumab and vinorelbine in women with HER-2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2001;19(10):2722-30.
10. Calnan DR, Brunet A. The FOXO code. *Oncogene*. 2008;27(16):2276-88.

11. Celestino JJ. Fator de crescimento epidermal como mediador de sobrevivência e desenvolvimento folicular. *Rev Bras Reprod Anim.* 2012;36(3):148-57.
12. Chakrabarty A, Bhola NE, Sutton C, Ghosh R, Kuba MG, Dave B, et al. Trastuzumab-resistant cells rely on a HER-2-PI3K-FOXO-survivin axis and are sensitive to PI3K inhibitors. *Cancer Res.* 2013;73(3):1190-200.
13. Chan JK, Kavar NM, Shin JY, Osann K, Chen LM, Powell CB, et al. Endometrial stromal sarcoma: a population-based analysis. *Br J Cancer.* 2008;99(8):1210-5.
14. Chiacchiera F, Simone C. The AMPK-FOXO3A axis as a target for cancer treatment. *Cell Cycle.* 2010;9(6):1091-6.
15. Chu CS, Lin LL, Rubin SC. Cancer of the uterine body. In: DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA. *Cancer principles & practice of oncology*, 8th Ed. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins, 2008. pp 1543-63.
16. Cimbaluk D, Rotmensch J, Scudiere J, Gown A, Bitterman P. Uterine carcinosarcoma: Immunohistochemical studies on tissue microarrays with focus on potential therapeutic targets. *Gynecol Oncol.* 2007;105(1):138-44.
17. Citri A, Yarden Y. EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(7):505-16.
18. Conklin CMJ, Longacre TA. Endometrial stromal tumors: the new WHO classification. *Adv Anat Pathol.* 2014;21(6):383-93.
19. Cotran RS, Kumar V, Collins T. *Robbins pathologic basis of disease*. 6th USA: Ed. Saunders Company; 1999.
20. D'Angelo E, Prat J. Uterine sarcomas: a review. *Gynecol Oncol.* 2010;116(1):131-9.
21. D'Angelo E, Spagnoli LG, Prat J. Comparative clinicopathologic and immunohistochemical analysis of uterine sarcomas diagnosed using the World Health Organization classification system. *Human Pathol.* 2009;40(11):1571-85.
22. Davidson B, Abeler VM, Hellesylt E, Holth A, Shih IM, Skeie-Jensen T, et al. Gene expression signatures differentiate uterine endometrial stromal sarcoma from leiomyosarcoma. *Gynecol Oncol.* 2013;128(2):349-55.
23. DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA. *Primer of the molecular biology of cancer. Cancer principles & practice of oncology*. Ed. Wolters Kluwer Health; 2011.

24. Disaia PJ, Creasman WT. *Clinical gynecologic oncology*. 7th Edition, Mosby Publishers, Philadelphia, PA; 2007.
25. Dizon DS, Birrer MJ. Advances in the diagnosis and treatment of uterine sarcomas. *Discov Med*. 2014;96:339-45.
26. El-Khalfaoui K, du Bois A, Heitz F, Kurzeder C, Sehouli J, Harter P. Current and future options in the management and treatment of uterine sarcoma. *Ther Adv Med Oncol*. 2014;6(1):21-8.
27. Ferguson PC, Deheshi BM, Chung P, Catton CN, O'Sullivan B, Gupta A, *et al*. Soft tissue sarcoma presenting with metastatic disease. *Cancer*. 2011;117(2):372-9.
28. Ferguson SE, Tornos C, Hummer A, Barakat RR, Soslow RA. Prognostic features of surgical stage I uterine carcinosarcoma. *American J Surg Pathol*. 2007;31(11):1653-61.
29. Freitas CS. Estendendo o conhecimento sobre a família HER-receptores para o fator de crescimento epidérmico e seus ligantes às malignidades hematológicas. *Rev Bras Cancerol*. 2008; 54(1): 79-86.
30. Gadducci A, Cosio S, Romanini A, Genazzani AR. The management of patients with uterine sarcoma: A debated clinical challenge. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2008;65(2):129-42.
31. Gadducci A. Prognostic factors in uterine sarcoma. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2011;25(6):783-95.
32. Garcia-Martinez E, Prefasi LE, Garcia-Donas J, Escolar-Perez PP, Pastor F, Gonzalez-Martin A. Current management of uterine sarcomas. *Clin Transl Oncol*. 2011;13(5):307-14.
33. George M, Pejovic MH, Kramar A. Uterine sarcomas - prognostic factors and treatment modalities - study on 209 patients. *Gynecol Oncol*. 1986;24(1):58-67.
34. Gill PG (trad. Figueiredo MTA). Sarcoma de partes moles. In: *Manual de oncologia clínica*. 6^o ed. Ed. Springer-Verlag UICC. Fundação Oncocentro de São Paulo, 1999.
35. GLOBOCAN 2012. Estimated cancer incidence mortality and prevalence worldwide in 2012 [31 ago 2015]. WHO. Internacional Agency for research on cancer. Available from: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>.
36. Greer BE, Koh WJ, Abul-Rustum N, Bookman MA, Bristow RE, Campos SM, *et al*. Uterine neoplasms. NCCN. clinical practice guidelines in oncology. Version 1. 2011 [20 abr 2014]. Available from: www.nccn.org.

37. Guzzo F, Bellone S, Buza N, Hui P, Carrara L, Varughese J, *et al.* HER-2/neu as a potential target for immunotherapy in gynecologic carcinosarcomas. *Int J Gynecol Pathol.* 2012;31(3):211-21.
38. Hensley ML. Uterine/female genital sarcomas. *Curr Treat Options Oncol.* 2000;1(2):161-8.
39. Histologia e epitélio [31 ago 2015]. Disponível em: www.sobiologia.com.br/conteudos/Histologia/epitelio.php.
40. Huang HJ, Tindall DJ. Dynamic FOXO transcription factors. *J Cell Sci.* 2007;120(15):2479-87.
41. Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer: The complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer.* 2005;5(5):341-54.
42. Iwasaki S, Sudo T, Miwa M, Ukita M, Morimoto A, Tamada M, *et al.* Endometrial stromal sarcoma: clinicopathological and immunophenotypic study of 16 cases. *Arch Gynecol Obstetr.* 2013;288(2):385-91.
43. Kaestner KH, Knochel W, Martinez DE. Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes Dev.* 2000;14(2):142-6.
44. Kaku T, Silverberg SG, Major FJ, Miller A, Fetter B, Brady MF. adenosarcoma of the uterus - a gynecologic oncology group clinicopathological study of 31 cases. *Int J Gynecol Pathol.* 1992;11(2):75-88.
45. Kapp DS, Shin JY, Chan JK. Prognostic factors and survival in 1396 patients with uterine leiomyosarcomas - emphasis on impact of lymphadenectomy and oophorectomy. *Cancer.* 2008;112(4):820-30.
46. Kobayashi H, Uekuri C, Akasaka J, Ito F, Shigemitsu A, Koike N, *et al.* The biology of uterine sarcomas: a review and update. *Mol Clin Oncol.* 2013;1(4):599-609.
47. Kobayashi H, Uekuri C, Akasaka J, Ito F, Shigemitsu A, Koike N, *et al.* The biology of uterine sarcomas: a review and update. *Mol Clin Oncol.* 2013;1(4):599-609.
48. Kowalewska M, Danska-Bidzinska A, Bakula-Zalewska E, Bidzinski M. Identification of suitable reference genes for gene expression measurement in uterine sarcoma and carcinosarcoma tumors. *Clin Biochem.* 2012;45(4-5):368-71.

49. Krivak TC, Seidman JD, McBroom JW, MacKoul PJ, Aye LM, Rose GS. Uterine adenosarcoma with sarcomatous overgrowth versus uterine carcinosarcoma: Comparison of treatment and survival. *Gynecol Oncol*. 2001;83(1):89-94.
50. Kurman RJ; Carcangiu ML; Herrington CS; Young RH. *WHO classification of tumours of female reproductive organs*; Genebra: World Health Organization; 2014
51. Layfield LJ, Liu K, Dodge R, Barsky SH. Uterine smooth muscle tumors - Utility of classification by proliferation, ploidy, and prognostic markers versus traditional histopathology. *Arch Pathol Lab Med*. 2000;124(2):221-7.
52. Lee CH, Nucci MR. Endometrial stromal sarcoma - the new genetic paradigm. *Histopathology*. 2015;67(1):1-19.
53. Leite ABVG, Costa JVG, Callado RB, Torres JNL, Lima RCP Jr, Ribeiro RA. Receptores tirosina-quinase: implicações terapêuticas no câncer receptor tyrosine kinases: therapeutic implications in cancer. *Rev Bras Oncol Clin*. 2012;8(29):130-42.
54. Lin K, Dorman JB, Rodan A, Kenyon C. daf-16: An HNF-3/forkhead family member that can function to double the life-span of *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 1997;278(5341):1319-22.
55. Livasy CA, Reading FC, Moore DT, Boggess JF, Lininger RA. EGFR expression and HER-2/neu overexpression/amplification in endometrial carcinosarcoma. *Gynecol Oncol*. 2006;100(1):101-6.
56. Livi L, Paiar F, Shah N, Blake P, Villanucci A, Amunni G, et al. Uterine sarcoma: Twenty-seven years of experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2003;57(5):1366-73.
57. Lu M, Ma J, Xue W, Cheng C, Wang Y, Zhao Y, et al. The expression and prognosis of FOXO3a and Skp2 in human hepatocellular carcinoma. *Pathol Oncol Res*. 2009;15(4):679-87.
58. Lu M, Zhao Y, Xu F, Wang Y, Xiang J, Chen D. The expression and prognosis of FOXO3a and Skp2 in human ovarian cancer. *Med Oncol*. 2012;29(5):3409-15.
59. Maiese K, Chong ZZ, Shang YC. OutFOXOing disease and disability: the therapeutic potential of targeting FOXO proteins. *Trends Mol Med*. 2008;14(5):219-27.
60. Moasser MM. The oncogene HER-2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene*. 2007;26(45):6469-87.

61. Nam JH. Surgical treatment of uterine sarcoma. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2011;25(6):751-60.
62. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines). Uterine neoplasm. Version 2.2015 [31 ago 2015]. Available from: http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/uterine.pdf
63. Nordal RR, Thoresen SO. Uterine sarcomas in Norway 1956-1992: Incidence, survival and mortality. *Eur J Cancer*. 1997;33(6):907-11.
64. Novetsky AP, Powell MA. Management of sarcomas of the uterus. *Curr Opin Oncol*. 2013;25(5):546-52.
65. Nucci RN, Oliva E. Diagnostic pathology. Gynecological. Amirsys Publishing, Inc. 2014.
66. Ogg S, Paradis S, Gottlieb S, Patterson GI, Lee L, Tissenbaum HA, et al. The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in C-elegans. *Nature*. 1997;389(6654):994-9.
67. O'Neill CJ, McBride HA, Connolly LE, McCluggage WG. Uterine leiomyosarcomas are characterized by high p16, p53 and MIB1 expression in comparison with usual leiomyomas, leiomyoma variants and smooth muscle tumours of uncertain malignant potential. *Histopathology*. 2007;50(7):851-8.
68. Perri T, Korach J, Sadetzki S, Oberman B, Fridman E, Ben-Baruch G. Uterine Leiomyosarcoma: Does the Primary Surgical Procedure Matter? *Int J Gynecol Cancer*. 2009;19(2):257-60.
69. Prat J. Classification and staging of endometrial sarcomas: One disease or two different tumor types? *Gynecol Oncol*. 2010;118(1):1-2.
70. Prat J. FIGO staging for uterine sarcomas. *Int J Gynecol Obstetr*. 2009;104(3):177-8.
71. Quade BJ, Wang TY, Sornberger K, Dal Cin P, Mutter GL, Morton CC. Molecular pathogenesis of uterine smooth muscle tumors from transcriptional profiling. *Genes Chromosomes Cancer*. 2004;40(2):97-108.
72. Raspollini MR, Susini T, Amunni G, Paglierani M, Taddei A, Marchionni M, et al. COX-2, c-KIT and HER-2/neu expression in uterine carcino sarcomas: prognostic factors or potential markers for targeted therapies? *Gynecol Oncol*. 2005;96(1):159-67.
73. Renard G, Chies JM. *Biologia molecular da célula*. Artmed, Porto Alegre; 2010.

74. Roskoski R. The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;319(1):1-11.
75. Rossi BM, Pinho M. Genética e biologia molecular para o cirurgião. São Paulo: Editora Lemar; 1999.
76. Saglam O, Husain S, Toruner G. AKT, EGFR, C-ErbB-2, and C-Kit Expression in Uterine Carcinosarcoma. *Int J Gynecol Pathol*. 2013;32(5):493-500.
77. Saglam O, Husain S, Toruner G. AKT, EGFR, C-ErbB-2, and C-Kit Expression in Uterine Carcinosarcoma. *Int J Gynecol Pathol*. 2013;32(5):493-500.
78. Salazar OM, Dunne ME. The role of radiation-therapy in the management of uterine sarcomas. *Int J Radiat Oncol Biol Physics*. 1980;6(7):899-902.
79. Sartori E, Bazzurini L, Gadducci A, Landoni F, Lissoni A, Maggino T, et al. Carcinosarcoma of the uterus: a clinicopathological multicenter CTF study. *Gynecol Oncol*. 1997;67(1):70-5.
80. Sawada M, Tsuda H, Kimura M, Okamoto S, Kita T, Kasamatsu T, et al. Different expression patterns of KIT, EGFR, and HER-2 (c-erbB-2) oncoproteins between epithelial and mesenchymal components in uterine carcinosarcoma. *Cancer Science*. 2003;94(11):986-91.
81. Seddon BM, Davda R. Uterine sarcomas-Recent progress and future challenges. *Eur J Radiol*. 2011;78(1):30-40.
82. Siegel R, Ma JM, Zou ZH, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin*. 2014;64(1):9-29.
83. Silva CMG, Faustino LR, Celestino JJH, Rodrigues APR, Figueiredo JR. Família fator de crescimento epidermal e seu papel na função ovariana e desenvolvimento embrionário. *Acta Vet Brasílica*. 2010;4(4):215-26.
84. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human-breast cancer - correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2 neu oncogene. *Science*. 1987;235(4785):177-82.
85. Sun Z, Shi Y, Shen Y, Cao L, Zhang W, Guan X. Analysis of different HER-2 mutations in breast cancer progression and drug resistance. *J Cell Mol Med*. 2015 Aug 25. doi: 10.1111/jcmm.12662. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 26305917.
86. Sutton G. Uterine sarcomas 2013. *Gynecol Oncol*. 2013;130(1):3-5.

87. Swisher EM, Gown AM, Skelly M, Ek M, Tamimi HK, Cain JM, *et al.* The expression of epidermal growth factor receptor, HER-2/neu, p53, and Ki-67 antigen in uterine malignant mixed mesodermal tumors and adenosarcoma. *Gynecol Oncol.* 1996;60(1):81-8.
88. Tavassoli FA, Devilee P. *Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs.* Lyon: IARC Press; 2003.
89. Taylor S, Lam M, Pararasa C, Brown JEP, Carmichael AR, Griffiths HR. Evaluating the evidence for targeting FOXO3a in breast cancer: a systematic review. *Cancer Cell Int.* 2015;15:9.
90. Thomas DB. The WHO collaborative study of neoplasia and steroid-contraceptives - the influence of combined oral-contraceptives on risk of neoplasms in developing and developed-countries. *Contraception.* 1991;43(6):695-710.
91. Toro JR, Travis LB, Wu HJ, Zhu K, Fletcher CDM, Devesa SS. Incidence patterns of soft tissue sarcomas, regardless of primary site, in the surveillance, epidemiology and end results program, 1978-2001: an analysis of 26,758 cases. *Int J Cancer.* 2006;119(12):2922-30.
92. Trope CG, Abeler VM, Kristensen GB. Diagnosis and treatment of sarcoma of the uterus. A review. *Acta Oncol.* 2012;51(6):694-705.
93. Vorgias G, Fotiou S. The role of lymphadenectomy in uterine carcinosarcomas (malignant mixed mullerian tumours): a critical literature review. *Arch Gynecol Obstetr.* 2010;282(6):659-64.
94. Wang X, Batty KM, Crowe PJ, Goldstein D, Yang JL. The potential of panHER inhibition in cancer. *Front Oncol.* 2015 Jan 28;5:2.
95. Weigel D, Jurgens G, Kuttner F, Seifert E, Jackle H. The homeotic gene fork head encodes a nuclear-protein and is expressed in the terminal regions of the drosophila embryo. *Cell.* 1989;57(4):645-58.
96. Wickerham DL, Fisher B, Wolmark N, Bryant J, Costantino J, Bernstein L, *et al.* Association of tamoxifen and uterine sarcoma. *J Clin Oncol.* 2002;20(11):2758-60.
97. Wolff AC, Hammond MEH, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, *et al.* American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2007;25(1):118-45.
98. Wysowski DK, Honig SF, Beitz J. Uterine sarcoma associated with tamoxifen use. *New Engl J Med.* 2002;346(23):1832-3.

99. Yang JY, Hung MC. A new fork for clinical application: targeting forkhead transcription factors in cancer. *Clin Cancer Res.* 2009;15(3):752-7.
100. Yang XB, Zhao JJ, Huang CY, Wang QJ, Pan K, Wang DD, et al. Decreased expression of the FOXO3a gene is associated with poor prognosis in primary gastric adenocarcinoma patients. *Plos One.* 2013;8(10):8.
101. Yim GW, Nam EJ, Kim SW, Kim YT. FIGO staging for uterine sarcomas: can the revised 2008 staging system predict survival outcome better? *Yonsei Med J.* 2014;55(3):563-9.
102. Yu S, Yu YY, Sun YH, Wang XF, Luo RK, Zhao NQ, et al. Activation of FOXO3a suggests good prognosis of patients with radically resected gastric cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(3):2963-70.
103. Zelmanowicz A, Hildesheim A, Sherman ME, Sturgeon SR, Kurman RJ, Barrett RJ, et al. Evidence for a common etiology for endometrial carcinomas and malignant mixed mullerian tumors. *Gynecol Oncol.* 1998;69(3):253-7.
104. Zeng ZH, Samudio IJ, Zhang WG, Estrov Z, Pelicano H, Harris D, et al. Simultaneous inhibition of PDK1/AKT and Fms-like tyrosine kinase 3 signaling by a small-molecule KP372-1 induces mitochondrial dysfunction and apoptosis in acute myelogenous leukemia. *Cancer Res.* 2006;66(7):3737-46.

9 APÊNDICES

Clinical and molecular features of uterine sarcomas

Thais Gomes de Almeida,¹ Isabela Werneck da Cunha,^{1,III} Gustavo A R Maciel,¹ Edmund Chada Baracat,¹ Kátia Candido Carvalho¹

¹Laboratório de Ginecologia Estrutural e Molecular (LIM-58), Disciplina de Ginecologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Brazil

^{II}Anatomic Pathology Department, AC Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil ^{III}Hospital A C Camargo, Cancer Center, São Paulo, Brazil

INTRODUCTION: Uterine sarcomas are rare forms of malignant neoplasm, comprising about 3% of all malignant uterine tumors, representing less than 1% of all gynecologic malignancies. Low cure rates often occur due mainly to distant metastases, usually to the lungs. Aggressiveness, high rates of local recurrence, distant metastasis and poor prognosis with overall two-year survival less than 50% are common features of uterine sarcomas. Despite the low prevalence, these tumors are of great interest because of their multiple morphological and clinical features.

OBJECTIVE: This article will be focused on the uterine sarcomas general aspects, etiology, prognosis, treatment and molecular features.

METHOD: This review was performed using the Pubmed database to search for published articles.

RESULTS: Little is known about the etiology of uterine sarcomas. Some studies have demonstrated the association between genetic events involving mutations in genes of the cell cycle and apoptosis and epigenetic in gynecologic sarcomas. Previous studies showed that chromosomal translocations have been identified, resulting in fusion genes that are constitutive and might involve the activation of transcription factors. Advances in molecular techniques have improved the diagnostic possibilities and allowed an improved understanding of the various pathologies.

CONCLUSIONS: There are several factors that make the study of sarcomas a challenging issue, since those tumors are rare and the cell origin of each histologic type is not well known. Thus, molecular study of the events involved in the development of different types of cancer may lead to new strategies used in the diagnosis and treatment of these tumors.

KEYWORDS: uterine sarcoma; molecular features; prognostic factors.

de Almeida TG, da Cunha IW, AR Maciel G, Baracat EC, Carvalho KC. Clinical and molecular features of uterine sarcomas. MEDICALEXPRESS. 2014;1(6):291-297.

Received for publication on July 24 2014; First review completed on August 17 2014; Accepted for publication on September 10 2014

Email: carvalhokc@gmail.com

■ INTRODUCTION

Mesenchymal tumors develop in the connective tissue of mesodermal origin and display high histological and cytogenetic heterogeneity.¹⁻² Sarcomas are malignant tumors that develop in the soft tissues,² may have different origins and can occur in any site within the body.¹⁻³ They are histologically classified according to tissue differentiation;^{3,4} diagnosis is difficult and is based on the histological type and grade of the tumor, as is the treatment.⁴

Uterine sarcomas are uncommon entities that present different histological types. Their histopathological classification and staging were reviewed in 2003 and 2009, respectively. According to the World Health Organization,⁵ uterine sarcomas consist of two main groups: mesenchymal tumors and mixed tumors. Pure mesenchymal tumors can be classified into endometrial stromal sarcoma, leiomyosar-

coma, and undifferentiated uterine sarcoma. Mixed tumors include carcinosarcoma and adenosarcoma⁶.

The carcinosarcoma, also called malignant mixed Müllerian tumors, though previously classified as a sarcoma, has now been redefined as a carcinoma. So its management has also changed to that used for high grade endometrial carcinoma; therefore, it should not be included in a study of uterine sarcomas. However, most retrospective sarcoma studies still include carcinosarcomas.³⁻⁶

This article will focus on the general aspects, etiology, prognosis, treatment, and molecular methods of study for uterine sarcomas, including some features of carcinosarcomas.

■ METHODS

The bibliographic search was performed using Pubmed databases for relevant articles dated from January 1, 2000 to march 31, 2014. Six articles published before 2000 were also included because they are specially interesting to the theme.

DOI: 10.5935/MedicalExpress.2014.06.02

The following keywords were used: uterine sarcoma, gynecological tumors, uterine smooth muscle tumors, molecular features and prognostic factors.

■ RESULTS

After completing the articles search we found a total of 53,006 articles. For uterine sarcoma we found 5,683 reports; for gynecological tumors, 45,851; for uterine smooth muscle tumors, 1,245; molecular features and sarcomas, 36; prognostic factors and sarcomas, 191. We selected for this review 62 studies that include molecular and prognostic features of gynecological sarcomas. They were selected and evaluated by three different researchers and are commented below.

Histological classification of uterine sarcomas

Uterine sarcomas can originate from both endometrial stroma and uterine muscle. When the endometrial stroma undergoes malignant transformation, the resulting tumor is called a high-grade endometrial stromal sarcoma (currently called an undifferentiated endometrial sarcoma).^{5,7} An adenosarcoma is characterized by a combination of malignant stromal components and benign epithelial components. Tumors formerly known as low-grade stromal sarcoma are currently known as endometrial stromal sarcoma. Tumors that originate from the malignant transformation of the smooth muscle tissue are known as leiomyosarcoma.^{6,7}

Endometrial stromal sarcomas were previously classified into low- and high-grade endometrial stromal sarcomas. Currently, the term “endometrial stromal sarcoma” is restricted to “low-grade” tumors, while high-grade tumors are known as undifferentiated sarcomas. Endometrial stromal sarcomas behave in a relatively indolent manner and present late recurrences; distant metastasis may occur, but long-term survival and cure are possible following the surgical resection of recurrent or metastatic lesions.⁵

The main prognostic factors are the tumor-free resection margin, followed by determination of the malignancy grade, tumor diameter, and menopausal status.^{7–11}

An undifferentiated sarcoma is defined as a high-grade malignant tumor of mesenchymal origin. These tumors often exhibit pleomorphic cells with a high mitotic index.^{10,11} Stage I patients present a 5 year survival rate of 57%, and all patients in more advanced stages die within 5 years. Vascular invasion is the only statistically significant prognostic factor, with 5 year survival rates of 83% and 17% in the absence and presence of vascular invasion, respectively.^{11,12}

Adenosarcomas consist of benign epithelial components and homologous or heterologous mesenchymal sarcomatous components; they are more common in postmenopausal women. However, these tumors can also occur in adolescents and young adults, and they comprise 5.5 to 9.0% of all uterine sarcomas.¹² Usually, adenosarcomas involve only the endometrium, with myometrial invasion regarded as an exception. These rare tumors have low malignant potential; they are polypoid and contain small internal cysts. Most cases present with a low-grade histological diagnosis.^{2–8}

Stage I patients show 5 and 10 year survival rates of 76% and 61%, respectively. Tumor cell necrosis is the most important histopathological prognostic factor, although women with overgrowth tumors present similar prognoses to women with carcinosarcoma (> 50% mortality).^{13,14}

Leiomyosarcomas develop in the muscle layer of the uterus, the myometrium. Generally, a significant increase in uterine volume is observed, and pain and bleeding may occur in some cases. These tumors spread primarily via a hematogenous route, and metastases occur mainly in the lungs and liver.^{3–8} The absence of residual tumors after surgery and the tumor size are the 2 most important prognostic factors for survival among patients with leiomyosarcoma.¹² For tumors smaller than 5 cm in diameter, the overall survival is estimated to be 86%, but survival is reduced to 18% for tumors larger than 10 cm.¹⁵

Leiomyosarcomas usually occur in the 6th decade of life and, in general, the tumors are large and single, with extensive areas of necrosis. Currently, it is believed that the majority of leiomyosarcomas arise independently, although some investigators believe they transform from pre-existing leiomyomas.³

The histological criteria for the diagnosis of a Leiomyosarcoma include high a mitotic index (MI), cellular atypia, and extensive tumor cell necrosis. Patients can be classified into 3 risk groups: low (tumor <10 cm in diameter and MI <10), intermediate (tumor >10 cm in diameter or MI >10), and high risk (tumor >10 cm in diameter and MI >10).^{12,16} The differential diagnosis is performed in relation to the multiple variants of leiomyomas and the smooth muscle tumors of uncertain malignant potential). It is estimated that 0.2% of leiomyosarcoma cases are diagnosed during fibroid removal surgery. Ganglionic metastases are uncommon and occur in 3 to 9% of cases.¹⁶ Histologically, these neoplasms may present as conventional, epithelioid, or myxoid leiomyosarcoma.^{5,6}

Carcinosarcomas have been addressed as epithelial tumors based on molecular aspects and their differing behavior in response to therapy. They tend to be more aggressive, often spreading to lymph nodes and presenting distant metastases to the liver and lungs.^{3,8,12} Affected patients may present increased expression of CA-125.⁵

Clinical, pathological, and molecular evidence indicates that most of the uterine carcinosarcomas are of monoclonal origin and undergo epithelial and mesenchymal differentiation during their development. Some studies suggest that these tumors are indeed carcinomas with sarcomatous metaplasia, where the sarcomatous components were obtained as a result of dedifferentiation.^{5,6} The behavior and surgical staging of these tumors is similar to high-grade endometrial adenocarcinomas. Lymph node involvement occurs in 14% to 38% of cases, and they respond better to chemotherapy than sarcomas.^{17,18}

There are other types of sarcomas, but they are very rare neoplasias. Embryonal rhabdomyosarcomas are often observed in young patients and can be found in several gynecological location.¹⁹ Angiosarcoma, liposarcoma, rhabdomyosarcoma variants, alveolar soft part sarcoma, osteosarcoma and others are observed in older patients.⁶

Epidemiology and etiology

Uterine sarcomas are rare forms of malignant neoplasms comprising 3 to 9% of all malignant uterine tumors and less than 1% of all gynecologic malignant neoplasms.^{4,5,8} Sarcomas comprised approximately 5–6% of the 49,560 cases of uterine cancer occurring in the United States in 2013. The contribution of these cases to the projected 8,190 annual deaths, however, approaches 30%.²⁰ These tumors mainly affect women aged between 40 and 60 years. Although rare,

these tumors are of great interest due to their multiple morphological and clinical features.⁸⁻²⁰

Approximately 2,400 new cases of uterine sarcoma were registered in the United States (USA) in 2003, representing less than 10% of new uterine cancer cases diagnosed in the country and 7% of sarcoma cases.²¹ According to American Cancer Society, about 52,630 new cases of cancer of the uterine corpus will be diagnosed in 2014, but only about 1,600 of these cases will be uterine sarcomas.²²

Abeler et al. published a population-based study including a histopathologic review of all uterine sarcomas registered in Norway from 1970 to 2000 using the 2003 WHO classification.¹⁰ After exclusion of carcinosarcoma, the frequencies of the different histological types were as follows: leiomyosarcoma 63%, endometrial stromal sarcoma 21%, undifferentiated uterine sarcoma 6%, adenosarcoma 6%, and other types 5%. As previously mentioned, carcinosarcomas are not currently considered to be sarcomas, but rather metaplastic carcinomas (i.e., type II endometrial carcinoma with areas of sarcomatous metaplasia). Based on the current classification, the most common uterine sarcoma is leiomyosarcoma.^{4,5}

Little is known about the etiology of uterine sarcomas. Chromosomal translocations have been identified in a large number of uterine sarcomas, resulting in the fusion of constitutive genes that activate transcription factors.⁵ Endometrial stromal sarcomas have specific somatic mutations, while leiomyosarcomas present mutations and overexpression of genes important for cell cycle control. Furthermore, it is assumed that leiomyomas may undergo sarcomatous degeneration at a rate between 0.1 and 0.8%.²³

The incidence of uterine sarcomas among black women is twice as high as that in white women.²⁴ Brooks et al. showed that the differences in the incidence of uterine sarcomas between black and white women were restricted to leiomyosarcomas. These authors also observed that 54% of white women and 45% of black women presented with early-stage disease (a significant difference, $p = .001$), and that white women presented an equally significantly higher five-year survival rate (53% vs. 42%, $p = .001$).²¹

A history of previous pelvic radiation was identified as a risk factor for the development of sarcomas.¹⁶ Some evidence indicates that exposure to radiation can increase the risk for carcinosarcoma. Another risk factor for the development of carcinosarcoma and endometrial stromal sarcoma is exposure to estrogen, suggesting similarities in the pathogenesis of these two tumors with endometrial carcinoma.^{5,6,25}

Recently, the use of tamoxifen in postmenopausal women was associated with the development of endometrial cancer and other uterine sarcomas.^{26,27} An increased incidence of leiomyosarcoma and undifferentiated uterine sarcoma has been described. Thus, it is suggested that patients treated with this drug should be followed up with pelvic examinations and submitted to biopsies if abnormal uterine bleeding occurs.^{3,12} Oral contraceptives increase the risk of leiomyosarcoma, and women who have smoked cigarettes present reduced risks of leiomyosarcoma and endometrial stromal sarcoma.²⁸

Clinical presentation and prognosis

The most commonly observed symptoms in these neoplasms are abnormal uterine bleeding, abdominal or pelvic mass (uterus with rapid growth), and pain by

compression or invasion of adjacent structures. Compared to the most common types of uterine cancer, women with sarcomas have a poor prognosis.^{5,6,12}

Uterine sarcomas exhibit fleshy growth with areas of hemorrhage and necrosis. These tumors grow in an exophytic pattern within the endometrial cavity, which may cause uterine bleeding and pain. Leiomyosarcoma may be suspected when increased uterus size is observed in postmenopausal women who are not taking hormone replacement therapy. The frequency of these tumors in patients with uterine fibroids is less than 1%, but it increases with age.²⁹

Aggressiveness, high rates of local recurrence, distant metastasis, and poor prognosis, with an overall two-year survival rate less than 50%, are common characteristics of uterine sarcomas.³⁰ The hematogenous route is the preferred route of metastasis, and metastases to the lungs are the most common. Other sites include the liver, bone, and brain.¹²

In general, uterine sarcomas have a poor prognosis, with estimated five-year survival rates between 17% and 54%, and this has remained unchanged over the past 20 years. Only endometrial stromal sarcomas present a better survival rate (approximately 69%) over 5 years.^{8,12} As mentioned earlier, these tumors are characterized by rapid and aggressive growth and frequent lymphatic or hematogenous metastasis. Surgical staging is still the most important prognostic variable.³¹

Other determining factors of the prognosis in patients with uterine sarcoma are histological type, histological grade, and stage of disease. Low-grade sarcomas, such as the endometrial stromal sarcoma, present better clinical outcomes and survival rates.³⁻⁹

The estimated overall five-year survival rate by type of uterine sarcoma in patients with tumors localized to the uterus is 84% for endometrial stromal sarcoma, 51% for leiomyosarcoma, 76% for adenosarcoma, 57% for undifferentiated uterine sarcoma, and 43% for other types.¹⁰ The cure rate is low, even in localized disease, due to distant metastases, usually to the lungs.^{11,12,15}

Clinical diagnosis, staging and treatment of uterine sarcomas

Sarcomas can invade tissues adjacent to the primary tumor and spread to other organs, creating secondary tumors that are similar to the primary tumor. The tumor grade is determined by evaluation of the cancer and abnormal cells, and the degree of malignancy predicts the likelihood that the tumor will grow and how fast it will spread.³³

Microscopically, sarcomas can be divided into low-grade (G1) and high-grade (G2, G3, and G4) tumors. G1 tumors present well-differentiated lesions, few mitotic figures, few atypical cells, minimal or no necrosis, no vascular invasion, and production of reasonable levels of mature matrix. High-grade tumors are poorly differentiated, present frequent mitoses, a considerable number of atypical cells, necrosis, sparse and immature matrix, and vascular invasion; their cells often spread to other organs of the body.^{1,3,4,33} A new staging system for uterine sarcomas was proposed by the International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) in 2009.³⁴

When a diagnosis of uterine sarcoma is suspected, the pretreatment evaluation should include a history and complete physical examination that includes gynecological and rectal exams. Studies have shown that curettage aided

the diagnosis in 70% of endometrial stromal sarcoma cases but only in 30% of leiomyosarcoma.^{3,12}

Transvaginal ultrasound is the standard imaging technique, but magnetic resonance imaging (MRI) of the pelvis optimizes image evaluation of invasion into adjacent structures of the pelvis.³⁵ Evaluation of the spread of extra-pelvic structures should be performed by computed tomography of the thorax and abdomen.³⁶ The distant spread of sarcomas often involves the lungs. Tomography of the thorax is highly sensitive for the detection of pulmonary metastases. In the case of recurrence, a systemic evaluation to define the approach may be performed by positron emission tomography (PET SCAN) if necessary.³⁵ Although several features at ultrasonography and magnetic resonance imaging (MRI) can raise suspicion of a uterine sarcoma, there are no pathognomonic features on any imaging technique.³⁶

Complete staging includes cytology and a biopsy of any suspicious areas of metastasis, as is the case for other intra-abdominal gynecologic malignancies. The tumor-free resection margin is recommended and has great importance.¹⁵

The standard procedure for uterine sarcoma treatment is surgery. Currently, hysterectomy with a localized disease resection is the gold standard. A total abdominal hysterectomy with bilateral salpingo-oophorectomy is the standard surgical treatment.³⁶ Total hysterectomy is essential when a uterine sarcoma is suspected, and it may be curative if the tumor is confined to the uterus. In the case of a preoperative diagnosis of endometrial stromal sarcoma, a radical hysterectomy is recommended due to the frequent involvement of the parametrium, which sometimes only presents invasion in the intravascular space.¹⁵

The roles of cytoreduction, lymphadenectomy, conservation of the ovaries – in young patients – for the preservation of fertility and adjuvant treatment are controversial in these tumors and vary with histology, staging, and patient age.^{37,38}

Because endometrial stromal sarcoma is an estrogen-dependent tumor, similar to type I endometrial cancer, a bilateral salpingo-oophorectomy is recommended, even for premenopausal women presenting stage I disease. High recurrence rates were found among women who preserved their ovaries (50%) compared with those who did not (4%).³⁹ In leiomyosarcoma, the removal of ovaries does not appear to influence survival, and the preservation of ovarian tissue in premenopausal women does not increase the risk of recurrence.^{37,38,40}

Lymph node resection is controversial. For all histological types, suspicious nodules with increased size should be submitted for biopsy. The removal of lymph nodes with microscopic disease apparently has no clinical benefit.¹⁵ The incidence of lymph node metastasis in early stages of leiomyosarcomas, endometrial stromal sarcomas, and adenocarcinoma without sarcomatous overgrowth is very low; therefore, resection is not indicated. To date, lymphadenectomy for undifferentiated uterine sarcoma and adenocarcinoma with sarcomatous overgrowth is in debate.⁴¹ In general, the lymph nodes are involved in 3 to 9% of leiomyosarcoma cases, and there is no need for routine lymph node drainage because it does not increase disease-free survival.³⁷ In endometrial stromal sarcomas, lymph nodes are involved in 33 to 45% of the cases. However, the benefit of lymphadenectomy is controversial due to the good prognosis of this tumor.^{42,43}

Hoellen et al (2014) published a systematic review of lymphadenectomy impact in uterine sarcomas using data from 51 patients. They showed that women who underwent para-aortic-plus-pelvic or pelvic-alone lymphadenectomy presented better survival.⁴⁴

Uterine leiomyosarcomas showing a disease-free interval of 6 months or more require a different approach. A disease-free interval is an indicator of tumor biology and these uterine leiomyosarcomas might have a less aggressive growth pattern. This subset of tumours is more likely to express hormonal receptors that allow targeted treatment. Hormonal treatment or surgery can, therefore, be considered first instead of chemotherapy.³⁶

The effect of optimal cytoreduction on the survival of women with disease presenting extra-uterine spread has only been evaluated in few studies, and the findings are inconsistent. Currently it is not possible to define an optimal cytoreduction for uterine sarcomas.¹⁵ Additional surgical resection should be individualized based on the clinical scenario and the intraoperative findings. Regardless, the tumor-free resection margin without residual disease is the most important prognostic factor for uterine sarcomas.¹²

Treatment options for clinically inoperable patients include pelvic radiotherapy (with or without brachytherapy) and/or chemotherapy, and in some cases such as endometrial stromal sarcoma, hormone therapy.⁴⁵ Radiotherapy decreases the local recurrence, but it does not increase survival. These tumors exhibit little response to chemotherapy, with the exception of the most undifferentiated examples; treatment with the adjuvant progestin (medroxyprogesterone acetate or megestrol acetate) appears to be beneficial for endometrial stromal sarcomas.⁴⁰⁻⁴⁶ Because these sarcomas express both the estrogen and the progesterone receptor, adjuvant targeted hormonal treatment can be considered to reduce recurrence. Progestins or aromatase inhibitors may be considered.³⁶

Molecular features of gynecological sarcomas

Similarly to the other tumors, sarcoma development arises from alterations in genes that act in different biochemical and regulatory pathways. These changes can occur at the genomic level (mutation, gene amplification or deletion) or due to epigenetic events (histone acetylation, DNA methylation or miRNA).⁴⁷ Molecular analyses of the events involved in the development of different types of cancer have led to new strategies for the diagnosis and treatment of these diseases.⁴⁷⁻⁴⁹

These alterations may occur due to DNA polymerase errors during replication of genetic material or injuries that occur in the DNA molecule. Spontaneous DNA lesions are more frequent, the most common of which is the deamination (loss of exocyclic amino group) of nitrogenous bases, particularly of cytosine and 5-methylcytosine, which generates thymine and, consequently, causes a base-substitution mutation.^{49,50}

In this context, some sarcomas present specific genetic alterations, while others do not, demonstrating complex karyotype disorganization and severe genetic alterations with high chromosomal instability.⁵

Specific cytogenetic aberrations and molecular alterations characteristic of endometrial stromal tumors have been identified. Recurrent chromosomal rearrangements, loss of heterozygosity in tumor suppressor genes and deregulation

of the Wnt signaling pathway have also been implicated in these neoplasm developments.³⁻⁸

Previously, our group showed that no gynecological sarcomas may express some particularities and markers. Sarcomas might constitutively show NO and, rarely, inducible iNOS.⁵¹ The expression of genes TOP2A and Survivin can have relevant prognostic roles.⁵² Moreover, the genes SNRPD3, MEGF9, SPTAIN-1, AFAP1L2, ENDOD1, SERPIN5, ZWINTAS, UBE2C, ABCF1, MCM2, ARL6IP5 have been found to be markers of aggressiveness and metastasis.⁵³ Lately, a huge amount of gene profile evaluation has shown a molecular signature for differential diagnosis between leiomyosarcomas and pleomorphic sarcomas, configuring an exclusion diagnosis; the orthologue of the Src gene, SRC is configures as a diagnostic marker.^{54,55} Unlike uterine carcinomas, non-uterine sarcomas present with a lack of the GLU-1 protein expression.⁵⁶ However these tumors present the same mesodermal origin, and in the uterus, the cells are susceptible to sex steroids action.

Concerning uterine sarcomas, a recent work by our group indicates that Sonic Hedgehog proteins differ between conventional leiomyomas, atypical leiomyomas and leiomyosarcomas (Garcia et al., unpublished data). Additionally, several studies have shown that endometrial stromal sarcomas often carry the translocation^{10,14} with the participation of the JAZF1 and JJAZ1 genes, suggesting a genetic basis for tumor development.⁴⁷ A recent study showed a review of 49 cases of monomorphic endometrial stromal neoplasm and their histological mimics. The authors performed an evaluation of fluorescent in situ hybridization (FISH) for the JAZF1 and YWHAE breakaparts and their conclusion was that endometrial stromal sarcoma can be differentiated from monomorphic undifferentiated sarcomas by this method.⁵⁰ They present immunoreactivity for vimentin, smooth muscle actin, muscle-specific actin, and keratin. They may present diffuse reactivity to α -smooth muscle actin, while desmin and h-caldesmon are usually negative.^{47,48,50,57,58}

Expression profiles frequently contain the estrogen and progesterone receptors, PDGFR- α , aromatase, GnRH-R, and WT1. Further studies of JAZF1/JJAZ1, JAZF1/PHF1, and EPC1/PHF1 and their downstream effects are necessary. Similar to uterine leiomyosarcoma, WT1 overexpression in endometrial stromal sarcoma is a potential target for immunotherapy.³⁶

It is also believed that abnormalities in chromosomes 1, 7, and 11 may play an important role in the genesis of sarcomas or their progression. Changes in 11q22, the expression of epidermal growth factor receptors (HER-2/neu), p53, and Ki-67 were also described in malignant tumors of the uterus.^{59,60}

Recently, some studies have demonstrated an association between genetic events that involve mutations in cell cycle-related genes and apoptosis⁵⁹⁻⁶¹ and epigenetic events in gynecologic sarcomas.

Leiomyosarcomas generally express smooth muscle markers, such as desmin, h-caldesmon, smooth muscle actin, and histone deacetylase 8 (HDCA8). Epithelioid and myxoid leiomyosarcomas present lower immunoreactivity for these markers. Immunoreactivity against CD10 and epithelial markers, including keratin and epithelial membrane antigen (EMA or MUC1), may be observed.⁵ Studies have demonstrated expression of estrogen receptor,

progesterone receptor and androgen receptor in 30 to 40% of the cases evaluated. Overexpression of Ki-67, p53, p21 and p16 has also been reported.⁴⁷ Most uterine leiomyosarcomas express the platelet-derived growth factor receptor- α (PDGFR- α), Wilms' tumor gene 1 (WT1), aromatase, and gonadotropin-releasing hormone receptor (GnRH-R). Uterine leiomyosarcomas almost always have absence of epidermal growth factor receptor (EGFR) and epidermal growth factor receptor 2 (ERBB2) expression.³⁶ Targets of the estrogen and progesterone receptor have been successful for treating patients with uterine leiomyosarcomas with indolent growth. The PI3K-AKT pathway is also a common point of convergence in signal-transduction networks affected in sarcomas. Monoallelic loss of PTEN contributes to tumor growth in the context of other somatic mutations, and PTEN protein concentrations correlate with disease severity. Clinically applicable approaches to counteract the effects of PTEN loss include PI3K, AKT, and mTOR inhibitions.^{36,37,50}

A recently research demonstrated that leiomyosarcomas may occur de novo or develop within a preexisting leiomyoma. Apparently, uterine leiomyoma present areas called leiomyoma-like that share several molecular features with the malignant cells.⁶² There are no other studies in the literature that confirm this transformation.

Undifferentiated uterine sarcomas do not present immunoreactivity for estrogen receptors or progesterone receptors, but they present high immunoreactivity for EGFR. Smooth muscle markers and myogenin or MyoD1 may be useful to exclude leiomyosarcoma or rhabdomyosarcoma as respective diagnoses. Additionally, these tumors are positive for PDGFR- α , androgen receptor and WT1.^{36,37}

The mesenchymal component of adenosarcomas exhibit increased proliferation with higher expression levels of Ki-67 and p53. In these cases, the loss of estrogen receptors, progesterone receptors, and CD10 expression is observed. The tumor suppressor gene WT1 is expressed either with or without sarcomatous overgrowth adenosarcomas. Together, WT1 and CD10 can be useful for diagnosis of adenosarcoma.⁴⁷

Interesting results were obtained using a high-mobility group A1 gene (HMGA1a) transgenic model too. These mice develop aggressive uterine tumors resembling similar adenosarcoma features.⁶³ Several studies have reported HMGA1a over expression inducing highly malignant phenotype through the COX-2 upregulation in tumors.^{47,48,57,63}

CONCLUSION

In spite of the challenge of sarcoma biology, advances in molecular techniques have improved diagnostic possibilities and allowed for major steps in the understanding of several types of sarcoma. Several factors make the study of sarcomas more complicated because they are rare tumors whose study is possible only in reference centers, and the cellular origins of each of their histological types are unknown. Accordingly, most of the current knowledge on behavior, diagnosis, prognosis, and treatment of these tumors is due to studies conducted using available molecular tools. Knowledge of tumor biology forms the basis for delineating targeted treatment modalities that are currently used, under investigation.

■ CONFLICTS OF INTEREST AND SOURCE OF FUNDING

Katia Candido Carvalho is currently receiving a grant (#2012/23652-0) from FAPESP. For the remaining authors none were declared.

■ RESUMO

INTRODUÇÃO: Sarcomas uterinos constituem forma rara de neoplasia maligna, composta por cerca de 3% de todos os tumores malignos do útero, o que representa menos de 1% de todas as neoplasias ginecológicas. Baixa taxa de cura muitas vezes ocorre devido a metástases à distância, geralmente para os pulmões. Agressividade, altas taxas de recorrência local, metástases à distância e prognóstico desfavorável com sobrevida global de dois anos em menos de 50% são características comuns aos sarcomas uterinos. Apesar da baixa prevalência, estes tumores são de grande interesse devido às suas múltiplas características morfológicas e clínicas.

OBJETIVO: Este artigo focaliza aspectos gerais dos sarcomas uterinos, etiologia, prognóstico, tratamento e métodos moleculares utilizados em seu estudo.

METODOLOGIA: Esta revisão foi realizada utilizando o banco de dados Pubmed para pesquisar artigos publicados que continham as palavras-chaves: sarcoma uterino, características moleculares, fatores prognósticos.

RESULTADOS: Pouco se sabe sobre a etiologia dos sarcomas uterinos. Alguns estudos têm demonstrado a associação entre eventos genéticos que envolvem mutações em genes do ciclo celular e apoptose e epigenética em sarcomas ginecológicos. Estudos anteriores mostraram que as translocações cromossômicas foram identificadas, resultando em genes de fusão que são constitutivos e podem envolver a ativação de fatores de transcrição. Os avanços nas técnicas moleculares têm melhorado as possibilidades diagnósticas e permitiu uma melhor compreensão de diversas patologias.

CONCLUSÕES: Há vários fatores que dificultam o estudo de sarcomas, pois trata-se de tumores raros e não se sabe a origem celular de cada um de seus tipos histológicos. Assim, o estudo molecular dos fenômenos envolvidos no desenvolvimento dos diferentes tipos de câncer levou a novas estratégias utilizadas no diagnóstico e no tratamento destes tumores.

■ REFERENCES

- Gill PG. Sarcoma de partes moles [Soft tissue sarcoma]. (trad. Figueiredo MTA) Manual de Oncologia Clínica. 6th Ed. São Paulo: Fundação Oncocentro de São Paulo; 1999.
- Cotran RS, Kumar V, Collins T. Robbins Pathologic Basis of Disease. 6th Ed. Philadelphia: Saunders; 1999.
- Iwamoto Y. Diagnosis and treatment of soft tissue tumors. J Orthop Sci. 1999;4(1):54-65.
- Kurman RJ, Carcangiu ML, Herrington CS, Young RH. WHO classification of tumours of female reproductive organs. WHO Classification of Tumours. 4th Ed. Lyon: IARC Press; 2014.
- D'Angelo E, Prat J. Uterine sarcomas: a review. Gynecol Oncol. 2010;116(1):131-9.
- Di Saia PJ, Creasman WT. Clinical Gynecologic Oncology. 7th Ed. Philadelphia: Mosby Elsevier; 2007.
- Amant F, Floquet A, Friedlander M, Kristensen G, Mahner S, Nam EJ, et al. GCIg (Gynecological Cancer Inter Group) consensus review for endometrial stromal sarcoma. Int J Gynecol Cancer. 2014 Jul 16, [Epub ahead of print].
- Denschlag D, Masoud I, Stanimir G, Gilbert L. Prognostic factors and outcome in women with uterine sarcoma. Eur J Surg Oncol. 2007;33(1): 91-5.
- Chan JK, Kowar NM, Shin JY, Osann K, Chen LM, Powell CB, et al. Endometrial stroma sarcoma: a population-based analysis. Br J Cancer. 2008;99(8):1210-5.
- Abeler VM, Royne O, Thoresen S, Danielsen HE, Nesland JM, Kristensen GB. Uterine sarcomas in Norway. A histopathological and prognostic survey of a total population from 1970 to 2000 including 419 patients. Histopathology. 2009;54(3):355-64.
- D'Angelo E, Spagnoli LG, Prat J. Comparative clinicopathologic and immunohistochemical analysis of uterine sarcomas diagnosed using the World Health Organization classification system. Hum Pathol. 2009;40(11):1571-85.
- Tropé CG, Abeler VM, Kristensen GB. Diagnosis and treatment of sarcoma of the uterus. A review. Acta Oncol. 2012;51(6):694-705.
- Krivak TC, Seidman JD, McBroom JW, MacKoul PJ, Aye LM, Rose GS. Uterine adenosarcoma with sarcomatous overgrowth versus uterine carcinosarcoma: comparison of treatment and survival. Gynecol Oncol. 2001;83(1):89-94.
- Kaku T, Silverberg SG, Major FJ, Miller A, Fetter B, Brady MF. Adenosarcoma of the uterus: a Gynecologic Oncology Group clinicopathologic study of 31 cases. Int J Gynecol Pathol. 1992;11(2):75-88.
- Nam JH. Surgical treatment of uterine sarcoma. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 2011;25(6):751-60.
- Ayham A, Aksan G, Gultekin M, Esin S, Himmetoglu C, Dursun P, et al. Prognosticators and the role of lymphadenectomy in uterine leiomyosarcoma. Arch Gynecol Obstet. 2009;280(1):79-85.
- Vorgias G, Postiou S. The role of lymphadenectomy in uterine carcinosarcomas (malignant mixed müllerian tumours): a critical literature review. Arch Gynecol Obstet. 2010;282(6):659-64.
- Gadduci A, Cosio S, Romanini A, Genazzani AR. The management of patients with uterine sarcoma: a debated clinical challenge. Crit Rev Oncol Hematol. 2008;65(2):129-42.
- Baiocchi G, Faloppa CC, Osório CA, Kumagai LY, Fukazawa EM, Cunha IW. Embryonal rhabdomyosarcoma of the uterine cervix in a 47-year-old woman. J Obstet Gynaecol Res. 2011;37(7):940-6.
- Sutton G. Uterine sarcomas 2013. Gynecol Oncol. 2013 Jul;130(1):3-5.
- Toro JR, Travis LB, Wu HJ, Zhu K, Fletcher CD, Devesa SS. Incidence patterns of soft tissue sarcomas, regardless of primary site, in the surveillance, epidemiology and end results program, 1978-2001: an analysis of 26,758 cases. Int J Cancer. 2006;119(12):2922-30.
- American Cancer Society. Available at: <http://www.cancer.org/acs/gro ups/content/@research/documents/webcontent/acspc-042151.pdf>. Accessed July 26, 2014 Cancer Facts and Figures 2014. Atlanta, GA: American Cancer Society; 2014.
- Brooks SE, Zhan M, Cote T, Baquet CR. Surveillance, epidemiology, and end results analysis of 2677 cases of uterine sarcoma 1989-1999. Gynecol Oncol. 2004;93(1):204-8.
- Zelmanowicz A, Hildesheim A, Sherman ME, Sturgeon SR, Kurman RJ, Barrett RJ, et al. Evidence for a common etiology for endometrial carcinomas and malignant mixed müllerian tumors. Gynecol Oncol. 1998;69(3):253-7.
- Wysowski DK, Honig SF, Beiz J. Uterine sarcoma associated with tamoxifen use. N Engl J Med. 2002;346(23):1832-3.
- Wickerham DL, Fsher B, Wolmark N, Bryant J, Costantino J, Bernstein L, et al. Association of tamoxifen and uterine sarcoma. J Clin Oncol. 2002;20(11):2758-60.
- Thomas DB. The WHO collaborative study of neoplasia and steroid contraceptives: the influence of combined oral contraceptives on risk of neoplasms in developing and developed countries. Contraception. 1991;43(6):695-710.
- Chu CS, Lin LL, Rubin SC. Cancer of the uterine body. In: DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA, editors. DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer Principles & Practice of Oncology. 8th Ed. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins; 2008; p. 1543-63.
- Livi L, Paier F, Shah N, Blake P, Villanucci A, Amunni G, et al. Uterine sarcoma: twenty-seven years of experience. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2003;57(5):1366-73.
- O'Neill CJ, McBride HA, Connolly LE, McCluggage WG. Uterine leiomyosarcomas are characterized by high p16, p53 and MIB1 expression in comparison with usual leiomyomas, leiomyoma variants and smooth muscle tumours of uncertain malignant potential. Histopathology. 2007;50(7):851-8.
- Abbas JS, Holyoke ED, Moore R, Karakousis CP. The surgical treatment and outcome of soft tissue sarcoma. Arch Surg. 1981;116:765-9.
- Angervall L, Kindblom LG. Principles for pathologic-anatomic diagnosis and classification of soft-tissue sarcomas. Clin Orthop Relat Res. 1993;289:9-18.
- Prat J. FIGO staging for uterine sarcomas. Inter J Gynaecol Obstet. 2009;104(3):177-8.
- Brocker KA, Alt CD, Eichbaum M, Sohn C, Kauczor HU, Hallscheidt P. Imaging of female pelvic malignancies regarding MRI, CT and PET/CT: part I. Strahlenther Onkol. 2011;187(10):611-8.
- Amant F, Coosemans A, Debiec-Rychter M, Timmerman D, Vergote I. Clinical management of uterine sarcomas. Lancet Oncol. 2009;10(12):1188-98.
- Hensley ML. Uterine/female genital sarcomas. Curr Treat Options Oncol. 2000;1(2):161-8.
- Kapp DS, Shin JY, Chan JK. Prognostic factors in survival in 1396 patients with uterine leiomyosarcoma: emphasis on impact of lymphadenectomy and oophorectomy. Cancer. 2008;112(4):820-30.
- Berchuck A, Rubin SC, Hoskins WJ, Saigo PE, Pierce VK, Lewis JL Jr. Treatment of endometrial stromal tumors. Gynecol Oncol. 1990;36(1):60-5.
- Bodner K, Bodner-Adler B, Obermair A, Windbichler G, Petru E, Mayerhofer S, et al. Prognostic parameters in endometrial stroma sarcomas: a clinicopathologic study in 31 patients. Gynecol Oncol. 2001;81(2):160-5.
- García-Martínez E, Egea Prefasi L, García-Donas J, Escolar-Pérez PP, Pastor F, González-Martín A. Current management of uterine sarcomas. Clin Transl Oncol. 2011;13(5):307-314, doi: 10.1007/s12094-011-0659-0.
- Amant F, De Knijf A, Van Caster B, Leunen K, Neven P, Berteloot P, et al. Clinical study investigating the role of lymphadenectomy, surgical

- castration and adjuvant hormonal treatment in endometrial stromal sarcoma. *Br J Cancer*. 2007;97(9):1194-9.
42. Shah JP, Bruant CS, Kumar S, Ali-Fehmi R, Malone JM Jr, Morris RT. Lymphadenectomy and ovarian preservation in low grade endometrial stroma sarcoma. *Obstet Gynecol*. 2008;112(5):1102-8.
43. Hoellen F, et al. The role of lymphadenectomy in uterine sarcoma: a clinical practical based on retrospective analysis. *Anticancer Research*. 2014.
44. Greer BE, Wui-Jin-Koh, Abu-Rustun NR, Campos SM, Chan J, et al. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines™), Version 1. 2012. Available at: <http://www.nccn.org/patients/clinical/default.aspx>. Accessed July 26, 2014
45. Riopel J, Plant M, Renaud MC, Roy M, Têtu B. Lymph node metastases in low grade endometrial stromal sarcoma. *Gynecol Oncol*. 2005;96(2):402-6.
46. Kobayashi H, Uekuri C, Akasaka J, Ito F, Shigemitsu A, Koike N, et al. The biology of uterine sarcomas: a review and update. *Molecular and Clinical Oncology*. 2013;1:599-609.
47. Erez A, Shchelochkov OA, Plon SE, Scaglia F, Lee B. Insights into the pathogenesis and treatment of cancer from inborn errors of metabolism. *Am J Hum Genet*. 2011;88(4):402-21.
48. Carvalho KC, Cunha IW, Rocha RM. Molecular tools used in the study of sarcomas. *Applied Cancer Research*. 2010;30(2):237-9.
49. Stewart CJ, Leung YC, Murch A, Peverall J. Evaluation of fluorescence in-situ hybridization in monomorphic endometrial stromal neoplasms and their histological mimics: a review of 49 cases. *Histopathology*. 2014 Mar 4, [Epub ahead of print].
50. Cunha IW, Lopes A, Falzoni R, Soares FA. Sarcomas often express constitutive nitric oxide synthases (NOS) but infrequently inducible NOS. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2006;14(4):404-10.
51. da Cunha IW, De Brot L, Carvalho KC, Rocha RM, Fregnani JH, Falzoni R, et al. Prognostication of soft tissue sarcomas based on chromosome 17q gene and protein status: evaluation of TOP2A, HER-2/neu, and survivin. *Ann Surg Oncol*. 2012;19(6):1790-9.
52. Cunha IW, Carvalho KC, Martins WK, Marques SM, Muto NH, Falzoni R, et al. Identification of genes associated with local aggressiveness and metastatic behavior in soft tissue tumors. *Transl Oncol*. 2010;3(1):23-32.
53. Silveira SM, Villacis RA, Marchi FA, Barros Filho M de C, Drigo SA, Neto CS, et al. Genomic signatures predict poor outcome in undifferentiated pleomorphic sarcomas and leiomyosarcomas. *PLoS One*. 2013;8(6):e67643.
54. Villacis RA, Silveira SM, Barros-Filho MC, Marchi FA, Domingues MA, Scapulatempo-Neto C, et al. Gene expression profiling in leiomyosarcomas and undifferentiated pleomorphic sarcomas: SRC as a new diagnostic marker. *PLoS One*. 2014;9(7):e102281.
55. Carvalho KC, Cunha IW, Rocha RM, Ayala FR, Cajaiba MM, Begnami MD, et al. GLUT1 expression in malignant tumors and its use as an immunodiagnostic marker. *Clinics (Sao Paulo)*. 2011;66(6):965-72.
56. Stewart CJ, Leung YC, Murch A, Peverall J. Evaluation of fluorescence in-situ hybridization in monomorphic endometrial stromal neoplasms and their histological mimics: a review of 49 cases. *Histopathology*. 2014 Mar, doi: 10.1111/his.12406. [Epub ahead of print].
57. Ballestar E. An introduction to epigenetics. *Adv Exp Med Biol*. 2011;711:1-11.
58. Murray S, Linardou H, Mountzios G, Manoloukos M, Markaki S, Eleutherakis-Papaiaikovou E, et al. Low frequency of somatic mutations in uterine sarcomas: a molecular analysis and review of the literature. *Mutat Res*. 2010;686(1-2):68-73.
59. Chiang S, Oliva E. Cytogenetic and molecular aberrations in endometrial stromal tumors. *Hum Pathol*. 2011;42(5):609-17.
60. Popiela A, Gabryś MS, Rabczyński J, Pańszczyk M, Keith G, Baranowski W. Estimation of DNA methylation level in nonendometrial uterus malignancies. *Ginek Pol*. 2002;73(11):962-5.
61. Mittal R, Chen F, Wei JJ, Rijhvari K, Kurvathi R, Streck D, Dermody J, et al. Molecular and immunohistochemical evidence for the origin of uterine leiomyosarcomas from associated leiomyoma and symplastic leiomyoma-like areas. *Modern Pathology*. 2009;22(10):1303-11.
62. Tesfaye A, Di Cello F, Hillion J, Ronnet BM, Elbahoui O, Ashfaq R, et al. The high-mobility group A1 gene up-regulates cyclooxygenase 2 expression in uterine tumorigenesis. *Cancer Research*. 2007;67(9):3998-4004.