LECY KAWAMURA

**Avaliação da densidade vascular linfática
intratumoral em adenocarcinomas primários de
endométrio**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em
Ciências

Programa de Obstetrícia e Ginecologia

Orientador: Prof. Dr. Jesus Paula Carvalho

São Paulo
2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Kawamura, Leci

Avaliação da densidade vascular linfática intratumoral em adenocarcinomas primários de endométrio / Leci Kawamura.-- São Paulo, 2011.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Obstetrícia e Ginecologia.

Orientador: Jesus Paula Carvalho.

Descritores: 1.Neoplasias do endométrio 2.Prognóstico 3.Linfangiogênese
4.Podoplanina 5.Imunoistoquímica

USP/FM/DBD-186/11

Esta Tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta

publicação: Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (ABNT) 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. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

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

A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original

Albert Einstein

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, **Kazuko** e **Atsushi Kawamura**, pelo amor e apoio incondicional.

Agradecimentos

A **Deus**. Gostaria de agradecer em primeiro lugar Àquele que me deu o maior de todos os presentes: a vida. Permitiu-me crescer, aprender e ensinar. Que esteve ao meu lado em cada momento, tornando possíveis os mais impossíveis desafios. A Ele o meu maior agradecimento.

Ao Prof. Dr. **Marcelo Alvarenga Calil**, meu mentor na vida acadêmica e chefe desde a residência médica; sempre indicando o melhor caminho a seguir. O meu sincero agradecimento.

Ao Prof. Dr. **Edmund Chada Baracat**, por ter me recebido tão gentilmente no ingresso à pós-graduação, sempre disposto a contribuir e enriquecer este trabalho.

Ao Prof. Dr. **Jesus Paula Carvalho**, meu orientador, que nesta jornada em busca de aprimorar meu conhecimento, me fez perseverante perante as dificuldades.

A Profa. Dra. **Filomena Marino Carvalho**, por contribuir de forma significativa com seu conhecimento imensurável em anatomia patológica, enriquecendo este trabalho com profissionalismo e dedicação. O meu muito obrigada.

Ao Prof. Dr. **João Carlos Sampaio Góes**, obrigada pela oportunidade, apoio e confiança.

A Dra. **Eloá Muniz de Freitas**, sua participação foi essencial para concretização deste trabalho.

A amiga Dra. **Renata Sampaio Góes**, obrigada por participar comigo deste desafio, dividindo momentos de cansaço e alegria.

Ao Dr. **Bernardo Almeida**, companheiro de pós-graduação, agradeço pelo seu apoio, incentivo e por sua disponibilidade, agregando conhecimentos nesta jornada.

A minha mãe, **Kazuko Kawamura** que, mesmo ainda no útero, já demonstrava o seu amor, e continua ao meu lado até hoje. Meu espelho. Admiro-a não somente como mãe, mas como profissional, mulher e amiga.

Ao meu pai, **Atsushi Kawamura**, que tanto se esforçou para realizar meus desejos e sonhos e sempre esteve ao meu lado, me apoiando e dando a certeza de que não estou só.

Aos meus irmãos **Necy, Ecy e Handel**, por todos os momentos que compartilhamos juntos. A vida segue, e muito diferentes são os caminhos que trilhamos, mas a certeza de que estaremos sempre juntos, me dá a segurança para continuar.

Ao meu eterno namorado, **Márcio André Santos**, pelo apoio de ontem, pela presença de hoje e por todos os momentos que iremos compartilhar juntos pelo resto de nossas vidas.

As amigas Dra. **Ailma Larre**, Dra. **Kadja Fróes** e Dra. **Gislayne Trevisan**, companheiras de trabalho. Agradeço por dividirem comigo as alegrias e as dificuldades que o dia a dia profissional nos traz.

A Dra. **Kallene Vidal**, amiga e companheira desde os tempos de faculdade. Obrigada pelo carinho, paciência e pela irrestrita disponibilidade em todos os momentos que necessitei.

A amigos Dra. **Elaine Silva**, Dr. **Marcelo Kawata** e Dr. **Edgar Britto**, pelo incentivo e estímulo ao crescimento profissional.

Aos **amigos**, que sempre me estimularam a trilhar este caminho, trocando informações e agregando conhecimentos, para que este sonho se concretizasse.

A **Cláudia Vieira**, **Cristiane Amaral** e **Fernanda Santos**, que atuaram de forma valiosa contribuindo na organização deste trabalho.

Aos **pacientes** e **funcionários** do IBCC, por se disporem a fazer parte deste trabalho, auxiliando não somente na obtenção de dados, mas na troca de conhecimentos que vai muito além da relação médico-paciente. Ensinaamentos estes que levarei para a vida.

Lista de Siglas e Abreviaturas

Lista de Símbolos

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	REVISÃO DA LITERATURA	
2.1	O câncer de endométrio.....	4
2.2	Angiogênese e linfangiogênese.....	8
2.2.1	Aspectos históricos da linfangiogênese.....	8
2.2.2	O desenvolvimento do sistema linfático.....	9
2.2.3	Aspectos microscópicos da angiogênese.....	10
2.2.4	Aspectos microscópicos da linfangiogênese.....	10
2.3	Mecanismo molecular da linfangiogênese.....	11
2.3.1	Linfangiogênese e sua relação com câncer.....	14
2.3.2	Diferença entre vasos sanguíneos e vasos linfáticos: aspectos morfológicos.....	17
2.4	Características do sistema linfático do endométrio.....	18
2.5	Métodos imunoistoquímicos de avaliação da linfangiogênese.....	19
2.6	Podoplanina como marcador da célula endotelial linfática.....	20
2.7	O papel da podoplanina no mecanismo de invasão e metástase.....	22
3	OBJETIVOS.....	24
4	CASUÍSTICA E MÉTODOS	
4.1	Casuística.....	25
4.2	Métodos.....	26
4.2.1	Método antomopatológico.....	26
4.2.2	Construção dos blocos de microarranjos de tecidos – “Tissue Microarray” (TMA).....	33
4.2.3	Método imunoistoquímico.....	35
4.2.4	Interpretação imunoistoquímico.....	37
4.2.5	Método de avaliação da microdensidade vascular.....	38
4.3	Método estatístico.....	41
5	RESULTADOS.....	43
6	DISCUSSÃO.....	53
7	CONCLUSÕES.....	58
8	ANEXOS.....	60
9	REFERÊNCIAS.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS

CAPESQ	Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
CD 44	Receptor de ácido hialurônico
CEL	Células endoteliais linfáticas
FIGO	Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
FOSP	Fundação Oncocentro de São Paulo
GOG	Gynecologic Oncology Group
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
IARC	Agência Internacional de Pesquisa em Câncer
IBCC	Instituto Brasileiro de Controle do Câncer
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LOH	Perda da heterozigose
LYVE-1	Receptor endotelial de vaso linfático (<i>Lymphatic Vessel Endothelial Receptor-1</i>)
PROX-1	<i>Prospero-related homeobox gene-1</i>
MDVL	Microdensidade vascular linfática
p	Probabilidade de erro alfa
pH	Potencial de hidrogênio
PBS	Solução salina tamponada
PECAM-1	Célula endotelial plaquetária de adesão molecular
PTEN	Gene supressor tumoral (<i>phosphatase with tensin homology deleted in chromosome 10</i>)
PIGF	Fator de crescimento placentário
RCSP	Registro de Câncer de São Paulo
TMA	Microarranjo de tecidos (<i>Tissue Microarray</i>)
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular (<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>)
VEGFR	Receptor de crescimento endotelial vascular (<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i>)

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alpha
H_2O_2	Água oxigenada
Kd	Kilodalton
μm	Micrômetro
mm	Milímetro
X	Vezez
X^2	Qui-quadrado
%	Porcentagem

Figura 1	Adenocarcinoma endometriode, grau 1 histológico, caracterizado pela presença de glândulas de formas variáveis, revestidas por epitélio irregularmente estratificado, com atipia discreta (hematoxilina-eosina – aumento original 100X).....	28
Figura 2	Adenocarcinoma seroso do endométrio com projeções papilares compostas por células com pleomorfismo nuclear (hematoxilina-eosina - aumento original 400X).....	29
Figura 3	Adenocarcinoma de células claras com padrão sólido, composto por células com intenso pleomorfismo nuclear e citoplasma claro (hematoxilina-eosina - aumento original 400X).....	29
Figura 4	Adenocarcinoma de células claras com padrão glandular, exibindo células com núcleos hipercromáticos, salientes no contorno glandular, com citoplasma escasso (hematoxilina-eosina – aumento original 100X).....	30
Figura 5	Adenocarcinoma endometriode, grau 1 histológico, com glândulas irregulares revestidas por células com discreto pleomorfismo nuclear (Hematoxilina-eosina – aumento original 400X).....	31
Figura 6	Lâmina com corte histológico obtido de bloco de microarranjos de tecido com 30 amostras de tumores, corado pela técnica da hematoxilina-eosina.....	34
Figura 7	Detalhe de um dos casos incluídos em bloco de microarranjos de tecido, representado por corte histológico de adenocarcinoma endometriode corado pela técnica da hematoxilina-eosina.....	38
Figura 8	Estroma intratumoral com raras células estromais positivas para podoplanina (exame imunoistoquímico, D2-40 – aumento original 400X).....	39
Figura 9	Podoplanina em células endoteliais de vaso linfático no estroma de adenocarcinoma endometriode (exame imunoistoquímico, D2-40 – aumento original 400X).....	39
Figura 10	Estroma de adenocarcinoma endometriode com três vasos linfáticos (exame imunoistoquímico, D2-40 – aumento original 400X).....	38
Figura 11	Adenocarcinoma com área sólida e quatro vasos linfáticos no estroma (exame imunoistoquímico, D2-40 – aumento original 400X).....	40
Figura 12	Adenocarcinoma endometriode, grau 1 histológico, com quatro vasos linfáticos no estroma (exame	

	imunoistoquímico, D2-40 – aumento original 400X).....	40
Figura 13	Adenocarcinoma endometrial, sólido na área representada, com seis vasos linfáticos no estroma (exame imunoistoquímico, D2-40 – aumento original 400X).....	41
Figura 14	Curvas de sobrevida segundo a condição dos linfonodos.....	51
Figura 15	Curvas de sobrevida segundo a microdensidade vascular linfática (MDVL).....	52

Tabela 1	Cálculo do grau segundo critérios do sistema de Vancouver.....	32
Tabela 2	Características clínicopatológicas relacionadas aos adenocarcinomas primários de endométrio segundo comprometimento linfonodal (n=57).....	44
Tabela 3	Características clínicopatológicas relacionadas aos adenocarcinomas primários de endométrio segundo desfecho (n=57).....	45
Tabela 4	Associação entre microdensidade vascular linfática (MDVL) e desfecho.....	46
Tabela 5	Associação entre expressão de podoplanina em células neoplásicas e comprometimento linfonodal....	46
Tabela 6	Associação entre infiltração miometrial e microdensidade vascular linfática.....	46
Tabela 7	Associação entre comprometimento de colo de útero e microdensidade vascular linfática.....	47
Tabela 8	Associação entre comprometimento de anexos e microdensidade vascular linfática.....	47
Tabela 9	Associação entre comprometimento de peritônio e omento e microdensidade vascular linfática.....	47
Tabela 10	Associação entre expressão de podoplanina em células neoplásicas e comprometimento linfonodal....	48
Tabela 11	Associação entre expressão de podoplanina em células neoplásicas e desfecho.....	48
Tabela 12	Associação entre expressão de podoplanina em células fibroblásticas do estroma intratumoral e comprometimento linfonodal.....	48
Tabela 13	Associação entre expressão de podoplanina em células fibroblásticas do estroma intratumoral e desfecho.....	49
Tabela 14	Determinação dos valores preditivos para desfecho nos adenocarcinomas primários de endométrio.....	49
Tabela 15	Determinação dos fatores preditivos para comprometimento linfonodal nos adenocarcinomas primários de endométrio.....	50
Tabela 16	Determinação dos valores preditivos para comprometimento de linfonodos paraórticos em adenocarcinomas primários de endométrio.....	50

RESUMO

Kawamura, L. *Avaliação da densidade vascular linfática intratumoral em adenocarcinomas primários de endométrio* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011. 79p.

INTRODUÇÃO: A metástase linfonodal em adenocarcinomas de endométrio reduz significativamente as taxas de sobrevida. Poucos estudos relacionando a microdensidade vascular linfática (MDVL) intratumoral e sobrevida em adenocarcinomas endometriais estão disponíveis atualmente. **OBJETIVO:** O propósito deste estudo foi avaliar a microdensidade vascular linfática intratumoral dos adenocarcinomas de endométrio e investigar a sua associação com fatores patológicos clássicos, metástase linfonodal e sobrevida. **MÉTODOS:** Cinquenta e sete pacientes com adenocarcinoma de endométrio, diagnosticadas entre 2000 a 2008 submetidas a estadiamento cirúrgico completo e avaliação da MDVL intratumoral e outras variáveis histológicas. Os micro vasos linfáticos foram identificados através de reação imunoistoquímica utilizando um anticorpo monoclonal contra a podoplanina humana (clone D2-40) e avaliados pela contagem do número de vasos linfáticos marcados em 10 campos com maior densidade vascular em aumento de 400 vezes. A MDVL foi expressa pela média do número de vasos nestes 10 campos microscópicos de maior densidade vascular. A seguir, investigamos a associação entre MDVL com achados clínico-patológicos e prognóstico. Nossos resultados demonstraram que a média do número de vasos linfáticos contados em todos os casos variou de 0 a 4.7. O valor da mediana obtida da média da MDVL foi de 0,5 e foi definido como valor de corte entre baixa e alta MDVL. **RESULTADOS:** Identificamos baixa MDVL intratumoral em 27 (47,4%) pacientes e alta MDVL em 30 (52,6%) das pacientes. A elevada MDVL intratumoral foi associada com menor comprometimento linfonodal e casos fatais, menor infiltração miometrial e de anexos e menor comprometimento cervical e peritoneal. Não foi obtida associação entre MDVL e idade, tipo histológico pelo sistema da FIGO, invasão vascular ou comprometimento linfonodal. **CONCLUSÃO:** Nossos resultados mostram associação entre elevada MDVL intratumoral com fatores prognósticos favoráveis no câncer endometrial.

Descritores: 1.Neoplasias do endométrio 2.Prognóstico 3.Linfangiogênese 4.Podoplanina 5.Imunoistoquímica.

SUMMARY

Kawamura L. *Evaluation of intratumoral lymphatic vessel density in primary endometrial adenocarcinomas* [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2011. 79p.

INTRODUCTION: Lymph node metastasis in endometrial cancer significantly decreases survival rate. Few data on the influence of intratumoral lymphatic microvessel density (LMVD) on survival in endometrial cancer are available. **OBJECTIVE:** Our aim was to assess the intratumoral LMVD of endometrial adenocarcinomas and to investigate its association with classical pathological factors, lymph node metastasis and survival. **METHODS:** Fifty-seven patients with endometrial adenocarcinoma diagnosed between 2000 and 2008 underwent complete surgical staging and evaluation of intratumoral LMVD and other histologic variables. Lymphatic microvessels were identified by immunohistochemical staining using monoclonal antibody against human podoplanin (clone D2-40) and evaluated by counting the number of immunostained lymphatic vessels in 10 hot spot areas at 400X magnification. The LMVD was expressed by the mean number of vessels in these 10 hot spot microscopic fields. We next investigated the association of LMVD with the clinicopathologic findings and prognosis. Our results demonstrated that the mean number of lymphatic vessels counted in all cases ranged between 0 and 4.7. The median value of mean LMVD was 0.5, and defined the cut-off for low and high LMVD. **RESULTS:** We identified low intratumoral LMVD in 27 (47.4%) patients and high LMVD in 30 (52.6%) patients. High intratumoral LMVD was associated with lesser nodal involvement and fatal cases, lesser myometrial and adnexal infiltration, and lesser cervical and peritoneal involvement. No association was seen between LMVD and age, FIGO staging histological type, vascular invasion, or lymph node involvement. **CONCLUSION:** Our results show association of high intratumoral LMVD with favorable prognosis in endometrial cancer.

Descriptors: 1.Endometrial neoplasms 2.Prognosis 3.Lymphangiogenesis 4.Podoplanin 5.Immunohistochemistry

1 Introdução

A incidência de metástase para linfonodos está relacionada, entre outros fatores, ao tamanho do tumor (< 2 cm = 4%; > 2 cm = 15%; toda a cavidade = 35%)¹. Mais recentemente, Axtell et al. (2007) encontraram na fração de envolvimento neoplásico da cavidade uterina um importante fator preditivo de comprometimento linfonodal². Pacientes com envolvimento da superfície inferior a 35% têm menores índices de metástase linfonodal (3%) quando comparadas àquelas com envolvimento entre 35% e 80% (10%) e com mais de 80% da superfície envolvida (31%)².

A disseminação extrauterina da doença aumenta o risco de metástase linfonodal e piora as taxas de sobrevida². A citologia peritoneal positiva associa-se a maior risco de morte (HR-1,70), independente do envolvimento anexial³. O comprometimento linfonodal é o maior indicador prognóstico nos carcinomas de endométrio e tem como fatores preditivos mais importantes, a infiltração profunda do miométrio, envolvimento do estroma cervical, citologia peritoneal positiva e presença de embolização vascular^{4,5}. Carcinomas de endométrio com metástases em linfonodos pélvicos ou para-aórticos são classificados no estágio IIIC 1 e IIIC 2, respectivamente⁶.

Cerca de um terço das pacientes com linfonodos pélvicos positivos também apresentarão metástase para linfonodos para-aórticos, mas estes raramente estão envolvidos na ausência de doença linfática pélvica⁷. O prognóstico com envolvimento de linfonodos para-aórticos é pior do que quando a metástase restringe-se aos linfonodos pélvicos. Em estudo do Gynecologic Oncology Group (GOG), somente 36% das pacientes com

linfonodos para-aórticos comprometidos achavam-se livres de doença em 5 anos, comparativamente a 85% daquelas com linfonodos para-aórticos negativos⁷.

O estadiamento cirúrgico identifica a maioria das pacientes com doença extrauterina e tem impacto significativo sobre as decisões de tratamento, permitindo avaliar a necessidade de adjuvância radio ou quimioterápica para as pacientes com neoplasia do corpo uterino, além da determinação do prognóstico⁸.

A metástase é considerada a principal causa de mortalidade em câncer. O sistema linfático é o primeiro sítio de metástase para a maioria dos carcinomas, normalmente precedendo a via vascular. O acometimento do linfonodo regional é um evento comum em tumores sólidos, sendo considerado um marcador para disseminação, estágio avançado e pior prognóstico. O processo de metástase linfática é muito complexo e inclui disseminação e invasão do estroma circunjacente ao tumor, entrada nos vasos linfáticos e implantação nos linfonodos regionais. Este processo não é somente mecânico, mas envolve complexas interações moleculares⁹.

Recentemente, Schacht et al. (2005) prepararam o anticorpo monoclonal D2-40, disponível comercialmente, que reconhece especificamente a podoplanina humana. O anticorpo tem se mostrado um marcador de endotélio linfático altamente seletivo em cortes de congelação e parafina de tecidos normais e neoplásicos, e tem se mostrado útil na detecção da invasão linfática em várias neoplasias malignas^{9,10}.

O fato é que o comprometimento linfático se relaciona com a presença de metástase regional, porém, nem todos os tumores metastatizam para os linfonodos. A importância da metástase

linfática é bem reconhecida no tratamento e estadiamento do câncer, com estado linfonodal determinando a multimodalidade de tratamento em pacientes com tumores sólidos como: câncer de mama, colorretal e de cabeça e pescoço. Entretanto, os mecanismos e o papel da linfangiogênese na disseminação regional ainda são pouco conhecidos. Portanto, entender as características moleculares do microambiente neoplásico relacionadas à linfangiogênese, pode propiciar a descoberta de estratégias futuras para o controle da disseminação dos carcinomas. Recentes avanços na biologia e patologia da linfangiogênese têm promovido novos estudos no campo da biologia vascular linfática, incluindo o desenvolvimento de terapia específica^{11,12,13,14}.

Assim, propusemo-nos a avaliar densidade vascular linfática e sua relação com fatores prognósticos nos carcinomas endometriais.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Câncer de endométrio

O adenocarcinoma de endométrio é considerado a neoplasia mais comum da pelve feminina nos países desenvolvidos e a mais prevalente nos países em desenvolvimento, segundo dados da Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC), 2011¹⁵. Segundo dados da Sociedade Americana de Câncer, em 2010, foi o tumor ginecológico mais incidente na população americana¹⁶.

No Brasil, não existem estatísticas oficiais ou publicadas sobre sua incidência e mortalidade. Entretanto, no município de São Paulo, segundo dados do Registro de Câncer de Base Populacional de São Paulo (RCBP-SP), as neoplasias do corpo uterino, onde o endométrio se encontra e constitui a maior parte, no período de 1997 a 2003, foram a quarta neoplasia mais frequente dentre os tumores ginecológicos¹⁷.

Segundo dados da Fundação Oncocentro de São Paulo (FOSP), sobre a mortalidade deste tumor, segundo o sexo, no biênio 2001-2002, no Estado de São Paulo, as neoplasias do corpo uterino representaram a terceira causa de óbito dentre os tumores ginecológicos¹⁸.

Apresenta significativa elevação de sua incidência após os 50 anos de idade, com 75% dos casos ocorrendo na pós-menopausa. Quanto à distribuição racial, há maior prevalência na raça branca. Contudo, são de pior prognóstico entre as mulheres negras^{19,20}.

Muitos fatores de risco relativos já foram identificados nas pacientes com câncer de endométrio, entre os quais ressaltamos obesidade, diabetes, hipertensão arterial, anovulação crônica,

tumores funcionantes dos ovários (produtores de estrogênios) e carcinoma de mama. O perfil da paciente que apresenta maior risco para contrair a doença são as que tiveram menopausa tardia, nuli ou oligoparidade ou as que fizeram uso de estrogenerioterapia de forma abusiva, com estrogenerioterapia exclusiva como terapia hormonal²¹. Além disso, deve ser lembrada a predisposição genética (antecedentes familiares) das pacientes com câncer de cólon, mama e ovário em parentes próximos¹².

A diferenciação histológica dos carcinomas, importante fator prognóstico, é determinada pelo padrão de crescimento arquitetural e pelos aspectos citológicos. No sistema de classificação da Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO) proposto em 2009, os tumores são agrupados em três graus quanto à proporção de áreas sólidas: 1) Grau 1 (G1) - 5% ou menos do tumor mostram padrão sólido de crescimento; 2) Grau 2 (G2) - 6 a 50% do tumor mostram padrão de crescimento sólido; 3) Grau 3 (G3) - mais de 50% do tumor mostram padrão de crescimento sólido. Além disso, a atipia nuclear marcante e inadequada ao grau arquitetural aumenta em um o grau histológico do tumor^{7,22}.

O grau de diferenciação dos carcinomas endometriais representa importante fator prognóstico, permitindo estratégias de tratamento mais efetivas. Entretanto, carcinomas de grau 1 histológico apresentam 15,4% de chance de doença extrauterina, tornando imperativo o estadiamento cirúrgico²³. A incidência geral de metástase para linfonodos no estágio clínico I é de aproximadamente 3% em tumores grau 1, 9% grau 2 e 18% grau 3²³.

O estadiamento cirúrgico realizado segundo o sistema FIGO de 2009, é importante fator prognóstico^{7,20}. No mínimo, o procedimento cirúrgico deve incluir a coleta de amostra do líquido peritoneal para avaliação citológica, a exploração do abdome e

da pelve com biópsia ou excisão de quaisquer lesões extrauterinas sugestivas de câncer metastático, a histerectomia extrafascial e a salpingo-ooforectomia bilateral. A peça cirúrgica deve ser aberta e a profundidade do envolvimento miometrial e a extensão cervical devem ser avaliadas. Os linfonodos pélvicos e para-aórticos suspeitos e clinicamente negativos devem ser biopsiados em todas as pacientes com fatores de risco ²⁴.

A profundidade da invasão do miométrio é um dos fatores prognósticos, incluso no sistema de estadiamento cirúrgico na determinação do risco de metástase para os linfonodos. Segundo o GOG, metástases para os linfonodos pélvicos estão presentes em menos de 5% dos tumores nos graus 1 e 2 com invasão superficial do miométrio; aproximadamente 15% dos tumores grau 1 e 2 com invasão profunda do miométrio ou tumores grau 3 com invasão superficial, e mais de 40% dos tumores no grau 3 com invasão profunda do miométrio²⁵. O nível de infiltração do miométrio em tumores no estágio IB, aparentemente não mostra diferença prognóstica entre os com infiltração menor do que um terço da espessura miometrial e entre um terço e metade, de modo que a linha de corte de 50% da espessura miometrial envolvida é a de uso corrente²⁶. O envolvimento cervical está associado a risco de aproximadamente 15% de metástases para os linfonodos pélvicos ou para-aórticos. O comprometimento neoplásico do estroma cervical constitui um dos fatores prognósticos preditivos de recidiva linfonodal junto com embolização vascular e linfonodos positivos ²⁷.

Cerca de 97% das neoplasias uterinas são epiteliais e os 3% remanescentes correspondem a neoplasias com componente mesenquimal. O adenocarcinoma endometriode é o tipo histológico mais frequente, seguido dos carcinomas seroso, de células claras, mucinoso, escamoso, de tipo misto e indiferenciado, de acordo com a classificação histológica⁵.

O carcinoma endometrial pode ser classificado em dois grupos distintos de acordo com sua etiopatogênese. O primeiro tipo e mais comum é estrogênio-dependente, comumente associado à hiperplasia endometrial complexa e ocorre em mulheres mais jovens, apresentando-se no tipo histológico endometriode, frequentemente bem diferenciado e costuma evoluir para metástases ganglionares, tendo, portanto, melhor prognóstico. O segundo tipo, em contraste, é próprio de mulheres mais idosas, negras, pobre em receptores hormonais, sem associação com fatores estrogênio-relacionados e, portanto, não associados à hiperplasia, apresentando-se, em geral, nos tipos histológicos seroso e de células claras, com metástases linfáticas frequentes e com pior prognóstico^{5,28,29}. Estes dois grupos foram denominados, respectivamente, tipos I e II. O tipo I, hormônio-relacionado, tem como protótipo histológico o carcinoma endometriode e apresenta mutação precoce no gene supressor PTEN. O tipo II tem como protótipos os carcinomas serosos e de células claras, e se associa a mutação precoce no gene supressor p53⁵. A histologia de tipo não endometriode é hoje considerada um dos fatores mais importantes no aumento das taxas de mortalidade²⁰.

2.2 Angiogênese e Linfangiogênese

2.2.1 Aspectos Históricos da Linfangiogênese

O primeiro relato de estruturas linfáticas foi de Hipócrates, acreditando que esses tecidos pudessem ser glândulas. Aristóteles, posteriormente, descreveu os vasos linfáticos. E, finalmente, Gasper Aselli, no século XVII, mais especificamente em 1627, fez a primeira caracterização sistemática do sistema linfático^{30,31,32}. Quase no

mesmo período, William Harvey descreveu a circulação sanguínea³³.

Alguns anos mais tarde, Louis Petit fez a primeira descrição da disseminação metastática através de vasos linfáticos ao observar metástases de tumor de mama em linfonodos axilares^{30,31}. A mesma relação foi citada anteriormente pelo cirurgião francês Le Dran, no século XVI, que observou a pior sobrevida nas pacientes com câncer de mama e disseminação para linfonodos axilares do que as que apresentavam apenas doença local³⁴.

Somente no final do século XX, na década de 90, foi identificada a presença do linfonodo sentinela, ou seja, o primeiro linfonodo da drenagem linfática do tumor primário, através do estudo de mapeamento linfático nas neoplasias. Esta descoberta foi identificada pela primeira vez em melanomas, mas atualmente é utilizada em outras neoplasias, e permitiu, por exemplo, a realização de cirurgias mais conservadoras em tumores de mama, ao contrário das cirurgias radicais, utilizada por vários anos³⁴.

A princípio, acreditava-se que os vasos linfáticos estariam apenas no tecido peritumoral e ausente dentro do tumor maligno. Desta forma, havia o conceito que a disseminação linfática tumoral se daria exclusivamente pela invasão dos vasos linfáticos peritumorais pré-existentes e não por um processo de linfoangiogênese³⁵. Havia incerteza se o tumor realmente poderia estimular a linfangiogênese ou se a metástase tumoral estimularia o sistema linfático³⁶.

Alguns estudos foram realizados com intuito de esclarecer o verdadeiro papel da linfangiogênese na metástase tumoral, porém não conseguiram provar a presença de uma fonte intrínseca linfática intratumoral³⁶; o que poderia ser explicado pelo aumento da pressão pela proliferação tumoral que levaria ao colapso destes vasos. Entretanto, ainda havia o pensamento que os

linfáticos pré-existentes teriam sido estimulados pelas células cancerígenas ao invés de novos linfáticos formados pelo tumor³⁷.

2.2.2 O desenvolvimento do sistema linfático

O estudo sobre o desenvolvimento do sistema linfático não se deu na mesma velocidade que o sistema sanguíneo e apenas três décadas mais tarde, teorias sobre seu desenvolvimento começaram a surgir³⁸.

De maneira análoga, o sistema linfático inicia seu desenvolvimento no embrião no final da quinta semana de gestação. Duas semanas depois da formação do sistema sanguíneo – o primeiro a se formar no desenvolvimento embrionário, sendo considerado um pré-requisito neste processo^{39,40}.

Da sexta até a nona semana, há formação de dilatações dos canais linfáticos, explicado pela migração de células endoteliais sanguíneas, sendo o primeiro denominado saco linfático primário, formado na região jugular. Outros sacos vão sendo formados próximos as grandes veias do embrião, caracterizando a formação do sistema vascular linfático periférico pela teoria centrífuga⁴¹.

Existem duas teorias sobre o desenvolvimento do sistema linfático. A primeira, mais aceita, é a teoria centrífuga, proposta por Florence Sabin, no início do século XX ao estudar morfológicamente fetos suínos. Esta teoria sugere que no desenvolvimento embrionário, os sacos linfáticos primitivos seriam originados por brotamento de células endoteliais a partir de veias do embrião. Dessa forma, os vasos linfáticos periféricos se proliferariam pelos tecidos e órgãos e dariam origem aos capilares linfáticos⁴².

A segunda teoria, dada por Huntington and McClure, baseada pelo desenvolvimento linfático em aves, ao contrário,

sugeria que os vasos linfáticos primitivos surgissem do mesênquima a partir de linfangioblastos independentes das veias, crescendo centripetamente e estabelecendo conexões com as veias mais tardiamente. Entretanto, este processo não pode ser comprovado em mamíferos⁴³.

2.2.3 Aspectos microscópicos da angiogênese

A formação do sistema vascular envolve uma verdadeira cascata que inclui a diferenciação de células endoteliais progenitoras e a formação dos plexos capilares primários, denominada vasculogênese e a angiogênese, ou seja, a formação de novos capilares através de vasos pré-existentes³⁹.

Histologicamente, a formação dos capilares sanguíneos é composta basicamente pelas células endoteliais e pela presença de uma membrana basal que as envolve. Nos vasos de maior calibre, ainda existe o reforço pela camada muscular e adventícia⁴⁴.

Nos últimos anos, diversos marcadores foram descobertos. Merecem destaque na prática a catepsina D 34, o CD 34, e a família do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF)⁴⁰.

2.2.4 Aspectos microscópicos da linfangiogênese

A linfangiogênese pode ser definida como o crescimento e a formação de novos vasos linfáticos, que ocorrem normalmente em processos fisiológicos e em patológicos, como no inflamatório, linfedema e no câncer^{38,45,46}.

O sistema linfático consiste em uma rede hierárquica de vasos, que começam de capilares formados por uma única camada de células endoteliais linfáticas a vasos de maior diâmetro e que eventualmente se conectam ao sistema venoso. Difere do

sistema vascular sanguíneo por ser descontínuo e apresentar uma membrana basal incompleta nos vasos iniciais, tornando-se um caminho para disseminação de células malignas^{13,38}.

O real avanço no estudo da linfoangiogênese se deu com a descoberta de novos marcadores específicos ao endotélio linfático, incluindo a podoplanina (mucoproteína transmembrana) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), principalmente o receptor 3 que, com a realização de mais estudos, poderão comprovar o verdadeiro papel da linfoangiogênese na metástase tumoral.

2.3 Mecanismo Molecular da Linfoangiogênese

A angiogênese e a linfoangiogênese tem papel fundamental no desenvolvimento fisiológico e na presença de alterações patológicas em seres humanos, tendo, por isso, relevância no estudo de ações terapêuticas^{47,48}.

As características de um marcador ideal seriam as seguintes: “expressar somente o tipo celular de interesse; estar ausente em demais células; ter um bom *ratio* com tecidos vizinhos; expressar um nível uniforme em todos os seguimentos vasculares durante todos os estágios de desenvolvimento e doença, em todas as espécies estudadas e ser resistente a diversas condições de fixação. Entretanto, são poucos os existentes com estas características”⁴⁸.

Algumas questões devem ser consideradas em se tratando de marcadores em linfoangiogênese, uma vez que é sabido que as células linfáticas endoteliais não são homogêneas e mostram variações de acordo com sua localização e função. Ademais, existem marcadores em comum tanto com células vasculares endoteliais quanto com células progenitoras hematopoiéticas. A intensidade de expressão ainda pode variar com as condições de

crescimento do tecido e com a exposição a condições fisiológicas ou patológicas⁴⁸.

Como exemplo, podemos citar o CD31 ou PECAM-1 (célula endotelial plaquetária de adesão molecular), que é uma glicoproteína de membrana, marcador pan-endotelial, presente em vasos sanguíneos e linfáticos. Forte expressão em capilares, cavidades, pequenos e grandes vasos, com fraca reatividade em cavidades hepáticas e sinusoides esplênicos e em vasos linfáticos^{48,49}.

Diante da presença de inúmeros marcadores de células vasculares endoteliais identificados atualmente foi observada a necessidade de se obter os marcadores mais específicos de linfáticos possíveis, para que não houvesse falsas conclusões. O desenvolvimento linfático está relacionado à expressão do fator de transcrição LYVE-1, Prox-1, ao fator de crescimento endotelial C (VEGF-C) e seu receptor, o VEGFR-3, além da contribuição de várias proteínas^{50, 51,52}.

O LYVE-1 (receptor endotelial de vaso linfático), proteína integral de membrana, homóloga ao receptor de ácido hialurônico (CD 44), participa de processos inflamatórios, em macrófagos e em progressão tumoral ⁵¹. Pode se dizer que o LYVE-1 fornece o primeiro indicador da competência endotelial linfática⁴⁰. É expresso em endotélio de pequenos vasos sanguíneos, porém em adultos permanece elevado apenas em capilares linfáticos⁵³.

O LYVE-1 é utilizado largamente como marcador específico para vasos linfáticos, entretanto alguns estudos demonstraram sua expressão em sinusoides hepáticos, em células de Kupfer no parênquima hepático, células de Langerhans, sinciciotrofoblasto placentário, nos neurônios do córtex cerebral, entre outros⁴⁹.

Prox-1, "Prospero related homeobox gene", é um produto do gene homeobox, sendo fundamental para determinação da

identidade da CEL. É expresso desde o desenvolvimento embriológico e participa da formação de novos vasos linfáticos a partir de vasos sanguíneos pré-existentes. Também é encontrado na retina de embriões vertebrados, sistema nervoso central, pâncreas e fígado. Tem se mostrado útil como marcador linfático quando pareado com outros, como o LYVE-1 e a podoplanina^{49,53,54}.

Os marcadores que compõem a família dos fatores endoteliais de crescimento vascular (VEGF), descoberto em 1989, são expressos desde o princípio da angiogênese e têm se revelado como importantes marcadores da formação vascular sanguínea e linfática em processos fisiológicos e patológicos³⁹. Desde sua descoberta, muitos fatores de crescimento vascular foram identificados e os que principalmente compõem esta família são VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E e PlGF (fator de crescimento placentário). Para sua interação com o angiogênese e linfangiogênese, existem três receptores tirosino-quinase identificados em mamíferos, que são: VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3. Sendo este último, ativado pelos fatores C e D, o principal envolvido com a linfangiogênese, induzindo a proliferação e migração de CELs^{38,55}.

O VEGFR-3 possui atividade tirosino-quinase que é predominantemente expressa em CEL em tecidos adultos^{56,57}. A expressão de VEGFR-3 tem sido encontrada em capilares fenestrados de diversos órgãos como medula óssea, sinusoides hepáticos e esplênicos, glomérulos renais, glândulas endócrinas e células endoteliais em proliferação neovascular em câncer de mama. Entretanto, em alguns estudos, o receptor VEGFR-3 não se mostrou tão específico ao endotélio linfático, uma vez que é expresso tanto em vasos sanguíneos, como linfáticos em tumores⁵⁷.

A podoplanina, descoberta na década anterior é um marcador específico, porém não exclusivo para o endotélio

linfático e não é expressa em vasos sanguíneos^{54,58}. Trata-se de glicoproteína de superfície tipo mucina, com extensa O-glicosilação e peso molecular de 38Kd. Contém ácido siálico e está presente em células osteoblásticas, células da granulosa em ovário, células dendríticas, pneumócitos tipo I e podócitos renais. Entretanto, a podoplanina é encontrada ainda em vasos linfáticos de pequeno calibre, mas não nos grandes que contêm células musculares lisas⁵⁹. É detectada em capilares linfáticos, sacos linfáticos coletores e sinusoides hepáticos, mas não em grandes vasos linfáticos com células perivasculares, nem em vênulas endoteliais de linfonodos. A especificidade da expressão da podoplanina no endotélio linfático e não no vascular sanguíneo, tem sido demonstrada e sua relação com a progressão tumoral tem sido sugerida^{10,25,27,60,61}.

2.3.1 Linfangiogênese e sua relação com câncer

A angiogênese tem seu papel bem definido quanto à progressão e metástase de várias neoplasias malignas no homem³⁵. Entretanto, estudos que provem o impacto da densidade microvascular linfática em metástases são de pequena monta, uma vez que eram escassos os números de marcadores específicos para o endotélio linfático.

Com a descoberta de novos marcadores específicos para a avaliação do endotélio linfático, incluindo a podoplanina, estudos em linfoangiogênese em diversos órgãos foram possibilitados.

Sabe-se que a disseminação metastática do tumor primário é um importante fator que afeta negativamente o prognóstico na maioria dos tumores, diretamente relacionado com o status linfonodal⁶².

As neoplasias malignas podem se disseminar para linfonodos regionais pela invasão de linfáticos pré-existentes na periferia do

tumor ou pela produção de fatores linfoangiogênicos induzindo a formação e invasão de linfáticos dentro do tumor. A extensão da metástase tumoral seria diretamente proporcional a estimulação desta atividade angiogênica e linfoangiogênica^{31,45,63,64}.

A interpretação prognóstica e funcional dos vasos linfáticos intratumorais e peritumorais ainda se mantém controversa nos muitos cânceres humanos.

Em tumores de pulmão tipo não pequenas células, Renyi-Vamos et al. (2005) demonstraram que a linfoangiogênese ocorre em um tipo específico deste tumor e que a densidade vascular linfática se correlaciona com o comportamento clínico neste tipo fenotípico – o tipo angiogênico, no qual a maior densidade vascular linfática é expressa no tecido peritumoral. Entretanto, houve maior risco de metástase linfonodal e menor sobrevida no grupo não angiogênico, no qual os vasos linfáticos são incorporados ao tumor e funcionariam melhor que os linfáticos neoformados⁶⁵.

Nos melanomas cutâneos, Massi e cols. (2006), utilizando a podoplanina e o VEGF-C como marcadores do endotélio linfático, demonstraram que melanomas com linfonodo sentinela positivo, apresentavam maior densidade vascular linfática peritumoral e intratumoral que os não metastáticos. Além disso, evidenciou que os linfáticos intratumorais seriam os mais significativos fatores predizendo a metástase para linfonodo sentinela⁶⁶.

Liu et al. (2008) também demonstraram a relação entre alta densidade vascular linfática e a presença de metástase linfonodal nos melanomas malignos, identificando maior número de linfáticos peritumorais no grupo metastático⁶⁷.

Matsumoto et al. (2006), estudando densidade vascular linfática em cânceres colorretais, demonstraram que a avaliação dos linfáticos intratumorais pela microdensidade vascular linfática, é fator prognóstico independente nestes tumores. Além disso, foi

observado que quanto maior grau de linfangiogênese, maior invasão de vasos linfáticos. Portanto, a linfangiogênese aumentaria a entrada das células tumorais ao sistema linfático⁶⁸.

Estudando metástase linfonodal em câncer gástrico, Nakamura e cols. (2006), encontraram correlação entre a densidade vascular linfática e a metástase linfonodal, sugerindo que esta metástase possa ser alcançada através da formação e invasão de novos linfáticos tanto intra quanto peritumoral⁶⁹.

Em tumores de células escamosas de cabeça e pescoço, Kyzas et al. (2005), evidenciaram a que a densidade linfática intratumoral pode representar um útil fator prognóstico nestes tumores⁷⁰.

Roma et al. (2006), estudando adenocarcinomas de próstata, evidenciaram que a densidade vascular linfática é reduzida no compartimento intratumoral comparada ao peritumoral; havendo, portanto, melhor correlação entre invasão linfática peritumoral e metástase linfonodal⁷¹.

Em tumores de células transicionais da bexiga, Miyata e cols. (2006) demonstraram a correlação positiva entre densidade vascular linfática e o grau do tumor. E a primeira também seria fator preditivo para sobrevida livre de doença⁶².

Cunlik et al. (2008), estudando adenocarcinomas ductal invasivo e lobular de mama, apesar de não haverem identificado associação com grau do tumor, tipo histológico e prognóstico, mostraram que houve maior expressão de marcadores endoteliais linfáticos no tecido tumoral em relação ao tecido normal e maior expressão nos tumores com metástase para linfonodos regionais que nos não metastáticos⁷².

Nas neoplasias epiteliais de ovário, Biner e cols. (2000), demonstraram que não havia relação entre a microdensidade vascular e sobrevida total ou livre de doença⁷³. Posteriormente,

Sundar et al. (2006), corroboraram com este estudo ao não encontrar significado prognóstico na disseminação linfática⁷⁴.

Nas lesões iniciais invasivas da cérvix uterina, Zhang et al. (2009), demonstraram que a densidade vascular linfática é maior nas lesões invasivas que no tecido normal e se correlaciona com múltiplos fatores clínico-patológicos como metástase linfonodal, invasão linfática e grau histológico⁷⁵.

Nas lesões pré-invasivas e invasivas de colo uterino, Longatto-Filho et al. (2007), sugerem que a proliferação linfática ocorre fortemente em lesões pré-invasivas; havendo correlação positiva entre densidade vascular linfática e invasão linfática⁷⁶.

Steffanson et al. (2006), em estudo de 316 pacientes com diagnóstico de carcinoma endometrial seguidas na Noruega, evidenciaram associação entre aumento da densidade vascular linfática peritumoral e carcinomas endometriais de alto grau, relacionados com pior prognóstico⁷⁷.

Em adenocarcinomas de endométrio, Balbi et al. (2006), identificaram que havia relação entre a expressão do marcador VEGF e a microdensidade vascular com a invasão vascular linfática e o status linfonodal⁷⁸. De forma adicional, Donoghue et al. (2007), no adenocarcinoma endometrial, relatam que houve elevação da densidade vascular peritumoral associadas com aumento da expressão dos marcadores VEGF-C e -D e com a invasão vascular linfática nos carcinomas de alto grau⁷⁹.

2.3.2 Diferença entre Vasos Sanguíneos e Vasos Linfáticos: Aspectos Morfológicos

Embora o sistema vascular sanguíneo e o linfático sejam formados por uma camada de células endoteliais, eles diferem bastante entre si. O sistema vascular sanguíneo é fechado, sendo formado por um sistema circulatório, que contém uma bomba

cardíaca, artérias, capilares e veias. Ao contrário, o sistema linfático é aberto, se inicia em túbulos de fundo cego, unidirecional, que flui de forma contrária ao fluxo sanguíneo⁵³. O sistema linfático representa uma via acessória, através do qual os líquidos conseguem fluir do espaço intersticial para dentro do sangue. E, ainda mais importante, os linfáticos podem carrear proteínas e grandes partículas de matéria para longe dos espaços teciduais, os quais não poderiam ser removidos por absorção direta e penetrar no capilar sanguíneo⁸⁰.

As células endoteliais linfáticas (CEL) nos capilares se ancoram nas fibras colágenas na matriz extracelular através de fibras elásticas, que mantêm os vasos patentes e são responsáveis pelo aumento do diâmetro luminal dos linfáticos, quando o volume de fluido intersticial está aumentado⁵³.

Os capilares linfáticos não contêm uma membrana basal contínua e apresentam poros intercelulares ("gaps"), que permitem a permeabilidade de fluidos e células imunológicas, como as células dendríticas e de Langerhans⁵³. Devido a essa característica estrutural, torna-se mais fácil a entrada da célula tumoral no sistema linfático quando comparada ao sanguíneo.

2.4 Características do Sistema Linfático do Endométrio

As primeiras descrições do sistema linfático uterino eram feitas através de técnicas histológicas e de coloração. No miométrio existe consenso sobre a existência de uma rede de vasos linfáticos de vários tamanhos^{81,82}.

Existem poucos recentes trabalhos em linfangiogênese de endométrio. Na literatura há uma divergência entre os autores quanto à distribuição dos linfáticos do endométrio. Alguns

acreditam que existam linfáticos em ambas camadas basal e funcional, enquanto outros, apenas na basal. Donoghue et al. (2007), ao analisarem endométrios durante o ciclo menstrual, demonstraram que existe maior densidade vascular linfática na camada basal do endométrio com a presença de 13% de todos os vasos linfáticos localizados na camada funcional, enquanto 43% deles estariam localizados na camada basal⁷². Corrobora com este estudo, Rogers et al. (2008 e 2009), que identificaram densidade vascular linfática cerca de 4 a 5 vezes mais alta na zona basal do que na funcional. Neste mesmo estudo, Rogers et al. (2008), descreveram a mesma distribuição de fatores de crescimento entre as camadas basal e funcional, sem relação com a densidade vascular encontrada^{83,84}.

Em contraste, Uchino et al. (1987) haviam descrito somente a camada basal como fonte de linfáticos no endométrio^{82,84} e Koukourakis et al. (2005), utilizando LYVE-1 como marcador linfático, não identificaram linfáticos em tecido endometrial humano⁸⁵.

2.5 Métodos Imunoistoquímicos de Avaliação da Linfangiogênese

Como descrito por Weidner et al. (1991), a técnica mais utilizada para avaliação da densidade vascular linfática associada ao tumor, ao que se procede igualmente com os vasos sanguíneos, é a contagem de vasos marcados pela técnica imunoistoquímica⁸⁶.

A densidade microvascular (número de vasos por milímetro quadrado)⁷⁹ é determinada pela contagem de vasos em áreas denominadas "hot spots", em que há maior imunofluorescência dos vasos, ou em áreas que aparentam, em menor ampliação, conter inúmeros microvasos. Entretanto, a maior fragilidade estaria em se localizar estas áreas de maior densidade, os "hot spots", que dependem da experiência do investigador⁸⁷.

Shields et al. (2004), questionaram a utilização destas áreas de maior densidade vascular para contagem de vasos ao invés de uma contagem total dos vasos linfáticos, uma vez que a associação entre linfangiogênese e hipóxia continuam contraditórios⁸⁸.

Ainda observador-dependente, pela escolha da área de maior densidade vascular, existem outras técnicas de contagem de vasos linfáticos, como a técnica de Chalkley, utilizada por Hall et al. (2003), no qual um graticulo contendo 25 pontos posicionados aleatoriamente, é colocado sobre a área selecionada e, ao invés da contagem individual dos microvasos, é feita a contagem dos pontos cobertos pelo vaso⁸⁹. A técnica de “point-counting” também pode ter auxílio de um retículo contendo 100 pontos e 50 retas proposto por Gundersen et al. em 1988⁹⁰.

De maneira mais objetiva, a imagem citométrica com auxílio de softwares de análise de imagens que permitem o processamento e cálculo em imagens digitalizadas, e determinação de variáveis como área e perímetro de estruturas não geométricas. Tem como desvantagem a necessidade de equipamentos especializados para realização da análise, além de poder haver inclusão de outras estruturas estromais na amostra que não vasculares linfáticas. Em estudo realizado por Choi et al. (2005) para avaliação da densidade vascular linfática em carcinomas de mama, comparando a técnica visual e de imagem citométrica, mostrou que somente pela primeira técnica houve associação com status linfonodal e expressão gênica da família VEGF⁹¹.

2.6 Podoplanina como Marcador da Célula Endotelial Linfática

A podoplanina ou antígeno E11 foi primeiramente identificada em células osteoplásticas^{90,92} foi descoberta na célula endotelial linfática por Wetterwald e cols. (1996). Foi assim

denominada pelo baixo nível de expressão de podócitos no corpúsculo renal, estando envolvida no processo de formação dos pés do podócito e de manutenção da permeabilidade glomerular. É uma mucoproteína de membrana, consistindo de uma porção transmembrana, de um domínio extracelular e pequena parte citoplasmática, sendo sintetizada por um gene funcionante, localizado na membrana citoplasmática, existindo duas espécies de podoplanina mRNA^{93,94,95,96,97}. Em cultura de células endoteliais, a podoplanina pode promover adesão celular, migração, e formação tubular⁹⁸.

O método de escolha para sua avaliação da expressão tem sido a técnica imunoistoquímica, baseada na utilização de anticorpos específicos contra a podoplanina, como o anticorpo D2-40, que reage com o antígeno oncofetal M2A de membrana^{97,99} e é expresso pela microscopia eletrônica normalmente na face luminal das células endoteliais linfáticas e mais raramente nas organelas citoplasmáticas destas células^{100,101}.

A podoplanina tem sido considerada um marcador linfático específico, por não influenciar a formação dos vasos sanguíneos⁹⁸, mas não exclusivo do endotélio linfático, podendo ser expresso em outros tecidos humanos normais, como em podócitos renais, células alveolares pulmonares, células dendríticas, células da granulosa do ovário, células epiteliais do plexo coroide, miofibroblastos da próstata, entre outros^{10,93}.

Em um estudo de revisão, Kalof et al. (2009), mostraram que o marcador D2-40 pode ser expresso, além do endotélio linfático, em vários tipos de células e de neoplasias como, por exemplo, em linfangioma, sarcoma de Kaposi, hemangioblastoma, seminoma e schwannoma¹⁰².

Raica et al. (2008), em estudo de revisão de literatura, demonstraram dados controversos na expressão da podoplanina no ambiente peritumoral e intratumoral em diversos sítios, não

podendo determinar maior importância de uma área em relação a outra. Entretanto, enfatizam a utilização da podoplanina não apenas na avaliação da microdensidade vascular, mas também, como marcador na invasão linfovascular⁵⁸.

2.7 O Papel da Podoplanina no Mecanismo de Invasão e Metástase

Dumoff et al. (2005), em estudo retrospectivo envolvendo 138 casos de biópsias cervicais com diagnóstico de carcinoma espinocelular de colo de útero inicial, identificaram relação entre a baixa expressão do anticorpo D2-40 em células tumorais e a presença de invasão linfática e metástase linfonodal¹⁰³.

Em estudo de revisão de literatura, Wicki e cols. (2007), citando estudos de cultura de células normais e neoplásicas, demonstraram que a invasão de células expressando podoplanina estava correlacionada com a superexpressão de metaloproteinases da matriz, sugerindo que a expressão da podoplanina em cânceres humanos promove migração e invasão tumoral coletiva mesmo na ausência da transição epitélio mesênquima (TEM)¹⁰⁴.

Em estudo transversal retrospectivo de Ordóñez (2005), utilizando o anticorpo D2-40 para avaliação da especificidade e sensibilidade da podoplanina para mesoteliomas malignos, incluindo neste trabalho amostras de carcinomas de vários sítios, sendo 5 casos de adenocarcinomas endometrioides de endométrio, não identificaram a expressão de podoplanina em nenhum dos carcinomas, marcando apenas os mesoteliomas¹⁰⁵.

Entretanto, Donoghue et al. (2007), em estudo transversal retrospectivo, evidenciaram maior densidade vascular linfática intratumoral em adenocarcinomas endometriais grau I e III em comparação com endométrio funcional, mesmo sendo a densidade peritumoral a maior em ambos os grupos. Além disso, foi

demonstrado que nos adenocarcinomas de grau I, havia presença de estruturas glandulares complexas entrelaçadas a projeções semelhantes a miofibroblastos, onde foram identificados tanto microvasos sanguíneos como linfáticos. Estas projeções se mostraram reduzidas nos tumores grau III.

Ainda neste estudo, os vasos relacionados com invasão do espaço linfovascular, ou seja, aqueles que apresentavam embolia tumoral, foram encontrados entre o tumor endometrial, expressando fortemente o anticorpo D2-40⁷⁹.

3 . OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

1. Avaliar o valor prognóstico da microdensidade vascular linfática (MDVL) intratumoral em adenocarcinomas primários de endométrio, através da quantificação de vasos pela expressão imunistoquímica da podoplanina.

3.2 Objetivos Específicos

1. Realizar associação entre as características clínico-patológicas relacionadas aos carcinomas primários de endométrio (idade, estadiamento cirúrgico; tipo histológico; grau histológico; comprometimento vascular; extensão na cavidade uterina; infiltração miometrial; comprometimento da serosa; do colo de útero; da vagina e dos anexos; peritônio/omento, citologia peritoneal) e da MDVL com o estado linfonodal e o desfecho;
2. Avaliar a expressão de podoplanina em células neoplásicas e células fibroblásticas do estroma intratumoral e sua relação com o comprometimento linfonodal e desfecho;
3. Determinar os eventuais fatores preditivos de comprometimento de linfonodos para-aórticos e desfecho.

4 . CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 Casuística

Este trabalho foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital “Professor Doutor João Sampaio Góes Júnior” – Instituto Brasileiro de Controle do Câncer (IBCC) e pela Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq)(Anexo 1).

Realizou-se estudo observacional retrospectivo, no qual foram estudadas pacientes com adenocarcinoma primário de endométrio tratadas no IBCC, no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2008.

No total de 200 prontuários pesquisados, foram incluídas 57 pacientes com carcinoma estádios I a III de acordo com a classificação da FIGO 1988¹⁰⁶, submetidas a tratamento cirúrgico que incluiu a excisão total do tumor e amostragem de linfonodos regionais, e que tivessem blocos de parafina disponíveis. Foram excluídas as que receberam qualquer tipo de tratamento radioterápico ou quimioterápico neoadjuvante.

As pacientes foram divididas em dois grupos: Grupo A com linfonodos regionais negativos (n=35), e Grupo B com linfonodos regionais positivos (n=22).

Do prontuário foram coletados: idade da paciente, estadiamento segundo a FIGO, tipo de cirurgia realizada, evolução com tempo de seguimento e desfecho, segundo protocolo de pesquisa (Anexo 2).

Todos os dados coletados foram primeiramente incluídos em banco de dados eletrônico no programa Excel Microsoft Office 2007 e, depois de finalizada a coleta, todos os registros que permitissem qualquer possibilidade de identificação das pacientes foram apagados, tornando-as anônimas (Anexo 3).

4.2 Métodos

4.2.1 Método Anatomopatológico

As seguintes informações foram recuperadas a partir do laudo anatomopatológico original:

- Nível de infiltração miometrial: intraendometrial, infiltração de <50% da espessura endometrial, infiltração >50% da espessura miometrial;

- Extensão neoplásica para o colo uterino, vagina, serosa uterina e anexos: sim ou não;
- Comprometimento de omento: sim ou não;
- Comprometimento peritoneal: sim ou não;
- Estado dos linfonodos pélvicos: sim ou não;
- Estado do linfonodos para-aórticos: sim ou não;
- Características do endométrio não neoplásico: atrófico, hiperplásico, normal;
- Citologia peritoneal: positiva ou negativa.

Todos os casos foram revisados, inicialmente, no Departamento de Patologia do Instituto Brasileiro de Controle do Câncer (IBCC) pela Dra Eloá Muniz de Freitas Alves, onde foram selecionados os cortes mais representativos dos tumores. Estes foram enviados para o Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para re-análise, estabelecimento de consenso acerca das variáveis histológicas e seleção de área representativa do tumor para construção de blocos de microarranjos de tecidos (TMA) para os estudos imunoistoquímicos. Esta etapa foi realizada pelo Dr. Bernardo G. L. Almeida e Prof. Dra. Filomena M. Carvalho.

Foram analisadas as seguintes variáveis histológicas:

1) Tipo histológico segundo critérios da Organização Mundial de Saúde¹⁰⁷:

- a) Endometriode (Figura 1)
- b) Mucinoso
- c) Seroso (Figura 2)
- d) Células claras (Figuras 3 e 4)
- e) Misto
- f) Indiferenciado

Figura 1: Adenocarcinoma endometriode, grau 1 histológico, caracterizado pela presença de glândulas de formas variáveis, revestidas por epitélio irregularmente estratificado, com atipia discreta (hematoxilina-eosina – aumento original 100X)

Figura 2: Adenocarcinoma seroso do endométrio com projeções papilares compostas por células com pleomorfismo nuclear (hematoxilina-eosina - aumento original 400X).

Figura 3: Carcinoma de células claras com padrão sólido, composto por células com intenso pleomorfismo nuclear e citoplasma claro (hematoxilina-eosina - aumento original 400X)

Figura 4: Carcinoma de células claras com padrão glandular, exibindo células com núcleos hipercromáticos, salientes no contorno glandular, com citoplasma escasso (hematoxilina-eosina – aumento original 100X).

2) Grau Histológico segundo os seguintes sistemas:

1. FIGO¹⁰⁶: Aplicado aos tipos histológicos endometrioides e mucinoso e baseado na proporção de áreas sólidas não escamosas ou morulares. Tumores com até 5% de áreas sólidas são graduados como 1; com 6 a 50% de áreas sólidas são graduados como 1; com 6 a 50% de áreas sólidas (Figura 5), como grau 2; e com mais de 50% de áreas sólidas como grau 3. Núcleos intensamente pleomórficos elevam o grau 1 para 2 e o grau 2 para 3.

Figura 5: Adenocarcinoma endometriode, grau 1 histológico, com glândulas irregulares revestidas por células com discreto pleomorfismo nuclear (hematoxilina-eosina – aumento original 400X)

2. Sistema de Vancouver¹⁰⁸: Baseado nos sistemas de Nottingham para os carcinomas de mama¹⁰⁹ e de Silverberg para o ovário¹¹⁰. São avaliadas a arquitetura, pleomorfismo nuclear e contagem mitótica (Tabela 1).

Tabela 1 – Cálculo do grau segundo critérios do sistema de Vancouver¹⁰⁸

Escore arquitetural		Escore nuclear		Escore mitótico	
Arquitetura	escore	Atipia nuclear	escore	Contagem mitótica*	escore
Glandular	1	Leve ou moderada	1	≤ 11	1
Sólida ou papilífera	2	Intensa	2	>11	2
Escore total				Grau final	
3-4				Baixo grau	
5-6				Alto grau	

* Ajustado para microscópio com campo de maior aumento de 0,48 mm de diâmetro

- 3) Grau nuclear: Avaliação subjetiva considerando volume nuclear, forma, variações no tamanho, contornos, distribuição da cromatina, presença e tamanho do nucléolo, e atividade mitótica. Núcleos ovalados, pouco variáveis, pouco aumentados, com nucléolo inaparente ou pequeno e basofílico, foram classificados como grau 1. A forma arredondada do núcleo, com cromatina dispersa e nucléolos evidentes foram classificados como grau 2. Núcleos volumosos, com significativa variação de forma e volume, cromatina vesiculosa e nucléolos volumosos e geralmente eosinofílicos foram classificados como grau 3.

- 4) Comprometimento vascular peritumoral: avaliado no miométrio circunjacente ao tumor.

4.2.2 Construção dos Blocos de Microarranjos de Tecidos – “Tissue Microarray” (TMA)

O procedimento foi realizado pela Consultoria em Patologia, de Botucatu (SP) sob orientação do Prof. Carlos E. Bacchi (diretor da Consultoria em Patologia) e da Prof. Dra. Filomena M. Carvalho (Departamento de Patologia da FMUSP). Foi retirado um cilindro de 2,0 mm da área selecionada do tumor, em cada bloco de parafina, designado bloco doador. Estes cilindros foram enxertados em um bloco de parafina receptor em linhas e colunas com um intervalo de 1,0 mm entre cada cilindro, obedecendo à orientação de um mapa de planejamento previamente desenhado. Foi utilizado um instrumento de precisão para construção de TMA do fabricante *Beecher Instruments, Silver Spring, MD*, posicionado em bancada fixa para trabalho. Depois que os cilindros foram todos inseridos no bloco receptor, este foi aquecido por 10 minutos, à temperatura de 60°C. A seguir, foram cortadas fitas de 3µm dos blocos em micrótomo convencional para confecção dos

preparados histológicos, utilizando lâminas apropriadas da marca *Starfrost* ®slides, com técnica padronizada.

Os primeiros cortes histológicos foram corados pela técnica da hematoxilina-eosina (Figuras 6 e 7). A seguir, foram efetuados os cortes histológicos para realização das reações imunoistoquímicas para podoplanina e do marcador de atividade proliferativa Ki-67.

Figura 6: Lâmina com corte histológico obtido de bloco de microarranjos de tecido com 30 amostras de tumores, corado pela técnica de hematoxilina-eosina.

Figura 7: Detalhe de um dos casos incluídos em bloco de microarranjos de tecido, representado por corte histológico de adenocarcinoma endometriode corado pela técnica da hematoxilina-eosina.

4.2.3 Método Imunoistoquímico

Cortes histológicos dos TMA com espessura de 3 micrometros foram estendidos em lâminas de vidro previamente tratadas pelo adesivo poli-D-lisina (Sigma Chemical Cooperation, EUA) para evitar o descolamento dos mesmos durante a imunocoloração.

Os cortes foram mantidos em estufa por 4 horas e, a seguir, submetidos à desparafinização com quatro banhos sucessivos de xilol seguida de passagem em álcool etílico-absoluto (4 banhos), lavagem com solução salina tamponada (PBS) e bloqueio da peroxidase endógena com solução de H_2O_2 a 3%.

Os métodos de recuperação antigênica utilizados para os dois antígenos investigados foram:

- 1) Ki-67: Pelo calor em panela de pressão por 8 minutos, com lâminas incubadoras em solução de ácido cítrico 0,21%, pH 6,00.
- 2) Podoplanina: Pelo calor em forno de microondas por 15 minutos, com lâminas incubadas em solução de ácido cítrico 0,21%, pH 6,00.

A seguir as lâminas foram incubadas com os anticorpos primários "overnight":

- 1) Ki-67: Clone MIB-1 (Ref: M7240-DAKO), diluição 1:4800.
- 2) Podoplanina: Clone D2-40 (Ref: M3619-DAKO), diluição 1:400.

Após lavagem em PBS, as lâminas foram incubadas por 30 minutos com o anticorpo secundário por 30 minutos, seguindo-se do sistema de detecção com NovoLink polímero da Novocastra (Ref: 7161).

Após nova lavagem com PBS, as lâminas foram tratadas com solução de 3,3 diaminobenzidina (DAB Sigma, St Louis, EUA, Ref: 5637), diluída em TRIS-HCl-IM, pH 7,4 aquecida de H₂O₂ durante 5 minutos.

Após nova lavagem em água corrente e água destilada, os cortes foram contracorados pela Hematoxilina de Mayer e, a seguir, desidratados em cadeia crescente de etanóis, diafanizados

em xilol, montados em resina para microscopia e examinados em microscópio de luz.

4.2.4 Interpretação Imunoistoquímica

As reações foram interpretadas avaliando-se toda a superfície do tumor presente nos TMAs.

Para a quantificação da linfangiogênese foi considerada a expressão de podoplanina no citoplasma das células endoteliais do estroma intratumoral. Foram também consideradas as colorações no citoplasma de células neoplásicas e no de células estromais tipo fibroblásticas para avaliação destes compartimentos. A positividade de podoplanina tanto em células neoplásicas como nas do estroma foi considerada positiva quando de intensidade moderada a forte em mais de 10% das células (Figura 8).

Figura 8: Estroma intratumoral com raras células estromais positivas para podoplanina (exame imunoistoquímico, D2-40 – aumento original 400X).

4.2.5 Método de Avaliação da Microdensidade Vascular (MDVL)

A quantificação da MDVL foi baseada nos princípios de análise morfométrica descritos por Weibel¹¹¹. Os preparados foram examinados em microscópio óptico marca Nikon, modelo Alphaphot, utilizando-se, para a contagem, objetiva de 40x e ocular de 10x. Foram considerados vasos linfáticos as estruturas coradas em marrom e com morfologia consistente com vaso, com ou sem lúmen (Figuras 11 a 15). Foram selecionados os 10 campos do tumor com maior densidade vascular para as contagens e calculou-se a média de vasos nos 10 campos.

Para fins de análise estatística, a mediana dos resultados foi considerada a linha de corte entre baixa e alta densidade vascular, conforme utilizado por Hall et al.⁸⁹.

Figura 9: Podoplanina em células endoteliais de vaso linfático no estroma de adenocarcinoma endometriode (exame imunoistoquímico, D2-40 – aumento original 400X).

Figura 10: Estroma de adenocarcinoma endometriode com três vasos linfáticos (exame imunoistoquímico, D2-40 – aumento original 400X).

Figura 11: Adenocarcinoma com área sólida e quatro vasos linfáticos no estroma (exame imunoistoquímico, D2-40 – aumento original 400X).

Figura 12: Adenocarcinoma endometriode, grau 1 histológico, com quatro vasos linfáticos no estroma (exame imunoistoquímico, D2-40 – aumento original 400X).

Figura 13: Adenocarcinoma endometrial, sólido na área representada, com seis vasos linfáticos no estroma (exame imunoistoquímico, D2-40 – aumento original 400X).

4.3 Método Estatístico

Os resultados foram apresentados em tabelas de contingência com as estatísticas descritivas para cada variável pesquisada e a sua associação com comprometimento linfonodal e desfecho, aplicando-se a estatística Qui-quadrado de Pearson¹¹².

Modelos de Regressão Logística Multinomiais^{113,114} foram ajustados para previsão de comprometimento de linfonodos e desfecho do caso. O método de ajuste empregado foi *Stepwise forward selection*, no qual as variáveis categorizadas foram introduzidas, uma a uma, até que o modelo final e respectivas estatísticas fossem obtidas. Somente as variáveis significativas foram

mantidas no modelo. Os valores de qui-quadrado foram obtidos através do cálculo do teste da razão de verossimilhança.

A metodologia de Kaplan & Meier^{115,116,117} foi aplicada para construção das curvas de sobrevida segundo a condição dos linfonodos. A estatística de Breslow¹¹⁶ foi usada para avaliação da diferença entre as curvas¹¹⁸.

O nível de significância adotado para o estudo foi de 5% ($p < 0,05$). Todos os resultados foram processados através de software Epi Info2000¹¹⁹.

5. RESULTADOS

As características clínico-patológicas e sua associação com comprometimento linfonodal e desfecho estão descritas nas tabelas 2 e 3, respectivamente.

Tabela 2 – Características clínico-patológicas relacionadas aos carcinomas primários de endométrio segundo comprometimento linfonodal (n=57)

Variáveis		Linfonodos			p ¹
		n(%)	Negativo (%)	Positivo (%)	
Idade	45 a 54	5(8,80)	4(80,00)	1(20,00)	0,620
	55 a 69	28(49,10)	16(57,10)	12(42,90)	
	>70	24(42,10)	15(62,50)	9(37,50)	
Estadiamento cirúrgico 1998	I	27(47,40)	26(96,30)	1(3,70)	<0,001
	II	6(10,50)	6(100,00)	0(0)	
	III	24(42,10)	3(12,50)	21(87,50)	
Tipo histológico	Endometriode	44(77,20)	30(68,20)	14(31,80)	0,007
	Escamoso	6(10,50)	0(0)	6(100,00)	
	Células claras	4(7,00)	3(75,00)	1(25,00)	
	Indiferenciado	2(3,50)	2(100,00)	0(0)	
	Mucinoso	1(1,80)	0(0)	1(100)	
Tipo histológico	Endometriode	44(77,20)	30(68,20)	14(31,80)	0,053
	Não endometriode	13(22,80)	5(38,50)	8(61,50)	
Grau histológico FIGO	1	26(45,60)	18(69,20)	8(30,80)	0,122
	2	14(24,60)	10(71,40)	4(28,60)	
	3	17(29,80)	7(41,20)	10(58,80)	
Grau histológico Vancouver	Baixo	44(77,20)	32(72,70)	12(27,30)	0,001
	Alto	13(22,80)	3(23,10)	10(76,90)	
Comprometimento vascular	Não	15(48,40)	12(80,00)	3(20,00)	0,017
	Sim	16(51,60)	6(37,50)	10(62,50)	
Extensão cavidade uterina	<35%	1(1,90)	1(100,00)	0(0)	0,403
	35 a 79%	11(21,20)	8(72,70)	3(27,30)	
	>80%	40(76,90)	22(55,00)	18(45,00)	
Infiltração miometrial	<50%	30(53,60)	25(83,30)	5(16,70)	<0,001
	>50%	26(46,40)	9(34,60)	17(65,40)	
Comprometimento serosa	Não	45(95,70)	31(68,90)	14(31,10)	0,575
	Sim	2(4,30)	1(50,00)	1(50,00)	
Infiltração colo	Não	34(61,80)	25(73,50)	9(26,50)	0,023
	Sim	21(38,20)	9(42,90)	12(57,10)	
Extensão vagina	Não	52(94,50)	34(65,40)	18(34,60)	0,614
	Sim	3(5,50)	1(33,30)	2(66,70)	
Comprometimento anexos	Não	47(82,50)	33(70,20)	14(29,80)	0,003
	Sim	10(17,50)	2(20,00)	8(80,00)	
Comprometimento peritônio/omento	Não	41(87,20)	28(68,30)	13(31,70)	0,048
	Sim	6(12,80)	1(16,70)	5(83,30)	
Citologia peritoneal	Negativo	29(93,50)	17(58,60)	12(41,40)	0,681
	Positivo	2(6,50)	2(100,00)	0(0)	

¹: Qui-quadrado de Pearson

Tabela 3 – Características clínico-patológicas relacionadas aos carcinomas primários de endométrio segundo desfecho (n=57)

Variáveis		Desfecho			p ¹
		n(%)	Viva (%)	Óbito (%)	
Idade	45 a 54	5(8,80)	5(100,00)	0(0)	0,548
	55 a 69	28(49,10)	22(78,60)	6(21,40)	
	>70	24(42,10)	18(75,00)	6(25,00)	
Estadiamento cirúrgico 1998	I	27(47,40)	23(85,20)	4(14,80)	0,110
	II	6(10,50)	6(100,00)	0(0)	
	III	24(42,10)	16(66,70)	8(33,30)	
Tipo histológico	Endometriode	44(77,20)	38(86,40)	6(13,60)	0,010
	Escamoso	6(10,50)	2(33,30)	4(66,70)	
	Células claras	4(7,00)	2(50,00)	2(50,00)	
	Indiferenciado	2(3,50)	2(100,00)	0(0)	
	Mucinoso	1(1,80)	1(100)	0(0)	
Tipo histológico	Endometriode	44(77,20)	38(86,40)	6(13,60)	0,012
	Não endometriode	13(22,80)	7(53,80)	6(46,20)	
Grau histológico FIGO	1	26(45,60)	24(92,30)	2(7,70)	0,069
	2	14(24,60)	10(71,40)	4(28,60)	
	3	17(29,80)	11(64,70)	6(35,30)	
Grau histológico Vancouver	Baixo	44(77,20)	37(84,10)	7(15,90)	0,080
	Alto	13(22,80)	8(61,50)	5(38,50)	
Comprometimento vascular	Não	15(48,40)	14(93,30)	1(6,70)	0,040
	Sim	16(51,60)	10(62,50)	6(37,50)	
Extensão cavidade uterina	<35%	1(1,90)	1(100,00)	0(0)	0,898
	35 a 79%	11(21,20)	9(81,80)	2(18,20)	
	>80%	40(76,90)	33(82,50)	7(17,50)	
Infiltração miometrial	<50%	30(53,60)	26(86,70)	4(13,30)	0,113
	>50%	26(46,40)	18(69,20)	8(30,80)	
Comprometimento serosa	Não	45(95,70)	37(82,20)	8(17,80)	0,005
	Sim	2(4,30)	0(0)	2(100,00)	
Infiltração colo	Não	34(61,80)	31(91,20)	3(8,80)	0,003
	Sim	21(38,20)	12(57,10)	9(42,90)	
Extensão vagina	Não	52(94,50)	41(78,80)	11(21,20)	0,619
	Sim	3(5,50)	2(66,60)	1(33,30)	
Comprometimento anexos	Não	47(82,50)	41(87,20)	6(12,80)	0,004
	Sim	10(17,50)	4(40,00)	6(60,00)	
Comprometimento peritônio/omento	Não	41(87,20)	33(80,50)	8(19,50)	0,811
	Sim	6(12,80)	4(66,60)	2(33,30)	
Citologia peritoneal	Negativo	29(93,50)	22(75,90)	7(24,10)	0,999
	Positivo	2(6,50)	2(100,00)	0(0)	

¹: Qui-quadrado de Pearson

A associação entre microdensidade vascular linfática (MDVL) e comprometimento linfonodal e desfecho estão sumarizadas nas tabelas 4 e 5, respectivamente.

Tabela 4 – Associação entre microdensidade vascular linfática (MDVL) e comprometimento linfonodal

Variável		Linfonodos		
		Negativos(%)	Positivos(%)	Total(%)
MDVL	Baixa	14(51,80)	13(48,20)	27(47,40)
	Elevada	21(70,00)	9(30,00)	30(52,60)
Total		35	22	57(100,00)

p=0,257

Tabela 5 - Associação entre microdensidade vascular linfática (MDVL) e desfecho

Variável		Desfecho		
		Viva (%)	Óbito(%)	Total(%)
MDVL	Baixa	18(66,60)	9(33,30)	27(47,40)
	Elevada	27(90,00)	3(10,00)	30(52,60)
Total		45	12	57(100,00)

p=0,031

A associação entre características clínico-patológicas e MDVL estão representadas nas tabelas 6, 7, 8 e 9.

Tabela 6 - Associação entre microdensidade vascular linfática (MDVL) e infiltração miometrial

Variável		MDVL		
		Baixo(%)	Elevado(%)	Total (%)
Infiltração miometrial	<50%	10(37,00)	20(69,00)	30(53,60)
	>50%	17(63,00)	9(31,00)	26(46,40)
Total		27	29	56(100,00)

p=0,034

Tabela 7 – Associação entre microdensidade vascular linfática (MDVL) e comprometimento de colo de útero

Variável		MDVL		
		Baixo(%)	Elevado(%)	Total (%)
Comprometimento	Não	12(46,20)	22(75,90)	34(61,80)
Colo de útero	Sim	14(53,80)	7(24,10)	21(38,20)
Total		26	29	55(100,00)

p=0,047

Tabela 8 – Associação entre microdensidade vascular linfática (MDVL) e comprometimento de anexos

Variável		MDVL		
		Baixo(%)	Elevado(%)	Total (%)
Comprometimento	Não	19(70,40)	28(93,30)	47(82,50)
Anexos	Sim	8(29,60)	2(6,70)	10(17,50)
Total		26	29	57(100,00)

p=0,023

Tabela 9 – Associação entre microdensidade vascular linfática (MDVL) e comprometimento de peritônio e omento

Variável		MDVL		
		Baixo(%)	Elevado(%)	Total (%)
Comprometimento	Não	17(77,30)	24(96,00)	41(87,20)
Peritônio e Omento	Sim	5(22,70)	1(4,00)	6(12,80)
Total		22	25	47(100,00)

p=0,055

As associações entre expressão de podoplanina em células neoplásicas e em células fibroblásticas no estroma intratumoral, relacionado com o comprometimento linfonodal e o desfecho estão sumarizadas nas tabelas 10, 11, 12 e 13, respectivamente.

Tabela 10- Associação entre expressão de podoplanina em células neoplásicas e comprometimento linfonodal

Variável		Linfonodos		
		Negativos(%)	Positivos(%)	Total(%)
Podoplanina células neoplásicas	Negativa	28(60,90)	18(39,10)	46(80,70)
	Positiva	7(63,60)	4(36,40)	11(19,30)
Total		35	22	57(100,00)

p=0,866

Tabela 11- Associação entre expressão de podoplanina em células neoplásicas e desfecho

Variável		Desfecho		
		Viva(%)	Óbito(%)	Total(%)
Podoplanina células neoplásicas	Negativa	38(82,60)	8(17,40)	46(80,70)
	Positiva	7(63,60)	4(36,40)	11(19,30)
Total		45	12	57(100,00)

p=0,330

Tabela 12- Associação entre expressão de podoplanina em células fibroblásticas do estroma intratumoral e comprometimento linfonodal

Variável		Linfonodos		
		Negativos(%)	Positivos(%)	Total(%)
Podoplanina estroma	Negativa	13(59,10)	9(40,90)	22(38,60)
	Positiva	22(62,90)	13(37,10)	35(61,40)
Total		35	22	57(100,00)

p=0,876

Tabela 13- Associação entre expressão de podoplanina em células fibroblásticas do estroma intratumoral e desfecho

Variável		Desfecho		
		Viva(%)	Óbito(%)	Total (%)
Podoplanina estroma	Negativa	15(68,20)	7(31,80)	22(38,60)
	Positiva	30(85,70)	5(14,30)	35(61,40)
Total		45	12	57(100,00)

p=0,114

As tabelas 14, 15 e 16 demonstram os fatores preditivos para comprometimento linfonodal paraórtico, comprometimento linfonodal e desfecho, respectivamente.

Tabela 14 – Determinação dos valores preditivos para desfecho nos carcinomas primários de endométrio

Variável preditiva	Qui-quadrado	P
Idade	2,535	0,282
Estadio cirúrgico 1988	3,589	0,166
Tipo histológico	2,738	0,254
Tipo endometriode	1,034	0,309
Invasão vascular	4,465	0,035
Gilks	0,108	0,742
Infiltração miometrial	0,106	0,745
Serosa+	2,203	0,138
Colo+	0,549	0,459
Vagina+	0,071	0,790
Anexos+	2,942	0,086
Peritônio	0,071	0,790
Lavado+	1,311	0,252
MDVL	0,309	0,578
Podoplanina células neoplásicas	0,036	0,849

+: comprometimento

Tabela 15 - Determinação dos fatores preditivos para comprometimento linfonodal nos carcinomas primários de endométrio

Variável preditiva	Qui-quadrado	P
Idade	4,017	0,260
Estadio cirúrgico 1988	52,380	<0,001
Tipo histológico	3,559	0,313
Invasão vascular	1,582	0,208
Gilks	1,873	0,171
Infiltração miometrial	1,657	0,198
Serosa+	1,391	0,238
Colo+	0,070	0,791
Vagina+	0,920	0,338
Anexos+	0,026	0,872
Peritônio	0,018	0,892
Lavado+	4,432	0,035
MDVL	0,549	0,459
Podoplanina células neoplásicas	0,167	0,683
Podoplanina estroma	1,309	0,253

+: comprometimento

Tabela 16 - Determinação dos valores preditivos para comprometimento de linfonodos paraórticos em carcinomas primários de endométrio

Variável preditiva	Qui-quadrado	P
Idade	2,058	0,357
Estadiamento cirúrgico 1988	8,113	0,017
Tipo histológico	1,232	0,745
Invasão vascular	0,533	0,465
Gilks	7,493	0,006
Infiltração miometrial	0,621	0,431
Serosa+	2,003	0,157
Colo+	0,702	0,402
Vagina+	0,001	0,981
Anexos+	0,169	0,681
Peritônio	0,879	0,343
Lavado+	0,537	0,464
Linfonodos pélvicos+	0,099	0,753
MDVL	1,113	0,291
Podoplanina células neoplásicas	3,256	0,071
Podoplanina estroma	0,084	0,772

+: comprometimento

Na figura 14 apresentam-se as curvas de sobrevida em função do comprometimento linfonodal. Para o grupo com

linfonodos negativos, a sobrevida média foi de 110 meses, com intervalo de 84 a 135 meses. Para o grupo com linfonodos positivos, a sobrevida média foi de 69 meses, com intervalo de confiança de 48 a 89 meses.

Figura 14 - Curvas de sobrevida segundo a condição dos linfonodos

Na figura 15 foram ajustadas as curvas de sobrevida em função da microdensidade vascular linfática (MDVL). A estatística de Breslow é conservadora e não possibilita evidenciar diferença entre as curvas. Porém há indícios dessa diferença, pois os tempos médios de sobrevida foram de 129 meses para as pacientes com

elevada MDVL, com intervalo de 113 a 145 meses; caindo para 79 meses nas pacientes com baixa MDVL.

Figura 15 - Curvas de sobrevida segundo MDVL

6. DISCUSSÃO

A metástase linfática é considerada um dos mais importantes fatores prognósticos na sobrevida de pacientes com câncer de endométrio, assim como em vários tumores epiteliais. Vários estudos clínicos e experimentais têm sugerido que a migração de células tumorais aos linfonodos é facilitada pela linfangiogênese^{120,121}.

Neste estudo, das 57 pacientes submetidas a estadiamento cirúrgico para câncer de endométrio, com realização de histerectomia total abdominal, 22 (38,6%) apresentavam disseminação para linfonodos pélvicos e/ou para-aórticos. Quando os linfonodos estavam positivos, 8 (36,4%) foram a óbito.

Dentre as variáveis preditivas pesquisadas, estavam associados ao comprometimento linfonodal para-aórtico o estadiamento cirúrgico e o grau histológico e comprometimento linfonodal pélvico, o estadiamento e o lavado peritoneal positivo.

Estudos avaliando a neovascularização linfática e seu papel na migração tumoral são facilitados pela recente identificação de fatores linfangiogênicos e seus receptores e pelos marcadores vasculares linfáticos⁵⁴.

Os marcadores mais usados para identificação de tecido endotelial linfático através da identificação imunoistoquímica incluem os VEGFR-3, PROX-1, LYVE-1 e a podoplanina⁵⁴. Entre estes, a podoplanina, uma glicoproteína transmembrana tipo mucina, que é reconhecida pelo anticorpo monoclonal D2-40, é considerada o mais confiável marcador linfático, com alta especificidade e sensibilidade⁵⁴. Neste estudo, escolhemos a podoplanina como indicador para avaliação da linfangiogênese, uma vez que é expressa apenas em linfáticos e não no endotélio vascular sanguíneo⁶⁴, em pequenos vasos linfáticos ao invés dos

maiores, permitindo maior sensibilidade na identificação da linfangiogênese¹²².

A expressão da podoplanina tem sido associada com a invasão tumoral e metástase, através de um processo de migração coletiva de células tumorais mesmo na presença da proteína transmembrana que possui função de adesão celular, a E-caderina. A perda desta função da E-caderina é estimulada na maioria dos tumores epiteliais e se relaciona com os processos dinâmicos de mudança de fenótipo molecular, que propiciam a migração celular única e precoce^{104,123}.

Nos carcinomas de endométrio, apesar de alguns estudos, como o de Wincewicz et al, não evidenciaram relação entre expressão de E-caderina e a profundidade de invasão tumoral¹²⁴, sabe-se que a perda completa ou parcial da função da E-caderina parece estar relacionada a comportamento mais agressivo do tumor, com maior potencial metastático e pode ser explicada pela perda da heterozigose (LOH) em alguns genes ou por hipermetilação. A LOH é encontrada com maior frequência nos tipos histológicos não endometrioides¹²⁵.

A podoplanina, então, poderia estimular a migração e invasão tumoral utilizando-se de sinalizadores da via E-caderina e assim promover disseminação e metástase.

Em nosso estudo, observou-se a expressão de podoplanina em células neoplásicas de apenas 19,3% e em fibroblastos do estroma de 61,4%. Entretanto, não houve relação de sua expressão com o comprometimento linfonodal. Com relação ao desfecho, houve indícios de relação entre expressão de podoplanina no estroma e desfecho ($p=0,114$), que poderia se tornar significativa com aumento do número de casos na casuística. Obtiveram desfecho vida, 85,7% das pacientes que apresentaram expressão de podoplanina no estroma; sugerindo a identificação da podoplanina em processos de linfangiogênese iniciais, o que seria

de grande importância para detecção precoce da disseminação tumoral e melhora no prognóstico.

Consideramos neste estudo cada compartimento (intra e peritumoral) para avaliação da linfangiogênese, devido a grande controvérsia que envolve este tópico na literatura. Devido ao limitado conhecimento sobre a linfangiogênese e diferentes tipos de câncer, consideramos válido acumular dados que futuramente possam ser comparados com outros estudos e ajudar a promover um melhor entendimento do papel da linfangiogênese na disseminação tumoral.

Neste trabalho, avaliamos a microdensidade vascular linfática no compartimento intratumoral utilizando a podoplanina como marcador linfático. A densidade vascular foi determinada através da contagem direta de vasos linfáticos em 10 campos do tumor com maior densidade vascular. Embora nosso estudo seja limitado pelo fato da MDVL ter sido obtido somente nos cortes de TMA, a área do tumor investigada foi rigorosamente escolhida, considerando as condições de fixação do espécime e a morfologia do tumor.

A técnica de contagem direta dos vasos linfáticos por campo foi escolhida neste estudo ao invés da contagem por pontos incidentes em vasos ou por intersecções de linhas do graticulo com vasos linfáticos marcados, devido à equivalência entre os três métodos, comprovada anteriormente em estudo avaliando a linfangiogênese em carcinomas de colo de útero¹²⁶.

A MDVL tem sido estudada em diversos tipos de tumores por vários métodos¹³. Existem poucos estudos sobre MDVL e cânceres ginecológicos. Gombos et al estudaram MDVL intra e peritumoral utilizando anticorpo D2-40 em 111 carcinomas de células escamosas e os correlacionando com expressão de VEGF-C, características clínico-patológicas do tumor e desfecho. Eles identificaram associação apenas entre elevada MDVL peritumoral

e baixa sobrevida¹²⁷. Zhang et al., utilizando LYVE-1 como marcador linfático, estudaram densidade vascular linfática intra e peritumoral em carcinomas cervicais de estágio inicial. A elevada MDVL em ambos os compartimentos, intra e peritumoral, foram associados com metástase linfonodal⁷⁵. Em contraste, Birner et al. estudaram 95 casos de carcinomas cervicais estágio pT1b e observaram prognóstico mais favorável entre os tumores com elevada MDVL, resultado similar ao nosso¹²⁸.

Em estudo publicado em 2010, de Zaganelli et al, do departamento de ginecologia do HCFMUSP, utilizando a podoplanina para avaliar a linfangiogênese em 144 casos de pacientes com carcinomas de colo de útero, estágio Ib a IIa, a MDVL intratumoral foi maior nos carcinomas cervicais precoces (naqueles sem metástase para linfonodos e com menores estádios) apesar de não haver tido relação com metástase linfonodal e desfecho¹²⁶.

Estudos sobre linfangiogênese e câncer de endométrio são raros. Para investigar se o aumento da MDVL peritumoral ou intratumoral, Gao et al. estudaram 102 pacientes com carcinoma endometrial utilizando LYVE-1 como marcador linfático. Eles identificaram relação entre elevada microdensidade peritumoral, mas não intratumoral, e metástase linfonodal¹²⁹. Em contraste, Vandenput et al, ao estudarem 62 pacientes com carcinoma endometrial, identificaram que nem a linfangiogênese peritumoral ou intratumoral determinados pela expressão da podoplanina tiveram relação com o prognóstico¹³⁰. Outros estudos têm documentado que a metástase linfonodal ocorre independente dos vasos linfáticos intratumorais, sugerindo que a vasculatura intratumoral linfática é normalmente não funcionante e apenas os vasos peritumorais linfáticos conduziriam fluido e células¹³¹.

Corroborando com nossos achados, ainda no estudo de Vandendput et al, não houve correlação entre a MDVL e o grau ou o tipo histológico¹³⁰.

Em nosso estudo, a baixa MDVL foi associada com pior prognóstico. Setenta e cinco por cento das mortes ocorreram em pacientes com baixa MDVL intratumoral, comparados com apenas 25% das mortes em pacientes com elevada MDVL ($p=0,031$). Em contraste, a elevada MDVL foi associada com fatores prognósticos favoráveis, como menor infiltração miometrial $>50\%$ ($p=0,034$), menor envolvimento cervical ($p=0,023$), menor envolvimento peritoneal ($p=0,055$). A explicação para este achado não é clara, mas supomos que a linfangiogênese seja um evento precoce na progressão tumoral, quando os vasos linfáticos ainda não estão funcionando. Associação entre densidade vascular e outros fatores prognósticos podem ajudar a elucidar caminhos da linfangiogênese na identificação de terapias alvo para os carcinomas endometriais.

Nossos resultados mostram que uma elevada MDVL intratumoral é característica de estágio inicial de carcinomas endometriais, sugerindo que o começo da linfangiogênese poderia ser importante em tumores pequenos. Dessa forma, esses tumores seriam candidatos a futuras terapias alvo.

7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir que, em mulheres com adenocarcinoma primário de endométrio nos estádios I a III:

7.1 Elevada microdensidade vascular linfática relacionou-se com melhor prognóstico;

7.2 As características clínico-patológicas que se associaram com o comprometimento linfonodal foram: estadiamento cirúrgico, tipo e grau histológico, presença de invasão vascular, nível de infiltração miometrial e comprometimento do colo do útero, anexos, peritônio e omento. O comprometimento linfonodal reduz a expectativa de vida das pacientes com câncer de endométrio;

7.3 Não houve associação significativa entre expressão de podoplanina tanto em células neoplásicas quanto em células fibroblásticas do estroma intratumoral e a previsão de comprometimento linfonodal e o desfecho. Os resultados sugerem que a expressão de podoplanina no estroma estaria associada a melhor prognóstico.

7.4 As variáveis que se relacionaram com o desfecho foram tipo histológico, presença de invasão vascular, comprometimento do colo do útero e anexos e a microdensidade vascular linfática.

Apenas o estadiamento cirúrgico e o grau histológico foram preditivos para o comprometimento linfonodal.

8. ANEXOS

Anexo1 – Aprovação do Protocolo de Pesquisa

HC

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 10/09/2008, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0728/08**, intitulado: "**AVALIAÇÃO DA LINFANGIOGÊNESE EM ADENOCARCINOMAS PRIMÁRIOS DE ENDOMÉTRIO**" apresentado pelo Departamento de **OBSTETRÍCIA E GINECOLOGIA**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Jesus Paula Carvalho**
Pesquisador (a) Executante: **Lecy Kawamura**

CAPPesq, 11 de Setembro de 2008

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 255, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo – SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br

Anexo 2 – Dados coletados do Prontuário

PROTOCOLO DE PESQUISA ADENOCARCINOMAS PRIMÁRIOS DE ENDOMÉTRIO

Prontuário: _____ Nome da paciente: _____

1) Idade: _____

2) Esdiamento: () I__ () II__ () III__

3) Tipo de cirurgia: _____

4) Tipo histológico: () Grupo endometriode () Grupo não endometriode

5) Grau histológico: () 1 () 2 () 3

6) Grau nuclear: () 1 () 2 () 3

7) Comprometimento vascular peritumoral: () não identificado
() presente focal () presente multifocal () não avaliável

8) Extensão do tumor na cavidade uterina:
() <35% () 35-80% () >80% () não informado

9) Nível de infiltração miometrial:
() intra-endometrial () <50% () >50% () não informado

10) Envolvimento da serosa uterina: () sim () não () não informado

11) Envolvimento do colo: () sim () não () não informado

12) Envolvimento de manguito vaginal: () sim () não () não informado

13) Envolvimento de anexos: () sim () não () não informado

14) Envolvimento de peritônio: () sim () não () não informado

15) Envolvimento de omento: () sim () não () não informado

16) Lavado peritoneal: () sim () não () não informado

17) Número de linfonodos pélvicos comprometidos/retirados: _____

18) Número de linfonodos paraórticos comprometidos/retirados:

19) Desfecho: _____

20) Início seguimento: _____

21) Seguimento em meses: _____

22) Data do óbito: _____

23) Tratamento adjuvante: ()Radio ()Quimio ()Radio e
Quimioterapia

24) Drogas quimioterápicas: _____

Anexo 3 – Banco de dados

Paciente	Idade	EC	EC2010	Cirurgia	tipo	GHist	Vasc +	Gilks	mit	arq	GN	ExtCavUt	Inf Miomet	ExtSerosa	ExtColo	ExtVagina	Anexos+	Peritonio+
1	81	Ila	Ib	Piver 1+Est	E	1	Sim M	L	5	G	2	>80%	>50%	Não	Sim	Não	Não	Não
2	86	IIc	IIIC2	Piver 1+Est	S	3	Sim M	H	31	SP	3	35-80%	>50%	Não	Sim	Não	Sim	Não Inf
3	60	IIc	IIIC2	Piver 1+Est	S	3	Não Inf	H	17	SP	3	>80%	>50%	Não	Sim	Não	Sim	Não
4	66	IIc	IIIC1	Piver 1+Est	E	2	Sim M	L	8	G	2	>80%	>50%	Não	Sim	Não	Não	Não
5	86	Ib	Ia	Estadiam	E	1	Não	L	4	G	1	Não Inf	<50%	Não	Não	Não	Não	Não Inf
6	84	IIa	IIa	Piver 1+Est	CC	3	Sim M	L	9	G	3	>80%	>50%	Sim	Sim	Não	Sim	Não
7	74	IIc	IIIC2	Estadiam	S	3	Sim M	H	25	SP	3	>80%	>50%	Não Inf	Sim	Sim	Sim	Sim
8	63	Ib	Ia	Piver 1+Est	E	1	Não Inf	L	1	G	1	Não Inf	Não Inf	Não Inf	Não Inf	Não	Não	Não
9	66	Ib	Ia	Estadiam	E	2	Não Inf	L	7	G	2	Não Inf	<50%	Não	Sim	Não	Não	Não Inf
10	71	IIc	IIIC1	Piver 1+Est	S	3	Não Inf	H	15	SP	3	>80%	>50%	Não	Sim	Não	Não	Não
11	73	IIb	IIb	Piver 1+Est	E	2	Sim M	L	3	G	2	>80%	>50%	Não	Sim	Sim	Não	Não Inf
12	74	IIc	IIIC1	Piver 1+Est	S	3	Não Inf	H		SP	3	35-80%	>50%	Sim	Sim	Não	Sim	Sim
13	65	Ic	Ib	Piver 1+Est	E	1	Sim M	L	3	G	2	>80%	>50%	Não Inf	Não	Não	Não	Não
14	77	Ib	Ia	Piver 1+Est	E	2	Não Inf	L	1	G	1	35-80%	<50%	Não	Não	Não	Não	Não
15	68	IIb	II	Piver 1+Est	E	1	Não Inf	L	7	G	2	>80%	>50%	Não	Sim	Não	Não	Não
16	69	IIc	IIIC1	Piver 1+Est	E	1	Sim F	L	0	G	1	35-80%	<50%	Não	Não	Não	Não	Não
17	61	Ic	Ib	Piver 1+Est	E	3	Não Inf	L	4	SP	2	>80%	>50%	Não	Não	Não	Não	Não
18	88	IIb	IIa	Piver 1+Est	E	1	Não Inf	L	0	G	1	Não Inf	<50%	Não	Sim	Não	Sim	Não

19	78	IIIc	IIIC1	Piver 1+Est	E	1	Não	L	4	G	2	>80%	<50%	Não	Não	Não	Não	Sim
20	68	IIIc	IIIC2	Piver 1+Est	CC	3	Sim M	H	10	P	3	Não Inf	<50%	Não	Sim	Não	Sim	Não Inf
21	69	IIIc	IIIC1	Estadium	E	1	Não Inf	L	3	G	2	>80%	>50%	Não Inf	Não	Não	Não	Não Inf
22	70	Ib	Ia	Piver 1+Est	CC	2	Não Inf	H	3	P	3	35-80%	<50%	Não	Não	Não	Não	Não
23	73	Ib	Ia	Estadium	E	2	Não Inf	L	6	G	2	>80%	<50%	Não	Não	Não	Não	Não Inf
24	75	Ib	Ia	Estadium	E	1	Não Inf	L		G	2	35-80%	<50%	Não	Não	Não	Não	Não Inf
25	60	Ib	Ia	Piver 1+Est	E	1	Não Inf	L	2	G	2	>80%	<50%	Não	Não	Não	Não	Não
26	77	IIIc	IIIC1	Estadium	E	1	Não Inf	L	2	G	2	>80%	<50%	Não	Não	Não	Não	Não Inf
27	66	IIIc	IVB	Estadium	E	2	Sim M	L	2	G	2	>80%	>50%	Não Inf	Sim	Sim	Sim	Não
28	62	IIIc	IIIC1	Estadium	E	1	Não	L	2	G	2	>80%	<50%	Não Inf	Sim	Não Inf	Não	Não Inf
29	55	Ic	Ib	Estadium	E	1	Não	L	1	G	1	>80%	>50%	Não Inf	Não	Não	Não	Não
30	59	IIIc	IIIC2	Estadium	E	2	Não Inf	L	1	G	1	>80%	>50%	Não Inf	Não	Não	Não	Não Inf
31	65	Ib	II	Estadium	E	1	Sim M	L	4	G	2	>80%	>50%	Não Inf	Sim	Não	Não	Não Inf
32	78	Ia	Ia	Piver 1+Est	CC	3	Não	L	2	G	3	<35%	Intra End	Não	Não	Não	Não	Não Inf
33	63	Ib	Ia	Estadium	E	1	Não	L	1	G	2	>80%	<50%	Não	Não	Não	Não	Não
34	61	IIIc	IIIC2	Piver 1+Est	E	3	SIM M	H	4	S	3	>80%	>50%	Não	Não	Não	Não	Não
35	68	IIIc	IIIC1	Piver 1+Est	E	1	Sim M	L	1	G	1	>80%	<50%	Não	Não	Não	Não	Não Inf
36	62	Ib	Ia	Estadium	E	1	Não Inf	L	0	G	1	35-80%	<50%	Não	Não	Não	Não	Não
37	73	IIIc	IIIC2	Estadium	M	3	Sim M	H	2	P	3	>80%	>50%	Não Inf	Não Inf	Não Inf	Sim	Sim
38	71	IIa	Ia	Piver 1+Est	E	2	Não	L	7	G	2	>80%	<50%	Não	Sim	Não	Não	Não Inf
39	77	Ib	Ia	Piver 1+Est	E	2	Não	L	3	G	1	>80%	<50%	Não	Não	Não	Não	Não
40	89	Ib	Ia	Piver 1+Est	E	1	Não	L	1	G	1	>80%	<50%	Não	Não	Não	Não	Não
41	74	IIIc	IIIC2	Piver 1+Est	E	1	Não Inf	L	1	G	1	>80%	>50%	Não	Não	Não	Não	Não inf
42	61	Ib	Ia	Piver 1+Est	I	3	Não Inf	H		S	3	>80%	<50%	Não	Não	Não	Não	Não Inf
43	55	Ib	Ia	Piver 1+Est	E	1	Não	L	8	G	2	>80%	<50%	Não	Não	Não	Não	Não Inf

44	64	Ib	Ia	Piver 1+Est	E	3	Não Inf	L	3	S	2	>80%	<50%	Não	Não	Não	Não	Não Inf
45	52	IIIC	IIIC2	Piver 1+Est	E	2	Não	L	2	E	2	>80%	>50%	Não	Sim	Não	Não	Não
46	56	Ib	Ia	Piver 1+Est	E	1	Não	L	0	G	1	35-80%	<50%	Não	Não	Não	Não	Não Inf
47	58	IIIC	IIIC1	Piver 1+Est	E	3	Não Inf	H	14	S	3	>80%	>50%	Não	Sim	Não	Não	Não Inf
48	60	Ib	Ia	Piver 1+Est	I	3	Não Inf	L	1	S	2	35-80%	>50%	Não	Não	Não	Não	Não Inf
49	47	Ib	Ia	Piver 1+Est	E	1	Não	L	1	G	1	>80%	<50%	Não	Não	Não	Não	Não Inf
50	69	Ib	Ia	Piver 1+Est	E	2	Não Inf	L	1	G	2	>80%	<50%	Não	Não	Não	Não	Não Inf
51	57	Ib	Ia	Piver 1+Est	E	2	Não Inf	L	4	G	2	>80%	<50%	Não	Não	Não	Não	Não Inf
52	46	Ib	Ia	Piver 1+Est	E	1	Não	L	0	G	2	>80%	<50%	Não	Não	Não	Não	Não
53	72	IIIC	IIIC1	Piver 1+Est	S	3	Não	H	12	SP	3	>80%	>50%	Não	Sim	Não	Sim	Não Inf
54	73	IIIC	IIIC1	Piver 1+Est	E	1	Não Inf	L	2	G	2	>80%	>50%	Não	Não	Não	Não	Sim
55	50	Ib	Ia	Piver 1+Est	E	3	Sim F	H	7	S	3	35-80%	<50%	Não	Não	Não	Não	Não Inf
56	47	IIb	II	Piver 1+Est	E	1	Sim M	L	2	G	1	35-80%	>50%	Não	Sim	Não	Não	Não Inf
57	74	Ib	Ia	Piver 1+Est	E	2	Não Inf	L	8	G	2	>80%	<50%	Não	Não	Não	Não	Não Inf

continua

continuação

Paciente	Omento+	Lavado+	Npelv	Npelv+	Naort	NAort+	Desfecho	Desfecho em Meses	Início Seguimento	Data obito	Tto Adjuvante	Drogas QT	Endometrio Normal	DVV	Ki-67	Céls. Neoplásicas +	Céls. Estromais +
1	Não	Não Inf	10	0	0	0	Seguim	105 meses	19/10/1999	---	RXT	---	Não Inf.	0	<5%	0%	0%
2	Não	Neg	28	4	4	3	óbito	101 meses	19/01/2000	26/10/01	RXT	---	Não Inf.	0	70%	0%	0%
3	Não	Não Inf	29	0	19	5	óbito	24 meses	14/03/2000	04/05/02	RXT+QT	MAP	Lesão Toda Cavid.	0	25%	0%	0%
4	Não	Não Inf	34	2	6	0	óbito	10 meses	14/02/2000	17/04/01	RXT	---	Lesão Toda Cavid.	1	25%	<1%	<1%
5	Não Inf	Neg	5	0	0	0	Seguim	108 meses	19/10/2002	05/04/02	RXT	---	Lesão Toda Cavid.	0	25%	0%	0%
6	Não	Neg	42	0	5	0	óbito	19 meses	16/08/2001	09/05/03	RXT	---	Lesão Toda Cavid.	0	40%	0%	0%
7	Não	Neg	36	11	13	10	Seguim	94 meses	25/09/2001	---	QT	TAXOL+CARBO	Não Inf.	0	30%	0%	0%
8	Não	Neg	28	0	8	0	Seguim	84 meses	15/01/2002	---	RXT	---	Não Inf.	0,8	10%	0%	<5%
9	Não Inf	Neg	9	0	0	0	óbito	78 meses	11/10/2001	---	RT+QT	CDDP	Atrofia cística	0	40%	0%	0%
10	Não	Não Inf	30	1	7	0	óbito	7 meses	09/09/2002	25/05/03	RXT	---	Lesão Toda Cavid.	0	70%	10%	0%
11	Não	Não Inf	29	0	4	0	Seguim	80 meses	15/04/2002	---	RXT	---	Lesão Toda Cavid.	4,5	50%	0%	<5%
12	Não	Neg	2	1	8	0	óbito	35 meses	07/07/2003	13/07/06	RXT+QT	MAP	Hiperplasia Sem Atipia	0,1	50%	<1%	<1%
13	Não	Não Inf	20	1	0	0	óbito	6 meses	16/09/2003	19/12/05	RXT	---	Lesão Toda Cavid.	0,8	40%	0%	<1%
14	Não Inf	Não Inf	17	0	0	0	Seguim	144 meses	18/09/2003	---	RXT	---	Não Inf.	3,5	20%	0%	<1%
15	Não	Neg	23	0	2	0	Seguim	67 meses	10/02/2004	---	RXT	---	Lesão Toda Cavid.	1,9	70%	0%	<1%
16	Não	Neg	24	6	6	0	Seguim	69 meses	31/10/2003	---	---	---	Não Inf.	0,2	30%	0%	0%
17	Não	Neg	21	0	0	0	Seguim	63 meses	23/04/2004	---	RXT	---	Proliferativo	0	40%	0%	0%
18	Não	Não Inf	14	0	3	0	Seguim	53 meses	22/02/2005	---	RT+QT	MAP	Não Inf.	0	25%	0%	0%
19	Sim	Positivo	3	0	0	0	óbito	12 meses	15/12/2004	---	---	---	Lesão Toda Cavid.	0,2	50%	5%	<1%
20	Não	Não Inf	12	3	4	4	óbito	10 meses	17/05/2005	25/03/06	RXT+QT	MAP	Lesão Toda Cavid.	1,1	30%	0%	0%
21	Não	Neg	23	8	0	0	Seguim	51 meses	14/04/2005	---	RXT	---	Lesão Toda Cavid.	1,6	60%	0%	<1%
22	Não Inf	Neg	12	0	0	0	Seguim	50 meses	16/05/2005	---	RXT	---	Não Inf.	0,7	80%	0%	<1%

23	Não	Neg	9	0	0	0	óbito	33 meses	18/04/2005		RXT	---	Lesão Toda Cavid.	0,3	60%	<1%	<1%
24	Não	Neg	5	0	0	0	Seguim	50 meses	01/07/2005	---	---	---	Não Inf.	0,5	40%	0%	<1%
25	Não	Neg	24	0	2	0	Seguim	64 meses	25/03/2004	---	RXT	---	Atrófico	0,9	20%	0%	<1%
26	Não	Neg	36	3	0	0	Seguim	51 meses	30/03/2005	---	RXT	---	Lesão Toda Cavid.	0,3	70%	0%	<1%
27	Sim	Neg	22	19	0	0	óbito	30 meses	13/06/2006	19/12/08	RT+QT	Cis+Pacli+MAP	Não Inf.	0	80%	0%	30%
28	Não	Neg	38	3	4	0	Seguim	38 meses	30/05/2006	---	RXT	---	Lesão Toda Cavid.	1,4	40%	0%	20%
29	Não	Neg	10	0	0	0	Seguim	36 meses	04/07/2006	---	RXT	---	Lesão Toda Cavid.	0,1	10%	0%	0%
30	Não Inf	Neg	26	1	11	1	Seguim	35 meses	23/08/2006	---	RXT	---	Lesão Toda Cavid.	0	30%	0%	0%
31	Não	Não	11	0	0	0	Seguim	33 meses	31/10/2006	---	RT+QT	Não Inf.	Lesão Toda Cavid.	0	70%	80%	0%
32	Não Inf	Não Inf	5	0	4	0	Seguim	31 meses	05/01/2007	---	---	---	Atrófico	0,6	<5%	<1%	<1%
33	Não	Neg	15	0	0	0	Seguim	31 meses	10/11/2006	---	RXT	---	Não Inf.	2,7	20%	0%	0%
34	Não	Neg	14	1	2	2	Seguim	31 meses	22/12/2006	---	RXT+QT	Cisplatina	Lesão Toda Cavid.	4	0%	0%	0%
35	Não Inf	Não Inf	4	1	0	0	Seguim	30 meses	22/01/2007	---	RXT	---	Lesão Toda Cavid.	4,3	25%	0%	<1%
36	Não	Neg	29	0	2	0	Seguim	30 meses	29/01/2007	---	RXT	---	Não Inf.	1	0%	0%	<1%
37	Não	Neg	35	18	2	2	Seguim	30 meses	23/01/2007	---	RT+QT	Não Inf.	Lesão Toda Cavid.	0	25%	0%	0%
38	Não Inf	Não Inf	25	0	0	0	Seguim	32 meses	17/11/2006	---	RXT	---	Lesão Toda Cavid.	0	70%	0%	<1%
39	Não	Neg	5	0	0	0	Seguim	24 meses	10/07/2007	---	---	---	Lesão Toda Cavid.	0	30%	0%	<1%
40	Não	Neg	23	0	1	0	Seguim	24 meses	31/07/2007	---	---	---	Lesão Toda Cavid.	0,9	50%	0%	0%
41	Não	Neg	21	2	4	1	Seguim	23 meses	17/08/2007	---	RXT	---	Lesão Toda Cavid.	0,3	40%	0%	<1%
42	Não Inf	Neg	20	0	0	0	Seguim	21 meses	09/11/2007	---	RXT	---	Lesão Toda Cavid.	1,2	70%	0%	<1%
43	Não Inf	Neg	10	0	0	0	Seguim	20 meses	09/11/2007	---	RXT+QT	Pamidronato	Lesão Toda Cavid.	0,5	60%	0%	<1%
44	Não	Não Inf	6	0	0	0	Seguim	21 meses	05/10/2007	---	RXT	---	Lesão Toda Cavid.	1,1	80%	0%	<1%
45	Não	Não Inf	19	3	2	2	Seguim	20 meses	28/11/2007	---	RXT	---	Lesão Toda Cavid.	0,1	40%	0%	<1%
46	Não	Não Inf	28	0	3	0	Seguim	17 meses	11/01/2008	---	RXT	---	Não Inf.	2	30%	<1%	<1%
47	Não Inf	Não Inf	29	2	0	0	Seguim	19 meses	14/12/2007	---	RXT+QT	Pacli+Carbo	Não Inf.	0,1	80%	0%	<1%

48	Não	Não Inf	17	0	2	0	Seguim	19 meses	21/12/2007	---	RXT	---	Não Inf.	0,2	25%	0%	<1%
49	Não	Não Inf	13	0	0	0	Seguim	13 meses	24/06/2008	---	RXT	---	Lesão Toda Cavid.	4,1	35%	20%	<1%
50	Não	Não Inf	21	0	0	0	Seguim	44 meses	30/03/2007	---	RXT	---	Atrófico	3,6	70%	0%	0%
51	Não	Não Inf	36	0	7	0	Seguim	24 meses	28/07/2008	---	RXT	---	Lesão Toda Cavid.	0	30%	0%	0%
52	Não Inf	Não Inf	15	0	0	0	Seguim	15 meses	25/04/2008	---	RXT	---	Não Inf.	4,7	80%	20%	<1%
53	Não Inf	Não Inf	15	6	0	0	Seguim	13 meses	23/06/2008	---	RXT+QT	Pacli+Carbo	Lesão Toda Cavid.	2,4	80%	5%	<1%
54	Sim	Não Inf	15	1	0	0	Seguim	9 meses	08/10/2008	---	RXT+QT	Pacli+Carbo	Não Inf.	1,3	20%	0%	<5%
55	Não	Não Inf	15	0	4	0	Seguim	9 meses	27/10/2008	---	---	---	Não Inf.	1,2	70%	0%	<1%
56	Não	Não Inf	10	0	0	0	Seguim	9 meses	20/10/2008	---	RXT	---	Não Inf.	2,4	90%	0%	0%
57	Não	Não Inf	8	0	0	0	Seguim	9 meses	24/10/2008	---	RXT	---	Lesão Toda Cavid.	1,7	80%	0%	10%

9. REFERÊNCIAS¹

1. Schink JC, Rademaker AW, Miller DS, Lurain JR. Tumor size in endometrial cancer. *Cancer*. 1991 Jun 1;67(11):2791-4.
2. Axtell AE, Kelley JL, Fader AN, Gupta D, Schwartz B, Comerci JT, et al. Percent surface area involvement is a predictor of lymph node metastasis in endometrial cancer. *Gynecol Oncol*. 2007 Dec;107(3):482-6.
3. Denschlag D, Tan L, Patel S, Kerim-Diken A, Souhami L, Gilbert L. Stage III endometrial cancer: preoperative predictability, prognostic factors, and treatment outcome. *Am J Obstet Gynecol*. 2007 Jun;196(6):546 e1-7.
4. Havrilesky LJ, Cragun JM, Calingaert B, Alvarez Secord A, Valea FA, Clarke-Pearson DL, et al. The prognostic significance of positive peritoneal cytology and adnexal/serosal metastasis in stage IIIA endometrial cancer. *Gynecol Oncol*. 2007 Feb;104(2):401-5.
5. Prat J. Prognostic parameters of endometrial carcinoma. *Hum Pathol*. 2004 Jun;35(6):649-62.
6. Taskiran C, Yuce K, Geyik PO, Kucukali T, Ayhan A. Predictability of retroperitoneal lymph node metastasis by using clinicopathologic variables in surgically staged endometrial cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2006 May-Jun;16(3):1342-7.
7. Pecorelli S. Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, and endometrium. *Int J Gynaecol Obstet*. 2009 May;105(2):103-4.
8. Morrow CP, Bundy BN, Kurman RJ, Creasman WT, Heller P, Homesley HD, et al. Relationship between surgical-pathological risk factors and outcome in clinical stage I and II carcinoma of the endometrium: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol*. 1991 Jan;40(1):55-65.

¹

Esta Tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journal 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. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.
 Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

9. Chee JJ, Ho TH, Tay EH, Low JJ, Yam KL. Endometrioid adenocarcinoma of the uterus: surgico-pathological correlations and role of pelvic lymphadenectomy. *Ann Acad Med Singapore*. 2003 Sep;32(5):670-5.
10. Schacht V, Dadras SS, Johnson LA, Jackson DG, Hong YK, Detmar M. Up-regulation of the lymphatic marker podoplanin, a mucin-type transmembrane glycoprotein, in human squamous cell carcinomas and germ cell tumors. *Am J Pathol*. 2005 Mar;166(3):913-21.
11. Kahn HJ, Marks A. A new monoclonal antibody, D2-40, for detection of lymphatic invasion in primary tumors. *Lab Invest*. 2002 Sep;82(9):1255-7.
12. Achen MG, Mann GB, Stacker SA. Targeting lymphangiogenesis to prevent tumour metastasis. *Br J Cancer*. 2006 May 22;94(10):1355-60.
13. Sundar SS, Ganesan TS. Role of lymphangiogenesis in cancer. *J Clin Oncol*. 2007 Sep 20;25(27):4298-307.
14. He Y, Kozaki K, Karpanen T, Koshikawa K, Yla-Herttuala S, Takahashi T, et al. Suppression of tumor lymphangiogenesis and lymph node metastasis by blocking vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling. *J Natl Cancer Inst*. 2002 Jun 5;94(11):819-25.
15. IARC. Incidence of Corpus Uteri Cancer in the World. Lyon, France: World Health Organization 2009 [updated 2009/10/12; cited 2010 01/01]; Available from: <http://www-dep.iarc.fr/>.
16. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin*. 2010 Sep-Oct;60(5):277-300.
17. RCBP-SP. Incidência de câncer no município de São Paulo, Brasil 1997-2003. São Paulo 2007 [cited 2010 01/01/2011]; Available from: http://www.fsp.usp.br/rcsp/img/arquivos/rcsp_2007.pdf.
18. FOSP. Mortalidade por câncer no biênio 2001-2002. São Paulo 2002 [cited 2011 01/01/2011]; Available from: <http://www.fosp.saude.sp.gov.br/epidemiologia/mortalidade.html#>.
19. Bakkum-Gamez JN, Gonzalez-Bosquet J, Laack NN, Mariani A, Dowdy SC. Current issues in the management of endometrial cancer. *Mayo Clin Proc*. 2008 Jan;83(1):97-112.

20. Ueda SM, Kapp DS, Cheung MK, Shin JY, Osann K, Husain A, et al. Trends in demographic and clinical characteristics in women diagnosed with corpus cancer and their potential impact on the increasing number of deaths. *Am J Obstet Gynecol.* 2008 Feb;198(2):218 e1-6.
21. Sonoda Y, Barakat RR. Screening and the prevention of gynecologic cancer: endometrial cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2006 Apr;20(2):363-77.
22. Benedet JL. Câncer ginecológico. In: Paulo. FOdS, editor. *Manual de oncologia clínica da UICC.* São Paulo 2006. p. 559-65.
23. Chan JK, Kapp DS, Cheung MK, Shin JY, Stieglitz D, Husain A, et al. Prognostic factors and risk of extrauterine metastases in 3867 women with grade 1 endometrioid corpus cancer. *Am J Obstet Gynecol.* 2008 Feb;198(2):216 e1-5.
24. Amant F, Moerman P, Neven P, Timmerman D, Van Limbergen E, Vergote I. Treatment modalities in endometrial cancer. *Curr Opin Oncol.* 2007 Sep;19(5):479-85.
25. Creasman WT, Morrow CP, Bundy BN, Homesley HD, Graham JE, Heller PB. Surgical pathologic spread patterns of endometrial cancer. A Gynecologic Oncology Group Study. *Cancer.* 1987 Oct 15;60(8 Suppl):2035-41.
26. Alektiar KM, McKee A, Lin O, Venkatraman E, Zelefsky MJ, Mychalczak BR, et al. The significance of the amount of myometrial invasion in patients with Stage IB endometrial carcinoma. *Cancer.* 2002 Jul 15;95(2):316-21.
27. Mariani A, Webb MJ, Keeney GL, Aletti G, Podratz KC. Predictors of lymphatic failure in endometrial cancer. *Gynecol Oncol.* 2002 Mar;84(3):437-42.
28. Bokhman JV. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol.* 1983 Feb;15(1):10-7.
29. Amant F, Moerman P, Neven P, Timmerman D, Van Limbergen E, Vergote I. Endometrial cancer. *Lancet.* 2005 Aug 6-12;366(9484):491-505.
30. Fontaine R. [Lymphology from the early 17th century to the beginning of the 20th century. First part: Aselli to Pecquet (author's transl)]. *Ann Chir.* 1977 Feb;31(2):91-9.
31. Swartz MA, Skobe M. Lymphatic function, lymphangiogenesis, and cancer metastasis. *Microsc Res Tech.* 2001 Oct 15;55(2):92-9.

32. Swartz MA. The physiology of the lymphatic system. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001 Aug 23;50(1-2):3-20.
33. Witte MH, Bernas MJ, Martin CP, Witte CL. Lymphangiogenesis and lymphangiodysplasia: from molecular to clinical lymphology. *Microsc Res Tech.* 2001 Oct 15;55(2):122-45.
34. Shayan R, Achen MG, Stacker SA. Lymphatic vessels in cancer metastasis: bridging the gaps. *Carcinogenesis.* 2006 Sep;27(9):1729-38.
35. Folkman J. How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? G.H.A. Clowes memorial Award lecture. *Cancer Res.* 1986 Feb;46(2):467-73.
36. Leu AJ, Berk DA, Lymboussaki A, Alitalo K, Jain RK. Absence of functional lymphatics within a murine sarcoma: a molecular and functional evaluation. *Cancer Res.* 2000 Aug 15;60(16):4324-7.
37. Tanigawa N, Kanazawa T, Satomura K, Hikasa Y, Hashida M, Muranishi S, et al. Experimental study on lymphatic vascular changes in the development of cancer. *Lymphology.* 1981 Dec;14(4):149-54.
38. Al-Rawi MA, Mansel RE, Jiang WG. Lymphangiogenesis and its role in cancer. *Histol Histopathol.* 2005 Jan;20(1):283-98.
39. Holmes DL, Zachary I. The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: angiogenic factors in health and disease. *Genome Biol.* 2005;6(2):209.
40. Eichmann A, Yuan L, Moyon D, Lenoble F, Pardanaud L, Breant C. Vascular development: from precursor cells to branched arterial and venous networks. *Int J Dev Biol.* 2005;49(2-3):259-67.
41. Oliver G. Lymphatic vasculature development. *Nat Rev Immunol.* 2004 Jan;4(1):35-45.
42. Makinen T, Jussila L, Veikkola T, Karpanen T, Kettunen MI, Pulkkanen KJ, et al. Inhibition of lymphangiogenesis with resulting lymphedema in transgenic mice expressing soluble VEGF receptor-3. *Nat Med.* 2001 Feb;7(2):199-205.
43. Kerjaschki D, Huttary N, Raab I, Regele H, Bojarski-Nagy K, Bartel G, et al. Lymphatic endothelial progenitor cells contribute to de novo lymphangiogenesis in human renal transplants. *Nat Med.* 2006 Feb;12(2):230-4.

44. Junqueira LC, Carneiro J. Sistema Vascular Linfático. In: S.A. GK, editor. *Histologia Básica*. 10a. edição ed. Rio de Janeiro 2004. p. 219-22.
45. Pepper MS. Lymphangiogenesis and tumor metastasis: myth or reality? *Clin Cancer Res*. 2001 Mar;7(3):462-8.
46. Kato S, Shimoda H, Ji RC, Miura M. Lymphangiogenesis and expression of specific molecules as lymphatic endothelial cell markers. *Anat Sci Int*. 2006 Jun;81(2):71-83.
47. Makinen T, Norrmén C, Petrova TV. Molecular mechanisms of lymphatic vascular development. *Cell Mol Life Sci*. 2007 Aug;64(15):1915-29.
48. Baluk P, McDonald DM. Markers for microscopic imaging of lymphangiogenesis and angiogenesis. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1131:1-12.
49. Reis-Filho JS, Schmitt FC. Lymphangiogenesis in tumors: what do we know? *Microsc Res Tech*. 2003 Feb 1;60(2):171-80.
50. Wigle JT, Oliver G. Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system. *Cell*. 1999 Sep 17;98(6):769-78.
51. Suzuki H, Watabe T, Kato M, Miyazawa K, Miyazono K. Roles of vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling in differentiation of mouse embryonic stem cell-derived vascular progenitor cells into endothelial cells. *Blood*. 2005 Mar 15;105(6):2372-9.
52. Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, Partanen J, Taipale J, Petrova TV, et al. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol*. 2004 Jan;5(1):74-80.
53. Karpanen T, Alitalo K. Molecular biology and pathology of lymphangiogenesis. *Annu Rev Pathol*. 2008;3:367-97.
54. Van der Auwera I, Cao Y, Tille JC, Pepper MS, Jackson DG, Fox SB, et al. First international consensus on the methodology of lymphangiogenesis quantification in solid human tumours. *Br J Cancer*. 2006 Dec 18;95(12):1611-25.
55. Zwaans BM, Bielenberg DR. Potential therapeutic strategies for lymphatic metastasis. *Microvasc Res*. 2007 Sep-Nov;74(2-3):145-58.

56. Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, Chilov D, Lahtinen I, Kukk E, et al. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J.* 1996 Apr 1;15(7):1751.
57. Partanen TA, Alitalo K, Miettinen M. Lack of lymphatic vascular specificity of vascular endothelial growth factor receptor 3 in 185 vascular tumors. *Cancer.* 1999 Dec 1;86(11):2406-12.
58. Raica M, Cimpéan AM, Ribatti D. The role of podoplanin in tumor progression and metastasis. *Anticancer Res.* 2008 Sep-Oct;28(5B):2997-3006.
59. Breiteneder-Geleff S, Soleiman A, Kowalski H, Horvat R, Amann G, Kriehuber E, et al. Angiosarcomas express mixed endothelial phenotypes of blood and lymphatic capillaries: podoplanin as a specific marker for lymphatic endothelium. *Am J Pathol.* 1999 Feb;154(2):385-94.
60. Mishima K, Kato Y, Kaneko MK, Nishikawa R, Hirose T, Matsutani M. Increased expression of podoplanin in malignant astrocytic tumors as a novel molecular marker of malignant progression. *Acta Neuropathol.* 2006 May;111(5):483-8.
61. Yuan P, Temam S, El-Naggar A, Zhou X, Liu DD, Lee JJ, et al. Overexpression of podoplanin in oral cancer and its association with poor clinical outcome. *Cancer.* 2006 Aug 1;107(3):563-9.
62. Miyata Y, Kanda S, Ohba K, Nomata K, Hayashida Y, Eguchi J, et al. Lymphangiogenesis and angiogenesis in bladder cancer: prognostic implications and regulation by vascular endothelial growth factors-A, -C, and -D. *Clin Cancer Res.* 2006 Feb 1;12(3 Pt 1):800-6.
63. Van Trappen PO, Pepper MS. Lymphangiogenesis and lymph node microdissemination. *Gynecol Oncol.* 2001 Jul;82(1):1-3.
64. Stacker SA, Achen MG, Jussila L, Baldwin ME, Alitalo K. Lymphangiogenesis and cancer metastasis. *Nat Rev Cancer.* 2002 Aug;2(8):573-83.
65. Renyi-Vamos F, Tovari J, Fillinger J, Timar J, Paku S, Kenessey I, et al. Lymphangiogenesis correlates with lymph node metastasis, prognosis, and angiogenic phenotype in human non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2005 Oct 15;11(20):7344-53.
66. Massi D, Puig S, Franchi A, Malvehy J, Vidal-Sicart S, Gonzalez-Cao M, et al. Tumour lymphangiogenesis is a possible predictor

- of sentinel lymph node status in cutaneous melanoma: a case-control study. *J Clin Pathol*. 2006 Feb;59(2):166-73.
67. Liu B, Ma J, Wang X, Su F, Li X, Yang S, et al. Lymphangiogenesis and its relationship with lymphatic metastasis and prognosis in malignant melanoma. *Anat Rec (Hoboken)*. 2008 Oct;291(10):1227-35.
 68. Matsumoto K, Nakayama Y, Inoue Y, Minagawa N, Katsuki T, Shibao K, et al. Lymphatic Microvessel Density is an Independent Prognostic Factor in Colorectal Cancer. *Diseases of the Colon & Rectum*. [online]. 2006;50:308-14.
 69. Nakamura Y, Yasuoka H, Tsujimoto M, Kurozumi K, Nakahara M, Nakao K, et al. Importance of lymph vessels in gastric cancer: a prognostic indicator in general and a predictor for lymph node metastasis in early stage cancer. *J Clin Pathol*. 2006 Jan;59(1):77-82.
 70. Kyzas PA, Geleff S, Batistatou A, Agnantis NJ, Stefanou D. Evidence for lymphangiogenesis and its prognostic implications in head and neck squamous cell carcinoma. *J Pathol*. 2005 Jun;206(2):170-7.
 71. Roma AA, Magi-Galluzzi C, Kral MA, Jin TT, Klein EA, Zhou M. Peritumoral lymphatic invasion is associated with regional lymph node metastases in prostate adenocarcinoma. *Mod Pathol*. 2006 Mar;19(3):392-8.
 72. Cunnick GH, Jiang WG, Douglas-Jones T, Watkins G, Gomez KF, Morgan MJ, et al. Lymphangiogenesis and lymph node metastasis in breast cancer. *Mol Cancer*. 2008;7:23.
 73. Birner P, Schindl M, Obermair A, Plank C, Breitenecker G, Kowalski H, et al. Lymphatic microvessel density in epithelial ovarian cancer: its impact on prognosis. *Anticancer Res*. 2000 Sep-Oct;20(5A):2981-5.
 74. Sundar SS, Zhang H, Brown P, Manek S, Han C, Kaur K, et al. Role of lymphangiogenesis in epithelial ovarian cancer. *Br J Cancer*. 2006 Jun 5;94(11):1650-7.
 75. Zhang SQ, Yu H, Zhang LL. Clinical implications of increased lymph vessel density in the lymphatic metastasis of early-stage invasive cervical carcinoma: a clinical immunohistochemical method study. *BMC Cancer*. 2009;9:64.
 76. Longatto-Filho A, Pinheiro C, Pereira SM, Etlinger D, Moreira MA, Jube LF, et al. Lymphatic vessel density and epithelial D2-40

- immunoreactivity in pre-invasive and invasive lesions of the uterine cervix. *Gynecol Oncol.* 2007 Oct;107(1):45-51.
- 77.Stefansson IM, Salvesen HB, Akslen LA. Vascular proliferation is important for clinical progress of endometrial cancer. *Cancer Res.* 2006 Mar 15;66(6):3303-9.
 - 78.Balbi G, Monteverde A, Passaro M, Cassese E, Landino I, Visconti S. Vascular endothelial growth factor (VEGF): can we use it as prognostic factor in endometrial cancer? *Minerva Ginecol.* 2006 Oct;58(5):411-5.
 - 79.Donoghue JF, Lederman FL, Susil BJ, Rogers PA. Lymphangiogenesis of normal endometrium and endometrial adenocarcinoma. *Hum Reprod.* 2007 Jun;22(6):1705-13.
 - 80.Podgrabinska S, Braun P, Velasco P, Kloos B, Pepper MS, Skobe M. Molecular characterization of lymphatic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Dec 10;99(25):16069-74.
 - 81.Ueki M. Histologic study of endometriosis and examination of lymphatic drainage in and from the uterus. *Am J Obstet Gynecol.* 1991 Jul;165(1):201-9.
 - 82.Uchino S, Ichikawa S, Okubo M, Nakamura Y, Iimura A. Methods of detection of lymphatics and their changes with oestrous cycle. *Int Angiol.* 1987 Jul-Sep;6(3):271-8.
 - 83.Rogers PA, Donoghue JF, Girling JE. Endometrial lymphangiogenesis. *Placenta.* 2008 Mar;29 Suppl A:S48-54.
 - 84.Rogers PA, Donoghue JF, Walter LM, Girling JE. Endometrial angiogenesis, vascular maturation, and lymphangiogenesis. *Reprod Sci.* 2009 Feb;16(2):147-51.
 - 85.Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, Simopoulos C, Gatter KC, Harris AL, et al. LYVE-1 immunohistochemical assessment of lymphangiogenesis in endometrial and lung cancer. *J Clin Pathol.* 2005 Feb;58(2):202-6.
 - 86.Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med.* 1991 Jan 3;324(1):1-8.
 - 87.Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Colpaert C, Marson LP, Gion M, et al. Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumours. *Eur J Cancer.* 2002 Aug;38(12):1564-79.

88. Shields JD, Borsetti M, Rigby H, Harper SJ, Mortimer PS, Levick JR, et al. Lymphatic density and metastatic spread in human malignant melanoma. *Br J Cancer*. 2004 Feb 9;90(3):693-700.
89. Hall FT, Freeman JL, Asa SL, Jackson DG, Beasley NJ. Intratumoral lymphatics and lymph node metastases in papillary thyroid carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2003 Jul;129(7):716-9.
90. Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS*. 1988 May;96(5):379-94.
91. Choi WW, Lewis MM, Lawson D, Yin-Goen Q, Birdsong GG, Cotsonis GA, et al. Angiogenic and lymphangiogenic microvessel density in breast carcinoma: correlation with clinicopathologic parameters and VEGF-family gene expression. *Mod Pathol*. 2005 Jan;18(1):143-52.
92. Nose K, Saito H, Kuroki T. Isolation of a gene sequence induced later by tumor-promoting 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in mouse osteoblastic cells (MC3T3-E1) and expressed constitutively in ras-transformed cells. *Cell Growth Differ*. 1990 Nov;1(11):511-8.
93. Wetterwald A, Hoffstetter W, Cecchini MG, Lanske B, Wagner C, Fleisch H, et al. Characterization and cloning of the E11 antigen, a marker expressed by rat osteoblasts and osteocytes. *Bone*. 1996 Feb;18(2):125-32.
94. Kawase A, Ishii G, Nagai K, Ito T, Nagano T, Murata Y, et al. Podoplanin expression by cancer associated fibroblasts predicts poor prognosis of lung adenocarcinoma. *Int J Cancer*. 2008 Sep 1;123(5):1053-9.
95. Breiteneder-Geleff S, Matsui K, Soleiman A, Meraner P, Poczewski H, Kalt R, et al. Podoplanin, novel 43-kd membrane protein of glomerular epithelial cells, is down-regulated in puromycin nephrosis. *Am J Pathol*. 1997 Oct;151(4):1141-52.
96. Matsui K, Breiteneder-Geleff S, Soleiman A, Kowalski H, Kerjaschki D. Podoplanin, a novel 43-kDa membrane protein, controls the shape of podocytes. *Nephrol Dial Transplant*. 1999;14 Suppl 1:9-11.
97. Levidiotis V, Power DA. New insights into the molecular biology of the glomerular filtration barrier and associated disease. *Nephrology (Carlton)*. 2005 Apr;10(2):157-66.

98. Schacht V, Ramirez MI, Hong YK, Hirakawa S, Feng D, Harvey N, et al. T1alpha/podoplanin deficiency disrupts normal lymphatic vasculature formation and causes lymphedema. *EMBO J*. 2003 Jul 15;22(14):3546-56.
99. Marks A, Sutherland DR, Bailey D, Iglesias J, Law J, Lei M, et al. Characterization and distribution of an oncofetal antigen (M2A antigen) expressed on testicular germ cell tumours. *Br J Cancer*. 1999 May;80(3-4):569-78.
100. Breiteneder-Geleff S, Soleiman A, Horvat R, Amann G, Kowalski H, Kerjaschki D. [Podoplanin--a specific marker for lymphatic endothelium expressed in angiosarcoma]. *Verh Dtsch Ges Pathol*. 1999;83:270-5.
101. Ji RC, Eshita Y, Kato S. Investigation of intratumoural and peritumoural lymphatics expressed by podoplanin and LYVE-1 in the hybridoma-induced tumours. *Int J Exp Pathol*. 2007 Aug;88(4):257-70.
102. Kalof AN, Cooper K. D2-40 immunohistochemistry--so far! *Adv Anat Pathol*. 2009 Jan;16(1):62-4.
103. Dumoff KL, Chu C, Xu X, Pasha T, Zhang PJ, Acs G. Low D2-40 immunoreactivity correlates with lymphatic invasion and nodal metastasis in early-stage squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Mod Pathol*. 2005 Jan;18(1):97-104.
104. Wicki A, Christofori G. The potential role of podoplanin in tumour invasion. *Br J Cancer*. 2007 Jan 15;96(1):1-5.
105. Ordonez NG. D2-40 and podoplanin are highly specific and sensitive immunohistochemical markers of epithelioid malignant mesothelioma. *Hum Pathol*. 2005 Apr;36(4):372-80.
106. Zaino RJ, Kurman RJ, Diana KL, Morrow CP. The utility of the revised International Federation of Gynecology and Obstetrics histologic grading of endometrial adenocarcinoma using a defined nuclear grading system. A Gynecologic Oncology Group study. *Cancer*. 1995 Jan 1;75(1):81-6.
107. Tavassoli FD. *Pathology & Genetics Tumors of Breast and Female Genital Organs* Lion. International Agency for Research on Cancer - IARC Press. 2003.
108. Alkushi A, Abdul-Rahman ZH, Lim P, Schulzer M, Coldman A, Kalloger SE, et al. Description of a novel system for grading of endometrial carcinoma and comparison with existing grading systems. *Am J Surg Pathol*. 2005 Mar;29(3):295-304.

109. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 1991 Nov;19(5):403-10.
110. Silverberg SG. Histopathologic grading of ovarian carcinoma: a review and proposal. *Int J Gynecol Pathol*. 2000 Jan;19(1):7-15.
111. Weibel ER. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. *Lab Invest*. 1963 Feb;12:131-55.
112. McCall RB. Fundamental Statistics for Psychology. In: Hardcourt BW, editor. 1970. p. 284-91.
113. Draper NRS, H. Applied Regression Analysis. In: SOns JW, editor. Second edition ed. New York 1981.
114. Kleinbaum DG. Statistics in the health sciences: Logistic regression. Springer-Verlag, editor. New York 1994.
115. Cox DR. Regression models and life tables. *Journal of the Royal Statistical Society*. 1964;26:103-10.
116. Cox DR. Regression models and life tables *Journal of the Royal Statistical Society*. 1972;34:187-220.
117. Kaplan ELM, P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *Journal of American Statistics Association*. 1958;53:457-81.
118. Breslow N. A generalized Kruskal-Wallis test for comparing K samples subject to unequal patterns of censorship. *Biometrika*. 1970;57:579-94.
119. Dean AG DJ, Coulombier at al. Epi Info™, version 6.04a, a word processing database, and statistics problem for public health on IBM 1996;July.
120. Alitalo K, Tammela T, Petrova TV. Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature*. 2005 Dec 15;438(7070):946-53.
121. He Y, Rajantie I, Pajusola K, Jeltsch M, Holopainen T, Yla-Herttuala S, et al. Vascular endothelial cell growth factor receptor 3-mediated activation of lymphatic endothelium is crucial for tumor cell entry and spread via lymphatic vessels. *Cancer Res*. 2005 Jun 1;65(11):4739-46.

122. Stacker SA, Baldwin ME, Achen MG. The role of tumor lymphangiogenesis in metastatic spread. *FASEB J*. 2002 Jul;16(9):922-34.
123. Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson EW. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol*. 2006 Mar 27;172(7):973-81.
124. Wincewicz A, Baltaziak M, Kanczuga-Koda L, Lesniewicz T, Rutkowski R, Sobaniec-Lotowska M, et al. Aberrant distributions and relationships among E-cadherin, beta-catenin, and connexin 26 and 43 in endometrioid adenocarcinomas. *Int J Gynecol Pathol*. 2010 Jul;29(4):358-65.
125. Samarathai N, Hall K, Yeh IT. Molecular profiling of endometrial malignancies. *Obstet Gynecol Int*. 2010;2010:162363.
126. Zaganelli FL, Carvalho FM, Almeida BG, Bacchi CE, Goes JC, Calil MA, et al. Intratumoral lymphatic vessel density and clinicopathologic features of patients with early-stage cervical cancer after radical hysterectomy. *Int J Gynecol Cancer*. 2010 Oct;20(7):1225-31.
127. Gombos Z, Xu X, Chu CS, Zhang PJ, Acs G. Peritumoral lymphatic vessel density and vascular endothelial growth factor C expression in early-stage squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Clin Cancer Res*. 2005 Dec 1;11(23):8364-71.
128. Birner P, Schindl M, Obermair A, Breiteneker G, Kowalski H, Oberhuber G. Lymphatic microvessel density as a novel prognostic factor in early-stage invasive cervical cancer. *Int J Cancer*. 2001 Jan 20;95(1):29-33.
129. Gao Y, Liu Z, Gao F, Meng XY. High density of peritumoral lymphatic vessels is a potential prognostic marker of endometrial carcinoma: a clinical immunohistochemical method study. *BMC Cancer*. 2010;10:131.
130. Vandenput I, Vanhove T, Calster BV, Gorp TV, Moerman P, Verbist G, et al. The use of lymph vessel markers to predict endometrial cancer outcome. *Int J Gynecol Cancer*. 2010 Apr;20(3):363-7.
131. Padera TP, Kadambi A, di Tomaso E, Carreira CM, Brown EB, Boucher Y, et al. Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics. *Science*. 2002 Jun 7;296(5574):1883-6.