

GLAUCO BAIOCCHI NETO

**Perfil da expressão imunoistoquímica de HER-2,
NF- κ B e IKK α em câncer de colo uterino
tratado com radioterapia**

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

Programa de Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Ademar Lopes

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

Baiocchi Neto, Glauco

Perfil da expressão imunistoquímica de HER-2, NF- κ B e IKK α em câncer de colo uterino tratado com radioterapia / Glauco Baiocchi Neto. -- São Paulo, 2011.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Oncologia.

Orientador: Ademar Lopes.

Descritores: 1.Neoplasias do colo do útero 2.Prognóstico 3.Receptor erbB-2
4.NF-kappa B 5.Imunistoquímica 6.Radioterapia

USP/FM/DBD-299/11

DEDICATÓRIA

Aos **pacientes**, exemplos de força e dignidade na luta pela vida.

À **Deus**, por ter me dado saúde e oportunidade de crescer e aprender na vida pessoal e profissional.

À **Jaqueline**, pelo amor, compreensão e apoio incondicionais.

AGRADECIMENTOS

À minha **mãe**, exemplo de honestidade e perseverança. Pelo seu alicerce e por ter sempre me estimulado, apoiado e proporcionado condições para o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

À minha **irmã** e **avó** Anésia pelo apoio, presença e confiança sempre em mim depositadas.

Ao meu **pai**, a quem tenho orgulho de seguir o mesmo nome e profissão.

Ao **Prof. Dr. Ademar Lopes**, não somente pela presente orientação, mas por ter conhecido sua competência profissional ainda durante minha vida acadêmica. Foi responsável pela minha escolha de especialização em oncologia cirúrgica e a quem devo muito respeito e admiração.

À **Dra Maria Dirlei Begnami**, pela qualidade impecável da minuciosa análise anatomopatológica, ativa colaboração na confecção do trabalho, disponibilidade e demonstração de amizade.

Aos colegas do Departamento de Ginecologia do Hospital AC Camargo, **Dra. Elza Mieko Fukazawa, Dr. Carlos Chaves Faloppa, Dr. Renato Almeida Rosa de Oliveira, Dr. Levon Badiglian Filho, Dra. Lillian Yuri Kumagai e Dr. Ademir Narciso de Oliveira Menezes** com quem tenho orgulho de trabalhar e conviver, pelo apoio e confiança sempre em mim depositados.

Ao **Dr. Gustavo Cardoso Guimarães**, pela amizade, disponibilidade e estímulo profissional e científico.

Word did not find any entries for your table of contents.Ao **Prof. Dr. Fernando Augusto Soares**, por ter dado apoio e todo suporte técnico do Departamento de Anatomia Patológica, imprescindível para realização do presente trabalho.

Aos profissionais do **Serviço de Arquivo Médico (SAME)**, em especial a **Sra Hirde Contesini**, pela competência e disponibilidade em ajudar no levantamento dos prontuários médicos.

À **Sra Suely Francisco**, pela ajuda no levantamento bibliográfico.

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

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

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

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

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Lista de tabelas

Lista de figuras e gráficos

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	O câncer do colo uterino	1
1.2	HER-2 - Receptor da família ErbB	4
1.3	O Fator Nuclear- κ B (NF- κ B)	7
1.4	Relação entre HER-2 e Fator Nuclear- κ B (NF- κ B)	12
2	OBJETIVOS	16
3	CASUÍSTICA E MÉTODOS	17
3.1	Tipo de estudo	17
3.2	Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa	17
3.3	Métodos	17
3.3.1	Coleta de dados	17
3.3.2	Critérios de inclusão	18
3.3.3	Critérios de exclusão	19
3.3.4	Variáveis coletadas	19

3.3.5	Determinação imunoistoquímica da expressão de NF- κ B-p65, NF- κ B-p50, IKK α e HER-2	20
3.3.6	Protocolo de hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH)	32
3.3.7	Sobrevida global, sobrevida câncer específica e sobrevida livre de doença .	34
3.3.8	Análise estatística	34
3.4	Casuística	35
3.4.1	Composição da amostra	35
3.4.2	Dados demográficos e clínicos	36
3.4.3	Dados de anatomia patológica	36
3.4.4	Dados do seguimento	37
4	RESULTADOS	38
4.1	Expressão imunoistoquímica de NF- κ B, IKK α e HER-2 em material de biópsia prévia à radioterapia.....	38
4.2	Análise da hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH)	40
4.3	Expressão imunoistoquímica de NF- κ B, IKK α E HER-2 nos tumores dos pacientes com doença residual na peça da histerectomia radical	40
4.4	Testes de associação entre as variáveis	41
4.5	Sobrevida livre de doença	48
4.6	Sobrevida câncer específica	48
4.7	Sobrevida global	48
5	DISCUSSÃO	51

6	CONCLUSÕES	65
7	REFERÊNCIAS	67

LISTA DE ABREVIATURAS

Akt	proteína quinase B
BATD	braquiterapia de alta taxa de dose
DR	doença residual
EC	estádio clínico
EGFR	receptor do fator de crescimento epidérmico
ErbB	produto gênico da eritroblastose viral
et al.	e outros
FIGO	Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
FISH	hidridização <i>in situ</i> fluorescente
GCSF	fator de estímulo do crescimento granulocítico
HER-2	Receptor humano epidérmico tipo 2
HPV	papiloma vírus humano
HR	histerectomia radical
IAP	inibidor da apoptose
IκB	proteínas inibidoras de kappa B
IKK	enzima quinase das proteínas inibidoras de kappa B
IL	interleucina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
MAPK	proteína quinase mitógeno ativado
NF-κB	fator nuclear – kappa B
NIC I	neoplasia intraepitelial cervical de baixo grau

NIC III	neoplasia intraepitelial cervical de alto grau
PI3K	fosfatidilinositol-3-quinase
RHD	homologia do domínio Rel
RE	radioterapia externa
TNF	fator de necrose tumoral
VEGF	fator de crescimento vascular endotelial

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Frequências das expressões imunoistoquímicas de NF- κ B-p65, NF- κ B-p50, IKK α e HER-2 nos tumores das 32 pacientes submetidas à radioterapia seguido de histerectomia radical 39
Tabela 2	Frequências das expressões imunoistoquímicas de NF- κ B-p65, NF- κ B-p50, IKK α e HER-2 nos tumores das 12 pacientes com doença residual após radioterapia 42
Tabela 3	Padrão de expressão imunoistoquímica de NF- κ B entre o material da biópsia pré-operatória e a doença residual das 12 pacientes com resposta incompleta à radioterapia 43
Tabela 4	Correlação entre as variáveis clinicopatológicas e a expressão de NF- κ B-p50 no núcleo das células neoplásicas das 32 pacientes submetidas à radioterapia seguida de histerectomia radical 44
Tabela 5	Correlação entre as variáveis clinicopatológicas e a expressão de NF- κ B-p65 no núcleo das células neoplásicas das 32 pacientes submetidas à radioterapia seguida de histerectomia radical 45
Tabela 6	Correlação entre as variáveis clinicopatológicas e a expressão de HER-2 na membrana das células neoplásicas das 32 pacientes submetidas à radioterapia seguida de histerectomia radical 46
Tabela 7	Correlação entre as expressões de HER-2 e NF- κ B das 32 pacientes submetidas à radioterapia seguida de histerectomia radical 47

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 1	Estrutura dos receptores da Família ErbB	5
Figura 2	Vias clássica e alternativa de ativação do NF- κ B	10
Figura 3	Representação esquemática da rede de sinalização do NF- κ B e sua relação com a indução de radiorresistência	14
Figura 4	Fotomicrografia de carcinoma epidermóide do colo uterino mostrando forte intensidade de expressão imunoistoquímica (“3+”) em citoplasma e núcleo para NF- κ B p50 (40x)	24
Figura 5	Fotomicrografia de carcinoma epidermóide do colo uterino mostrando moderada intensidade de expressão imunoistoquímica (“2+”) em citoplasma e núcleo para NF- κ B p50 (40x)	25
Figura 6	Fotomicrografia de carcinoma epidermóide do colo uterino mostrando forte intensidade de expressão imunoistoquímica (“3+”) em citoplasma e núcleo para NF- κ B p65 (40x)	26
Figura 7	Fotomicrografia de carcinoma epidermóide do colo uterino mostrando moderada intensidade de expressão imunoistoquímica (“2+”) em citoplasma e núcleo para NF- κ B p65 (20x)	27
Figura 8	Fotomicrografia de carcinoma epidermóide do colo uterino mostrando ausência de expressão imunoistoquímica de IKK α (20x)	28
Figura 9	Fotomicrografia de carcinoma epidermóide do colo uterino mostrando forte intensidade de expressão imunoistoquímica (“3+”) em membrana para HER-2 (40x)	29

Figura 10	Fotomicrografia de carcinoma epidermóide do colo uterino mostrando moderada intensidade de expressão imunoistoquímica (“2+”) em membrana para HER-2 (20x)	30
Figura 11	Fotomicrografia de carcinoma epidermóide do colo uterino mostrando fraca intensidade de expressão imunoistoquímica (“1+”) em membrana para HER-2 (20x)	31
Figura 12	Amplificação gênica de HER-2 observada por hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH).	33
Gráfico 1	Curva de sobrevida livre de doença para as 32 pacientes portadoras de carcinoma epidermóide do colo uterino	49
Gráfico 2	Curva de sobrevida global para as 32 pacientes portadoras de carcinoma epidermóide do colo uterino	50

RESUMO

Baiocchi Neto G. *Perfil da expressão imunoistoquímica de HER-2, NF- κ B e IKK α em câncer de colo uterino tratado com radioterapia*. [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011.

INTRODUÇÃO: O tratamento padrão do câncer do colo uterino é a histerectomia radical para doença inicial e quimio-radioterapia para doença avançada. A radioterapia após a histerectomia radical tem impacto em ganho de sobrevida caso hajam fatores de risco histopatológicos para recidiva. Portanto, a busca de marcadores preditores de radiosensibilidade torna-se importante para a individualização do planejamento terapêutico. O HER-2/ErbB-2 faz parte da família de proteínas ErbB que formam um grupo de receptores de membrana e tem um papel crítico no controle de diversas funções celulares básicas como diferenciação, proliferação, migração e sobrevida celular. A ação do NF- κ B na carcinogênese pode ocorrer através da regulação da apoptose e controle do ciclo celular. Para ativação do NF- κ B é necessário a enzima quinase IKK e a atividade do NF- κ B foi relacionada com resistência tumoral a quimioterapia e radioterapia. A via PI3K/Akt mediada pela hiperexpressão de HER-2 pode estar envolvida na ativação do NF- κ B. Os objetivos foram: a) avaliar os padrões de expressão imunoistoquímica de HER-2, NF- κ B-p65, NF- κ B-p50 e IKK α em pacientes portadores de câncer do colo uterino submetidos à radioterapia; b) avaliar o “status” do gene HER2 através de FISH; c) avaliar o papel da expressão imunoistoquímica de NF- κ B-p65, NF- κ B-p50, IKK α e HER-2 como fator prognóstico para sobrevida livre de doença e sobrevida global. MATERIAIS E

MÉTODOS: Trata-se de estudo retrospectivo que avaliou uma série de 32 pacientes portadores de câncer do colo do útero submetidos a tratamento com radioterapia seguido de histerectomia no período de janeiro de 1992 a junho de 2001.

RESULTADOS: A idade mediana foi 45 anos (22-67). Um paciente apresentava-se no estágio IB2 (FIGO) e 31 (96,9%) estágio IIB. Todos os pacientes foram submetidos à teleterapia e braquiterapia com alta taxa de dose com caráter neoadjuvante à histerectomia radical (HR). Dezesesseis (50%) pacientes apresentaram doença residual após radioterapia. O tempo de seguimento mediano foi de 73,5 meses. A sobrevida global da amostra foi de 66,5% em 5 anos. As expressões imunohistoquímicas de NF- κ B-p65 e NF- κ B-p50 em citoplasma nos tumores primários foram encontradas em respectivamente 90,6% e 96,9% dos casos. As expressões de NF- κ B-p65 e NF- κ B-p50 em núcleo nos tumores primários 59,4% dos casos em ambos. As expressões de NF- κ B-p65 e NF- κ B-p50 em citoplasma nos tumores residuais após tratamento com radioterapia foram encontradas 50% dos casos em ambos. A expressão em núcleo de NF- κ B-p50 nos tumores residuais após tratamento com radioterapia foi encontrada em 75% dos casos. Não houve expressão em núcleo de NF- κ B-p65 nos tumores residuais. A expressão imunohistoquímica de HER-2 nos tumores primários foi encontrada em 21,9% dos casos. Não houve expressão imunohistoquímica de HER-2 nos tumores residuais do colo uterino. A amplificação gênica de HER-2 nos tumores primários foi encontrada em 1 (3,1%) caso. Não houve expressão imunohistoquímica de IKK α nos tumores primários ou residuais. As expressões imunohistoquímicas de HER-2, NF- κ B-p65 e NF- κ B-p50 não se correlacionaram com a resposta ao tratamento radioterápico pré-operatório. As expressões imunohistoquímicas positivas de NF- κ B-p65, NF- κ B-p50, IKK α e HER-2

não se associaram a piores taxas de sobrevida livre de doença e sobrevida global.

CONCLUSÕES: Nossos dados sugerem que as expressões imunohistoquímicas de NF- κ B e HER-2 não são capazes de prever resposta à radioterapia e não estão relacionadas com pior prognóstico. O NF- κ B parece ser constitutivamente ativado no câncer do colo uterino.

Descritores: Neoplasias do colo do útero; Prognóstico; Receptor erbB-2; NF-kappa B; Imunohistoquímica; Radioterapia.

SUMMARY

Baiocchi Neto G. *Immunohistochemical expression of HER-2, NF- κ B and IKK α in patients with cervical cancer treated with radiation therapy*. [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2011.

INTRODUCTION: The standard treatment of early cervical cancer is radical hysterectomy and concomitant radiation therapy and chemotherapy for advanced stages. After radical hysterectomy, adjuvant radiation therapy is indicated if risk factors are present. HER-2 is part of protein membrane family that has a critical role in cellular differentiation, proliferation and survival. The NF- κ B regulates apoptosis, cellular cycle, adhesion and cellular migration. NF- κ B is activated by IKK kinase. NF- κ B activation is related to resistance to radiotherapy and chemotherapy. The overexpression of HER-2 may activate the NF- κ B pathway through PI3K/Akt. Our aims were: a) analyze the immunohistochemical expression of HER-2, NF- κ B-p50, NF- κ B-p65 and IKK α in patients with cervical cancer treated with radiation therapy followed by radical hysterectomy; b) analyze the HER-2 amplification gene with FISH; c) evaluate the immunohistochemical expression of HER-2, NF- κ B-p50, NF- κ B-p65 and IKK α as a prognostic factor to recurrence and death. **MATERIALS AND METHODS:** A retrospective analysis was carried out on 32 patients with cervical cancer submitted to radical hysterectomy after neoadjuvant radiotherapy from January 1992 to June 2001. **RESULTS:** The median age was 45 years (22-67). One patient was stage IB2 (FIGO) and 31 IIB (96,9%). All patients received external beam radiotherapy and high dose vaginal brachytherapy. Sixteen (50%) patients had

residual pathological disease after radical hysterectomy. Median follow-up time was 73.5 months and overall 5-year survival was 66.5%. Immunohistochemical cytoplasmic expression of NF- κ B-p65 e NF- κ B-p50 before radiotherapy was found in respectively 90.6% and 96.9% of cases. Immunohistochemical nuclear expression of NF- κ B-p65 and NF- κ B-p50 before radiotherapy was found in both 59.4% of cases. Immunohistochemical cytoplasmic expression of NF- κ B-p65 and NF- κ B-p50 in the residual tumors after radiotherapy was found in both 50% of cases. Immunohistochemical nuclear expression of NF- κ B-p50 in the residual tumors was found in 75% of cases. There was no nuclear expression of NF- κ B-p65 in the residual tumors. Immunohistochemical expression of HER-2 was found in 21.9% of cases. However, gene amplification was found in one case (3.1%). There was no expression of IKK α in neither primary nor residual tumors. HER-2 and NF- κ B were not correlated to the risk of residual tumor after radiotherapy. Immunohistochemical expression of HER-2 and NF- κ B were not correlated to risk of recurrence or death. CONCLUSIONS: Our data suggest that NF- κ B is constitutively activated in advanced cervical cancer. NF- κ B and HER-2 may not predict response to radiotherapy and do not correlate to poor outcome.

Descriptors: Uterine cervical neoplasms; Prognosis; Receptor erbB-2; NF-kappa B; Immunohistochemistry; Radiotherapy.

1 INTRODUÇÃO

1.1 O CÂNCER DO COLO UTERINO

O câncer do colo uterino apresenta importância epidemiológica global, com uma incidência anual de quase 500 mil casos novos e uma taxa de mortalidade de cerca de 50% (Jemal et al., 2011).

Nos países desenvolvidos são diagnosticadas anualmente mais de 90.000 mulheres com câncer do colo uterino e quase 40.000 irão morrer desta neoplasia (Jemal et al., 2011). Em nosso meio, a frequência do câncer do colo uterino é elevada, especialmente em regiões menos desenvolvidas economicamente. Para o ano de 2010 foi estimada a ocorrência de 18.430 casos novos de câncer do colo do útero, com um risco estimado de 18,4 casos novos a cada 100 mil mulheres. A mais alta incidência no Brasil é de 31,1/100 mil para o estado do Amazonas. (Ministério da Saúde – INCA, 2011).

O estadiamento utilizado para os tumores malignos do colo uterino é o proposto pela Federação Internacional de Ginecologia e Obstetria (FIGO) (Pecorelli et al., 2009) (quadro 1). Embora baseado essencialmente em parâmetros clínicos, tem ampla aceitação internacional pela sua aplicabilidade simples e pelo potencial prognóstico que apresenta (Shingleton e Orr, 1995). Neste sentido o *Annual Report on Results of Treatment in Gynecological Cancer* da FIGO de 2006, mostrou que as taxas de sobrevida global das pacientes com câncer do colo uterino em cinco anos foram de 89-97% para o estágio clínico

(EC) I; de 65-75% para o EC II; de 39-41% para o EC III e de 9,3-22% para o EC IV.

O tratamento padrão é a histerectomia radical para doença inicial e quimioterapia concomitante a radioterapia para os tumores avançados (National Comprehensive Cancer Network, 2011). Existe evidência que a radioterapia adjuvante melhora o controle local e sobrevida em pacientes que apresentam fatores de risco histopatológicos para recorrência após a histerectomia radical (Peters et al., 2000; Sedlis et al., 1999). Como consequência, uma grande parcela das pacientes receberá radioterapia até o término do tratamento inicial.

Tumores persistentes ou recorrentes na pelve são as causas principais de óbito e a falha terapêutica da radioterapia no controle local pode ser atribuída à presença de uma população celular radorresistente (Bristow et al., 2005).

Perez et al. (1995) relataram doença recorrente ou persistente na pelve em 10% dos EC IB; 17% para EC IIA; 23% para EC IIB; 42% para EC III e 74% para EC IVA, após radioterapia exclusiva. Ferrigno et al. (2001) demonstraram em nosso meio, falha do controle local em 27,9% das pacientes com câncer do colo do útero tratadas também com radioterapia exclusiva.

Atualmente, os principais fatores prognósticos do câncer do colo uterino localmente avançado tratados com radioterapia são os clinicopatológicos e incluem: estágio, tamanho e histologia (Noordhuis et al., 2011). Com o objetivo de prever a resposta à radioterapia, faz-se necessária a melhor compreensão dos eventos moleculares que ocorrem após a irradiação e a descoberta de novos mecanismos relacionados à radorresistência. Alguns destes mecanismos foram recentemente descritos e estão relacionados ao dano e reparo do DNA, apoptose e parada do ciclo

Quadro 1 - Estadiamento do Câncer do Colo do Útero – FIGO (Pecorelli et al., 2009)

<p>ESTÁDIO I:</p> <p>Ia – O câncer invasor é identificado somente microscopicamente. Todas as lesões macroscópicas, ainda que com invasão superficial, são do estágio Ib.</p> <p>Ia1 – A invasão do estroma em profundidade não excede 3 mm e não é maior que 7 mm de extensão.</p> <p>Ia2 – A invasão do estroma mede acima de 3 e até 5 mm de profundidade e não excede os 7 mm de extensão.</p> <p>Ib – Lesões clínicas limitadas ao colo do útero ou lesões pré-clínicas maiores que o estágio clínico Ia.</p> <p>Ib1 – Lesões clínicas até 4 cm de tamanho.</p> <p>Ib2 – Lesões clínicas maiores que 4 cm de tamanho.</p>
<p>ESTÁDIO II:</p> <p>O tumor estende-se além do colo, mas não atinge a parede pélvica. A lesão pode envolver a vagina, mas não até o seu terço inferior.</p> <p>Ila – Envolvimento não evidente do paramétrio. Não invade terço inferior da vagina.</p> <p>Ila1 – Lesões clínicas até 4 cm de tamanho.</p> <p>Ila2 – Lesões clínicas maiores que 4 cm de tamanho.</p> <p>Ilb – Envolvimento do paramétrio evidente, porém não atingindo a parede pélvica.</p>
<p>ESTÁDIO III:</p> <p>O tumor estende-se à parede pélvica. Ao toque retal não há espaço livre entre o tumor e a parede pélvica. O tumor pode envolver o terço inferior da vagina. Todos os carcinomas com hidronefrose ou exclusão renal se incluem nesse estágio.</p> <p>IIIa – Não há extensão à parede pélvica, porém envolve o terço inferior da vagina.</p> <p>IIIb – Extensão à parede pélvica e/ou hidronefrose ou exclusão renal.</p> <p>Obs.: Deve ser considerado IIIb se o paramétrio for nodular/tumoral até a parede pélvica ou se houver extensão direta tumoral.</p>
<p>ESTÁDIO IV:</p> <p>O tumor estende-se além da pelve verdadeira ou clinicamente envolve a mucosa da bexiga ou reto.</p> <p>O edema bolhoso (mucosa vesical) não permite classificar o caso como estágio IV.</p> <p>IVa – O tumor estende-se aos órgãos adjacentes (bexiga ou reto).</p> <p>IVb – Metástases à distância</p>

celular após a radiação ionizante (Hoff et al., 2005; Harrington et al., 2007; Diaz-Cano, 2008; Szumiel, 2008; Williams et al., 2008).

Concomitante ao melhor entendimento dos mecanismos de radiorresistência, torna-se cada vez mais importante a busca por marcadores preditores de radiosensibilidade. Estes, por sua vez, poderão em algum momento ser utilizados no planejamento terapêutico das pacientes com câncer do colo uterino.

1.2 HER-2 - RECEPTOR DA FAMÍLIA ERBB

A família de proteínas ErbB tem seu nome originado na homologia com o Produto Gênico da Eritroblastose Viral (*v-erbB*). Trata-se de receptores de membrana tipo I, cuja função é ativar a via de sinalização intracelular em resposta ao sinal extracelular e é formada por quatro receptores: EGFR/ErbB1, ErbB2/HER2, ErbB3/HER3 e ErbB4/HER4 (Yarden e Sliwkowski, 2001; Hynes e Lane, 2005; Grandis e Sok, 2004). O complexo de receptores ErbB é uma das vias de transmissão de sinal celular mais amplamente estudada e um exemplo do poder biológico de um sinal aberrante (Citri e Yarden, 2006). A estrutura de cada um dos receptores está representada na Figura 1.

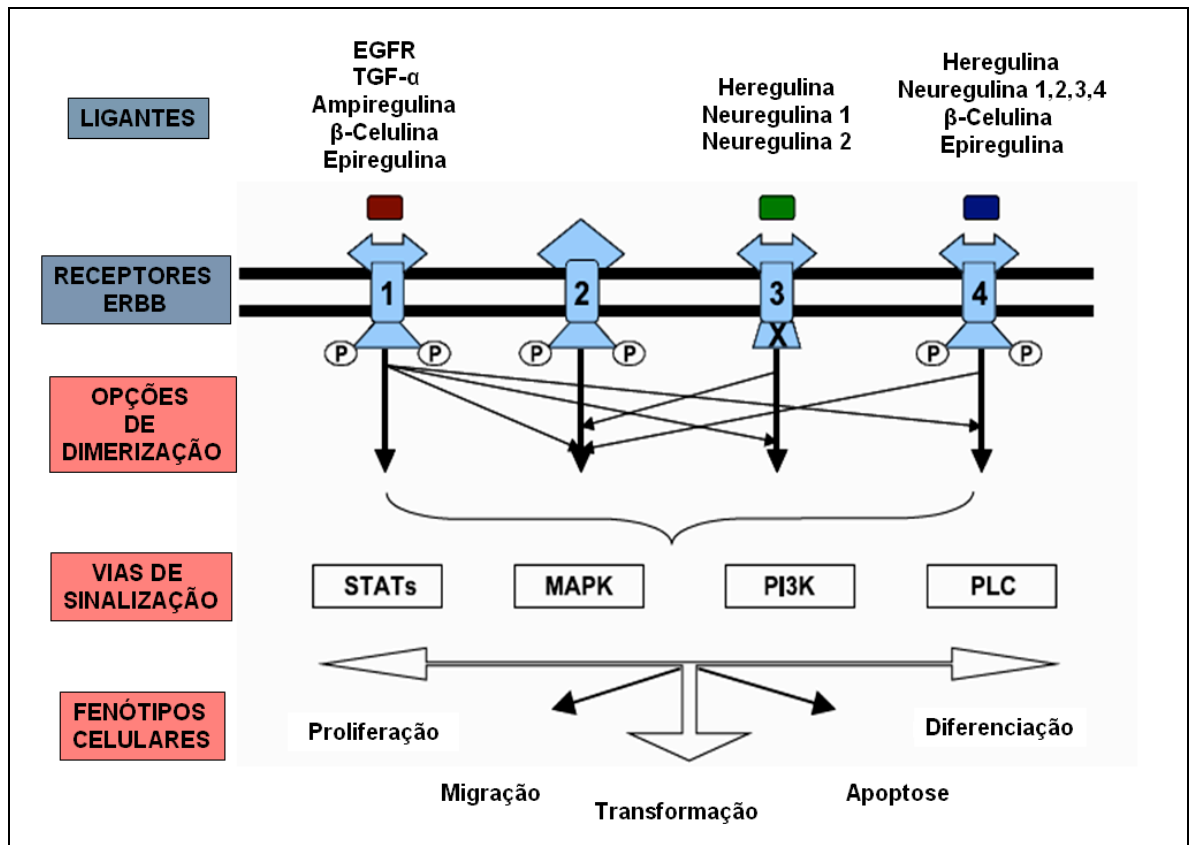


Figura 1 - Estrutura dos receptores da Família ErbB. Adaptado de Grandis e Sok, 2004

A interação entre o receptor e o seu fator de crescimento, inicia uma mudança na conformação do seu domínio extracelular de inativo para ativo e promove sua dimerização. Cada receptor homodimérico ou heterodimérico inicia uma complexa cascata de sinalização, que resulta na proliferação celular, diferenciação, migração, adesão e transformação. A seleção de parceiros para dimerização determina a atividade sinalizadora entre as proteínas ErbB (Yarden e Sliwkowski, 2001; Hynes e Lane, 2005; Moasser, 2007).

As duas maiores vias de sinalização da família ErbB é a RAS-RAF-MAPK e fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K/AKT) (Yarden e Sliwkowski 2001; Hynes e Lane 2005; Grandis e Sok 2004). RAS-RAF-MAPK (proteína quinase mitógeno ativado) são um grupo de serina-treonina quinases que regulam a proliferação celular, sobrevivência e migração no câncer. A PI3K/AKT também é uma serina-treonina quinase. Através de várias etapas intermediárias, a PI3K ativa a enzima AKT, que então age sobre fatores de transcrição no núcleo, regulando as vias de sinalização da apoptose, expressão gênica e proliferação celular (Yarden e Sliwkowski 2001; Hynes e Lane 2005; Grandis e Sok 2004).

O ErbB2 / HER-2 é o único receptor que possui uma conformação do domínio extracelular fixa e que remete a forma ativa, mesmo na ausência de um ligante. É o parceiro preferido para dimerização do EGFR, ErbB3 e ErbB4. A dimerização com HER-2 aumenta a capacidade transformante de outros receptores da família ErbB (Yarden e Sliwkowski 2001; Finnegan e Carey, 2007; Moasser, 2007). Há uma hierarquia no que se refere à potência do sinal em relação aos dímeros. Os heterodímeros são mais ativos que os homodímeros. Os heterodímeros que contêm HER-2 são particularmente mais ativos e o heterodímero HER-2-HER-3 é considerado como o que confere o sinal mais intenso (Sergina e Moasser, 2007).

O aumento da expressão proteica do HER-2, seja por amplificação gênica ou através da desregulação transcricional, ocorre em aproximadamente 25 a 30% dos casos de câncer de mama e ovário e confere pior comportamento biológico. No caso do câncer de mama a superexpressão está relacionada a com tamanho do tumor, metástase linfonodal, pior grau histológico, aneuploidia, ausência de receptores de estrógeno e maior índice proliferativo (Slamon et al., 1987; Ross e Fletcher, 1998).

A amplificação do gene HER-2 parece ser um evento precoce durante a carcinogênese do câncer de mama, sendo demonstrado em cerca de 50% dos carcinomas ductais *in situ* (Badra et al., 2006). O HER-2 é mantido durante a progressão para doença invasiva e metástase. A superexpressão e amplificação do HER-2 também ocorrem no câncer gástrico, esofágico e endometrial (Moasser, 2007).

No caso do câncer de colo uterino, a expressão do HER-2 varia entre 0% e 42% (Kristensen et al., 2006; Oka et al., 1994; Ngan et al., 2001; Nakano et al., 1997) e a amplificação do gene detectada em 0-36% dos casos (Narisawa-Saito et al. 2007). O significado do HER-2 na carcinogênese do colo uterino não está totalmente esclarecido e possivelmente o HER-2 esteja relacionado com a transformação maligna do ceratinócito HPV induzida (Al Moustafa et al. 2004; Yasmeen et al 2007; Narisawa-Saito et al. 2007). Em relação ao papel prognóstico da expressão do HER-2, os resultados são conflitantes. Leung et al. (2001) mostraram que o HER-2 apresentou importância na progressão e invasão no câncer de colo uterino, porém sem impacto prognóstico. Em outro estudo, Ngan et al. (2002) também não observou relação prognóstica. Entretanto, Niibe et al. (2003) mostraram correlação entre expressão de HER-2 ao tamanho do tumor, recidiva local e piora na sobrevida.

1.3 O FATOR NUCLEAR- κ B (NF- κ B)

O fator nuclear- κ B (NF- κ B) foi primeiramente descrito em 1986 por Sen e Baltimore (1986). A família NF- κ B/Rel é composta por 5 genes relacionados com a transcrição: NF- κ B1 (p50/p105), NF- κ B2 (p52/p100), c-Rel, RelA (p65) e RelB. (Dolcet et al., 2005). RelB, c-Rel e p65 são proteínas ativas para transcrição. Por

outro lado, p105 e p100 são moléculas precursoras e devem ser transformadas nas formas ativas p50 e p52, respectivamente. Todas proteínas NF- κ B apresentam um domínio amino-terminal, o RHD (*Rel Homology Domain*), que contém a ligação com o DNA, e um sinal de localização nuclear (NLS). O NF- κ B funcional é formado por dímeros e o dímero clássico é composto por p65/RelA e p50 (Mercurio e Manning, 1999; Baeuerle e Baltimore, 1996; Ghosh et al.; Baldwin, 1996; Foo e Nolan, 1999; May e Ghosh, 1998). A composição do dímero e o tipo celular parece contribuir para especificidade da transcrição do NF- κ B (Perkins et al., 1992; Kunsch et al., 1992).

Diversos estímulos como: citocinas, mitógenos, metais tóxicos, fatores ambientais e ocupacionais, estresse intracelular, produtos virais ou bacterianos, luz ultravioleta podem induzir a expressão de genes da família NF- κ B (Li et al., 1999; Karin et al., 2002). Por esse motivo, o NF- κ B pode estar expresso em patologias como câncer, doença auto-imune, infecções virais e choque séptico (Dolcet et al., 2005; Karin et al., 2002).

O papel do NF- κ B na regulação dos genes associados à resposta imune e inflamação já foram extensamente estudados (Hayden e Ghosh, 2011). O NF- κ B é ativado por mediadores envolvidos na resposta à inflamação ou infecção, incluindo citocinas (TNF-alfa, IL-1), fator de ativação da plaquetas, leucotrieno B4, intermediários reativos do oxigênio e proteínas virais. A natureza e diversidade destes sinais indicam um papel central do NF- κ B na regulação da resposta imune (Schwartz et al., 1999). A ativação do NF- κ B na resposta imunológica, estimula a expressão de citocinas (IL-1, IL-6, TNF-alfa, Interferon-beta e linfotóxina) e fatores de crescimento (IL-2, GCSF) que são essenciais para resposta imunológica e contribuem para inflamação. Uma autoregulação é gerada pela produção das

citocinas TNF-alfa e IL-1, onde não somente estimulam NF- κ B quanto também são estimuladas pela sua ativação. A inibição do NF- κ B por agentes anti-inflamatórios (salicilatos, dexametasona) e imunossupressores (ciclosporina A) foram identificados como alvo importante da modulação das doenças inflamatórias (Baeuerle e Baltimore, 1996; Ghosh et al.; Baldwin, 1996).

O NF- κ B está também envolvido na regulação do crescimento celular. Áreas de ligação do NF- κ B foram demonstradas em regiões promotoras do *c-myc* e tem sua ativação induzida pelo NF- κ B. Outros genes envolvidos no controle do ciclo celular como p53, p21, Rb também poderiam ser regulados pelo NF- κ B (Baeuerle e Baltimore, 1996; Ghosh et al.; Baldwin, 1996; Foo e Nolan, 1999).

Diferentes mecanismos moleculares de ativação do NF- κ B foram propostos (Bonizzi e Karin, 2004; Hayden e Ghosh, 2004). A via canônica ou clássica é ativada por citocinas pró-inflamatórias ou infecções virais (Hayden e Ghosh, 2004; Kane et al., 1999) e a via alternativa é ativada por membros da família dos fatores de necrose tumoral como as linfotoxinas B e BAFT (Solan et al., 2002) (Figura 2). Outras vias de sinalização como Ras/MAPK, PI3K/Akt também podem estar envolvidos na ativação do NF- κ B (Dolcet et al., 2005).

Em células não estimuladas o NF- κ B encontra-se sequestrado no citoplasma e inibido por proteínas inibidoras de kappaB (I κ B). A família I κ B é composta por vários membros como I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , Bcl-3, p100 e p105.

Para ativação do NF- κ B, a enzima quinase é IKK, é um complexo de 3 proteínas, 2 catalíticas (IKK α , IKK β) e 1 regulatória (IKK γ). Esse complexo é ativado por uma grande variedade de estímulos que modifica IKK γ através de

ubiquitinação e fosforilação (Chaturvedi et al., 2011). Porém, vias que não envolvem IKK para a ativação do NF- κ B foram descritas (Kato Jr et al., 2003; Ge et al., 2009).

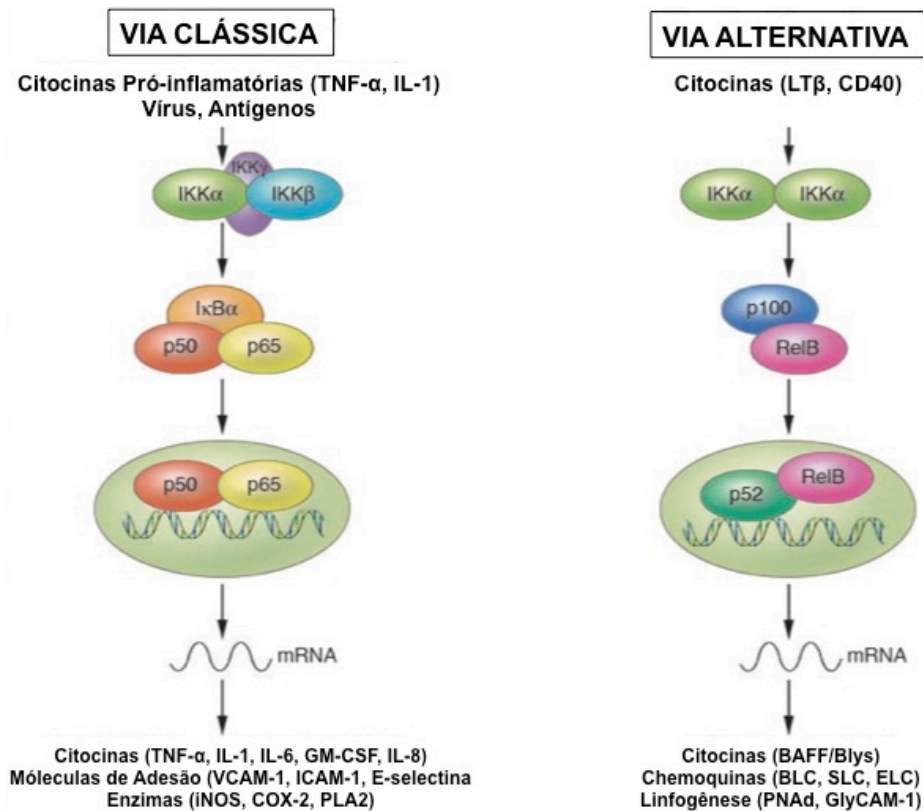


Figura 2 – Vias clássica e alternativa de ativação do NF- κ B. Modificado de Luo et al., 2005.

Na via canônica ou clássica as proteínas inibitórias I κ B ligam-se firmemente aos dímeros e os mantêm inativos, no citoplasma, em grandes complexos protéicos. Os sinais como TNF- α ou IL-1 ativam os dímeros por iniciarem uma via de sinalização que promove fosforilação, ubiquitinação e posterior degradação de I κ B.

Essa degradação expõe um sinal de localização nuclear nas proteínas NF- κ B que se deslocam para o núcleo e estimulam a transcrição de genes específicos (Alberts et al., 2002).

A via não canônica ou alternativa envolve a ativação do complexo p100-RelB em p52-RelB em resposta a sinais extra-celulares específicos (Senftleben et al., 2001)

Em resumo, o NF- κ B é ativado através da fosforilação de I κ B α pelo complexo da I κ B quinase (IKK) e resulta na translocação do NF- κ B para o núcleo onde ele se liga aos sítios κ B responsivos.

O NF- κ B induz a expressão de Inibidores da Apoptose (IAPs) (Deveraux et al., 1998) e alguns membros anti-apoptóticos da família Bcl-2. Promove a progressão do ciclo celular regulando a expressão de genes envolvidos na maquinaria do ciclo celular como as ciclinas D1, D2, D3 e ciclina E (Guttridge et al., 1999), c-myc e c-mycb (La Rosa et al., 1994). Promove a expressão de moléculas de adesão celular (ICAM-1, E-selectin), proteínas envolvidas na invasão (metaloproteinases) e fatores angiogênicos incluindo o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF).

Em alguns tumores o NF- κ B poderá permanecer ativo devido mutação nos genes dos fatores de transcrição do NF- κ B ou nos genes que controlam a atividade do NF- κ B (IKB); e em algumas condições alguns tumores secretam fatores que tornam o NF- κ B ativo (Chaturvedi et al., 2011).

A ação do NF- κ B na carcinogênese pode ocorrer através da regulação da apoptose, controle do ciclo celular, adesão e migração celular, indução a radio e quimiorresistência.

A ativação do NF- κ B parece ter um papel importante na carcinogênese do câncer de mama (Rayet e Gelinas, 1999), ovário (Bours et al., 1994), colon (Dejardin et al., 1999), tireóide (Visconti et al., 1994) e próstata (Herrmann et al., 1997).

Em relação ao colo de útero pouco foi estudado. Li et al. (1998) sugeriram em seu estudo que a ativação do NF- κ B pode estar relacionado com a progressão tumoral em ceratinócitos imortalizados pelo HPV. Kim et al. (2009) mostraram a expressão de COX-2 através da ativação da via do NF- κ B pela oncoproteína HPV-E5. Nees et al. (2001), também encontraram relação entre HPV e NF- κ B. Sugerem uma ligação entre as oncoproteínas E6 e E7 e a expressão de genes regulados pelo NF- κ B.

1.4 RELAÇÃO ENTRE HER-2 E FATOR NUCLEAR- κ B (NF- κ B)

O aumento da atividade do NF- κ B em alguns cânceres foi relacionado com resistência tumoral a quimioterapia e radioterapia (Orlowisk et al., 2002). Brach et al. (1991) demonstrou inicialmente que a radiação ativa a ligação de NF- κ B ao DNA. O bloqueio da ativação do NF- κ B aumenta a resposta à apoptose e diminui o crescimento e sobrevivência celular em várias linhagens de células tumorais (Tang et al., 2001; Chen et al., 2002; Herscher et al., 1999). Entretanto, outros experimentos não demonstraram o aumento da radiosensibilidade pelo inibição de NF- κ B (Pajonk et al., 1999). A radiorresistência adaptativa relacionada ao NF- κ B pode ser evidenciada em células epidérmicas de ratos, em queratinócitos humanos e a inibição do NF- κ B pode bloquear a radiorresistência adaptativa (Fan et al., 2007). No caso do câncer de mama, células tratadas com radiação γ mostraram o aumento da sobrevivência do clone relacionado à ativação do NF- κ B (Li et al., 2001; Guo et al., 2004). O bloqueio do

NF- κ B levou a uma diminuição da radiorresistência adaptativa. Esses resultados são as primeiras evidências que a ativação do NF- κ B estão relacionados e podem ser necessários para sinalização de radiorresistência adaptativa após a exposição à radioterapia. Assumindo que o NF- κ B é capaz de regular mais de 150 genes efetores, esses resultados sugerem que o NF- κ B tem um importante papel no processo de radiorresistência tumoral adaptativa (Ahmed e Li, 2008).

No caso do câncer de mama, a hiperexpressão de HER-2 está relacionada com pior prognóstico e com o aumento do risco de recidiva local em pacientes submetidas a tratamento cirúrgico conservador seguido de radioterapia (Haffty et al., 1996). Esse dado sugere que a radiorresistência pode estar relacionada e mediada pela via do HER-2. O HER-2 tem um papel crítico no controle de diversas funções celulares básicas como diferenciação, proliferação, migração e sobrevivência celular através de várias vias de tradução de sinal. A amplificação e hiperexpressão do HER-2 leva a uma quebra do controle do ciclo celular normal e a formação de clones celulares mais agressivos do câncer de mama (Yu e Hung, 2000; Yarden e Sliwkowski, 2001).

Está bem documentado que a hiperexpressão de HER-2 leva ao aumento da proliferação celular e sobrevivência (Kurokawa e Arteaga, 2001) e pode causar a ativação do NF- κ B (Galang et al., 1996). A via do PI3-kinase/Akt está envolvida na ativação de NF- κ B mediada por HER-2 (Pianetti et al., 2001) (Figura 3). Tanto as vias IKK-dependente quanto IKK-independente contribuem para a desregulação do NF- κ B no câncer de mama. A via IKK-independente envolve a degradação de I κ B- α mediada pela calpaina (Pianetti et al., 2001). Essa via também necessita PI3K e sua cinase supressora Akt, que é objeto de inibição pela fosfatase inibidora PTEN. Em

outro estudo, a ativação de NF- κ B mediada por Akt bloqueou a apoptose em células que expressavam HER-2 (Yang et al., 2000). Portanto, é possível que a via PI3K/Akt mediada pela hiperexpressão de HER-2 esteja envolvida na ativação do NF- κ B que por sua vez regula genes efetores necessários para resistência a regimes de tratamento (Ahmed e Li, 2008). Também foi observado que o NF- κ B pode ativar a expressão de HER-2, sendo que HER-2 e NF- κ B podem atuar mutuamente para um padrão de sobrevivência celular (Ahmed et al, 2006).

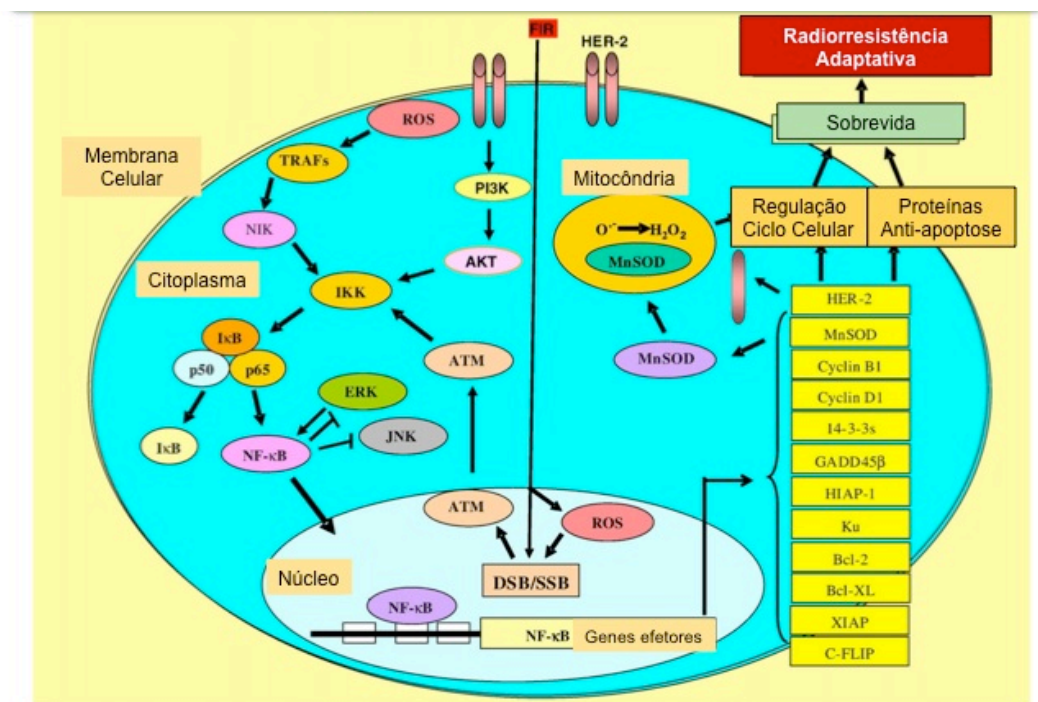


Figura 3 - Representação esquemática da rede de sinalização do NF- κ B e sua relação com a indução de radiorresistência. Adaptado de Ahmed e Li, 2008.

Recentemente, Cao et al. (2009) demonstraram no câncer de mama que o NF- κ B é necessário para a ativação do HER-2 induzida por irradiação. HER-2 foi ativada tanto pelo NF- κ B basal quanto pela atividade induzida por irradiação em linhagens de células resistentes a radioterapia, indicando que a hiperexpressão de HER-2 mediada por NF- κ B está envolvida na repopulação tumoral relacionada à radioterapia. Foi ainda descrito que a inibição do HER-2 torna as células tumorais radorresistentes novamente sensíveis à radioterapia. Como o HER-2 ativa o NF- κ B, os dados corroboram a hipótese de uma via cíclica HER-2 - NF- κ B - HER-2 de adaptação e radorresistência.

Pouco foi descrito na literatura no que se refere à expressão de NF- κ B-p65, NF- κ B-p50, I κ B-kinase- α (IKK α) e HER-2 no câncer de colo uterino e seu papel em relação à radorresistência. Os principais estudos são experimentais e com cultura de ceratinócitos “in vitro” (Ahmed e Li, 2008).

Uma boa metodologia para avaliação dos marcadores preditores de resistência à radioterapia seria através do acesso a uma amostra da neoplasia antes e após à radioterapia. Com esse intuito foi utilizada para o presente estudo uma coorte histórica de pacientes portadoras de câncer do colo uterino submetidas à radioterapia seguida de cirurgia.

Devido ao papel crucial da radioterapia no tratamento do câncer do colo uterino, a descoberta de marcadores preditores de radiosensibilidade torna-se cada vez mais importante. A melhor compreensão do papel dessa importante via de sinalização do NF- κ B e HER-2 no câncer do colo uterino poderá em algum momento influenciar o planejamento terapêutico e ainda auxiliar no desenvolvimento de novas terapias tipo molécula alvo.

2 OBJETIVOS

2.1 Avaliar os padrões de expressão imunoistoquímica de HER-2, NF- κ B-p65, NF- κ B-p50 e IKK α em amostras de tumores de pacientes portadoras de câncer do colo uterino obtidas previamente à radioterapia seguido de histerectomia.

2.2 Avaliar o “status” do gene HER2 através de FISH (*fluorescent in situ hybridization*) em amostras de tumores de pacientes portadoras de câncer do colo uterino obtidas previamente à radioterapia seguido de histerectomia.

2.3 Avaliar os padrões de expressão imunoistoquímica de HER-2, NF- κ B-p65, NF- κ B-p50 e IKK α em pacientes portadoras de câncer do colo uterino que apresentaram doença residual após serem submetidas à radioterapia seguido de histerectomia.

2.4 Correlacionar os padrões de expressão imunoistoquímica de HER-2, NF- κ B-p65, NF- κ B-p50 e IKK α com as variáveis anatomopatológicas e com a resposta à radioterapia.

2.5 Avaliar o papel da expressão imunoistoquímica de NF- κ B-p65, NF- κ B-p50, IKK α e HER-2 como fator prognóstico para sobrevida livre de doença, sobrevida global e sobrevida câncer específica.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO

Estudo retrospectivo longitudinal

3.2 APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antônio Prudente – Hospital A.C. Camargo sob o nº 1405/10 e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Não foi necessário o termo de consentimento livre e esclarecido devido ao caráter retrospectivo do levantamento de dados.

3.3 MÉTODOS

3.3.1 COLETA DE DADOS

Os dados clínicos e alguns dados anatomopatológicos foram obtidos a partir dos prontuários médicos arquivados no Serviço de Arquivo Médico e Estatística (SAME) do Hospital do Câncer A.C. Camargo.

Espécimes de biópsia realizadas antes do tratamento e blocos de parafina de histerectomias após tratamento radioterápico foram resgatados do arquivo do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo. Os blocos separados foram submetidos a novos cortes e o primeiro corte obtido de cada

bloco foi corado pela técnica tradicional de hematoxilina-eosina (HE) e as lâminas foram revistas por um patologista do Hospital AC Camargo, confirmando o diagnóstico histopatológico da neoplasia.

3.3.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

As pacientes foram submetidas à radioterapia externa (RE) e braquiterapia de alta taxa de dose (BATD) com caráter neoadjuvante à Histerectomia Radical (HR) Classe II (Piver et al., 1974).

A RE foi realizada com acelerador linear 4 ou 6 meV. As pacientes foram tratadas em posição prona com técnica 2D em 4 campos em pelve. Todos os campos eram tratados diariamente com fracionamento de 1,8Gy ao dia, 5 dias por semana.

Após a segunda semana de RE, todas as pacientes foram submetidas a exame físico com o objetivo de avaliar as condições anatômicas e geométricas para início da BATD concomitante à RE. A BATD foi administrada utilizando-se aplicadores de “Fletcher” e fonte de Iridium-192 com atividade nominal de 10Ci. A dose proposta para o ponto A foi de 6 Gy em 2 inserções durante 1 semana.

A HR Classe II consistiu na remoção do tecido paracervical medialmente ao ureter, sem desvascularizar o seu terço distal e mantendo-o preso ao ligamento pubocervical. A artéria uterina foi ligada medialmente ao ureter e os ligamentos útero-sacrais ligados no ponto médio entre o útero e sua inserção na parede pélvica. A realização de linfadenectomia pélvica foi opcional.

Todas as pacientes incluídas no estudo também obedeceram aos seguintes critérios de elegibilidade:

- a) confirmação de carcinoma epidermóide do colo uterino;
- b) disponibilidade de material conservado em parafina para estudo imunohistoquímico e FISH.

3.3.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram consideradas ineligiáveis para o estudo as pacientes que:

- a) não receberam radioterapia pré-operatória;
- b) receberam quimioterapia pré-operatória;
- c) desenvolveram segunda neoplasia primária cinco anos antes ou até cinco anos após o diagnóstico do câncer de colo uterino, excetuando-se neoplasias de pele não melanoma;

3.3.4 VARIÁVEIS COLETADAS

- a) Variáveis demográficas e clínicas, compreendendo os itens apresentados a seguir:
 - Idade arbitrariamente agrupada em duas categorias (igual ou maior que 45 anos e menor que 45 anos);
 - Modalidade e dose de radioterapia empregada;
 - Intervalo de tempo entre o término da radioterapia e a histerectomia;
 - Modalidade de tratamento cirúrgico realizado.

b) Variáveis anatomopatológicas, compreendendo os itens abaixo:

- Estadiamento FIGO inicial. A classificação foi feita de acordo com a última edição da FIGO (Pecorelli et al., 2009). O quadro 1 descreve a classificação;
- Resposta à radioterapia, categorizada como completa ou incompleta/parcial na dependência da presença de neoplasia residual na peça da histerectomia;
- Grau de diferenciação: utilizou-se a classificação padronizada no Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer A.C. Camargo, que segue a classificação preconizada por Broders (1925), adaptada para três categorias: grau 1: bem diferenciado; grau 2: moderadamente diferenciado; grau 3: pouco diferenciado.
- Determinação da expressão de NF- κ B-p65, NF- κ B-p50, IKK α e HER-2 através de métodos imunistoquímicos em amostra de neoplasia com biópsia antes do início do tratamento radioterápico, e nas peças cirúrgicas nos casos de resposta parcial à radioterapia;
- Determinação do “status” do gene HER2 através de FISH (*fluorescent in situ hybridization*).

3.3.5 DETERMINAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA EXPRESSÃO DE NF- κ B-p65, NF- κ B-p50, IKK α e HER-2

Os blocos de parafina contendo fragmentos de tumor foram encaminhados para realização de reação imunistoquímica no Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer A.C. Camargo.

A imunistoquímica foi realizada para NF- κ B-p65, NF- κ B-p50, IKK α e HER-2 em cortes totais convencionais.

As lâminas foram desparafinadas com 30 minutos de incubação a 60°C lavados em xilol e reidratados em álcool etílico e lavados em água corrente. As lâminas foram processadas utilizando método da avidina/biotina imunoperoxidase. Atividade de peroxidase endógena foi bloqueada pela imersão das lâminas em metanol com água oxigenada 3% por 40 minutos. A recuperação antigênica de lâminas tratadas em tampão citrato (pH 6.0) foi realizada por meio do calor úmido em panela de pressão a 98°C por 15 minutos. As lâminas foram bloqueadas por avidina/biotina (*DaKo Biotin Blocking System*) e para proteína (*Dako Protein Block Serum-Free*) por 20 minutos cada.

A reação imunistoquímica foi realizada à temperatura ambiente com: (1) Anticorpo policlonal NF- κ B-p65 - “Rabbit polyclonal anti-human NF- κ B-p65” (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA); (2) Anticorpo monoclonal IKK α - “Mouse monoclonal anti-human IKK α ” (Santa Cruz Biotechnology); (3) Anticorpo policlonal NF- κ B-p50 “Rabbit polyclonal anti-human NF- κ B-p50” (NLS) (Santa Cruz Biotechnology); e (4) HER-2 (Herceptest-Dako).

Os tecidos foram expostos à IgG biotilado de camundongo em temperatura ambiente por 20 minutos e então incubados com streptavidina-biotina peroxidase LSAB kit (Dako) por 30 minutos. Finalmente as lâminas foram coradas com 3,3'-diaminobenzidina por 3 a 5 minutos, e contra coradas com hematoxilina Harris, e montadas com Permount (Fisher Scientific). Controle negativo foi processado similarmente pela omissão do anticorpo primário e espécimes de biópsia de mama foram usadas como controle positivo.

A leitura das lâminas foram feitas em microscópio ótico comum por um mesmo patologista. Este não teve acesso aos dados clínicos e os resultados foram classificados em relação à intensidade da reação positiva.

A expressão citoplasmática de cada uma das amostras imunoistoquímicas de tumor foi interpretada através de padronização semi-quantitativa de “0 ou negativo” a “3+” segundo a técnica padronizada por Kountourakis et al. (2006). Foi graduado como “negativo” quando não houve expressão imunoistoquímica ou expressão fraca em menos de 10% das células neoplásicas; “1+” quando houve fraca intensidade de expressão imunoistoquímica em mais de 10% das células neoplásicas; “2+” quando houve moderada intensidade de expressão imunoistoquímica em mais de 10% das células neoplásicas e “3+” quando houve forte intensidade de expressão imunoistoquímica em mais de 10% das células neoplásicas. Foram categorizados como positivos os casos com resultado 3+. As figuras de 4 a 7 mostram exemplos da expressão citoplasmática de NF-kB-p50 e NF-kB-p65. A figura 8 mostra exemplo de ausência de expressão de IKK α .

A expressão em membrana celular de cada uma das amostras imunoistoquímicas de tumor foi interpretada através de padronização semi-quantitativa segundo a técnica padronizada por Wolff et al. (2007). Foi graduado como “negativo” quando não houve expressão imunoistoquímica ou em menos de 30% das células neoplásicas; “1+” quando houve fraca intensidade de expressão imunoistoquímica e parcial de membrana em mais de 30% das células neoplásicas; “2+” quando houve fraca ou moderada intensidade de expressão imunoistoquímica em toda membrana em mais de 30% das células neoplásicas e “3+” quando houve forte intensidade de expressão imunoistoquímica em toda membrana celular em mais

de 30% das células neoplásicas. Foram categorizados como positivos os casos com resultado 2+ e 3+. As figuras de 9 a 11 mostram exemplos da expressão em membrana de HER-2.

A expressão em núcleo de cada uma das amostras imunoistoquímicas de tumor foi interpretada através de padronização semi-quantitativa segundo a técnica padronizada por Seo et al. (2009). Foi graduado como “negativo” quando não houve expressão imunoistoquímica ou expressão fraca em menos de 30% das células neoplásicas; “1+” quando houve fraca intensidade de expressão imunoistoquímica em mais de 30% das células neoplásicas; “2+” quando houve moderada intensidade de expressão imunoistoquímica em mais de 30% das células neoplásicas e “3+” quando houve forte intensidade de expressão imunoistoquímica em mais ou menos de 30% das células neoplásicas. Foram categorizados como positivos os casos com resultado 2+ e 3+. As figuras de 4 a 7 mostram exemplos da expressão nuclear de NF-kB-p50 e p65.

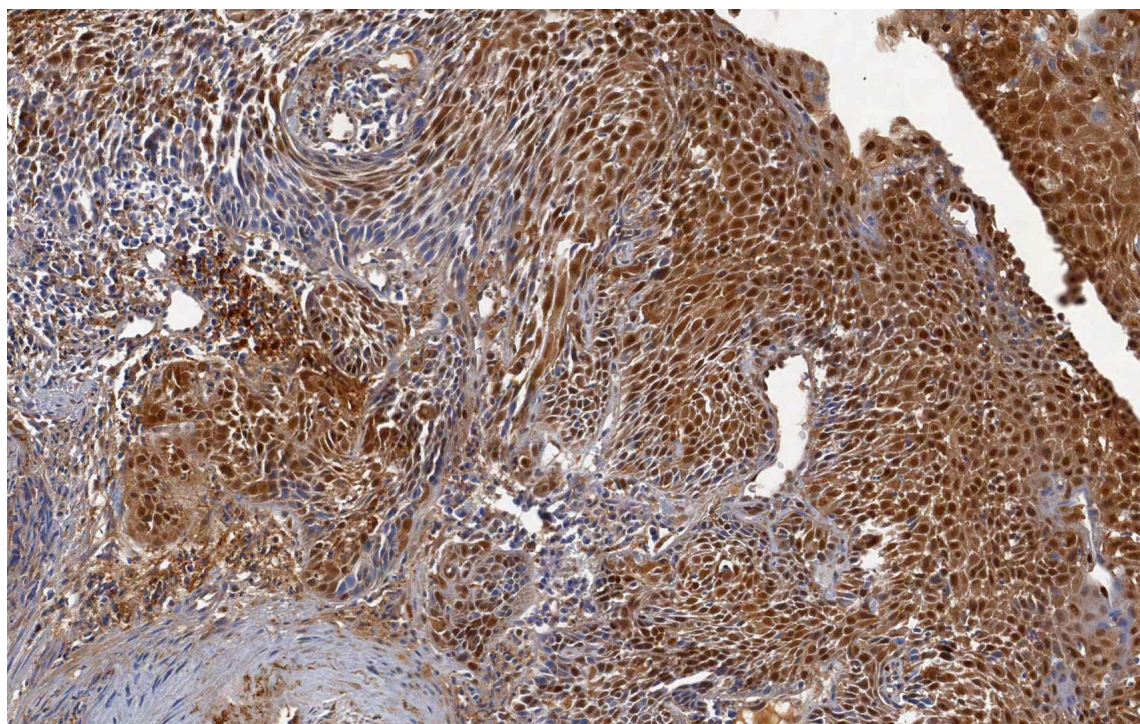


Figura 4 - Fotomicrografia de carcinoma epidermóide do colo uterino mostrando forte intensidade de expressão imunohistoquímica (“3+”) em citoplasma e núcleo para NF- κ B p50 (40x).

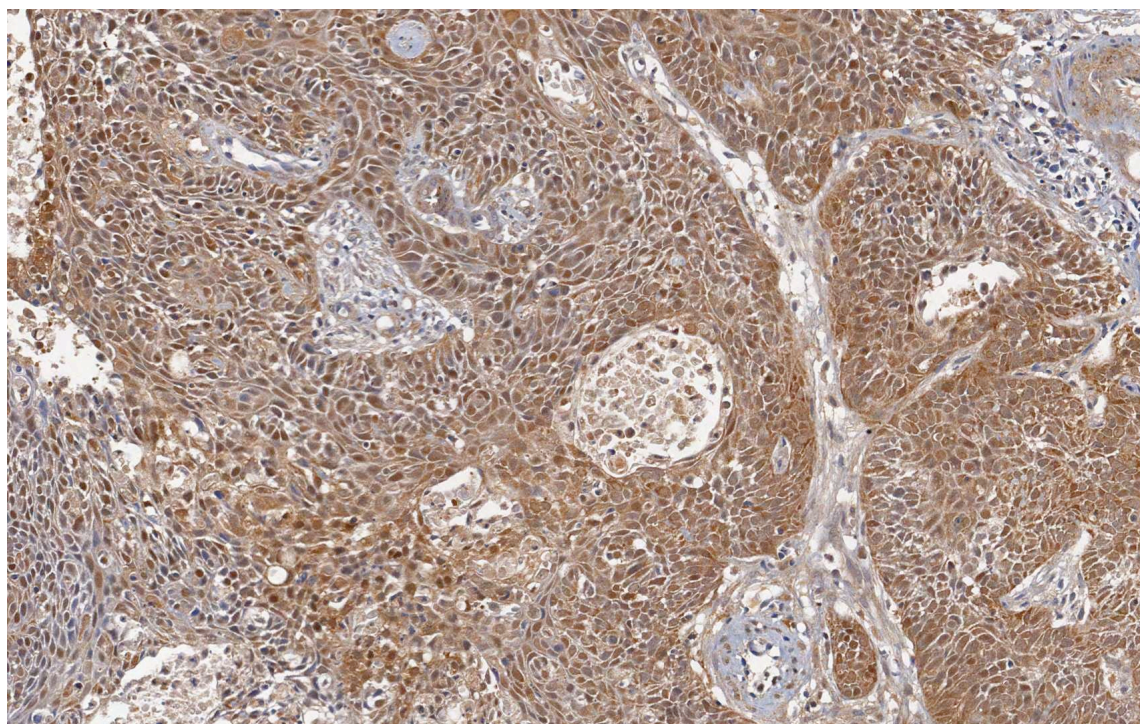


Figura 5 - Fotomicrografia de carcinoma epidermóide do colo uterino mostrando moderada intensidade de expressão imunoistoquímica (“2+”) em citoplasma e núcleo para NF- κ B p50 (40x).

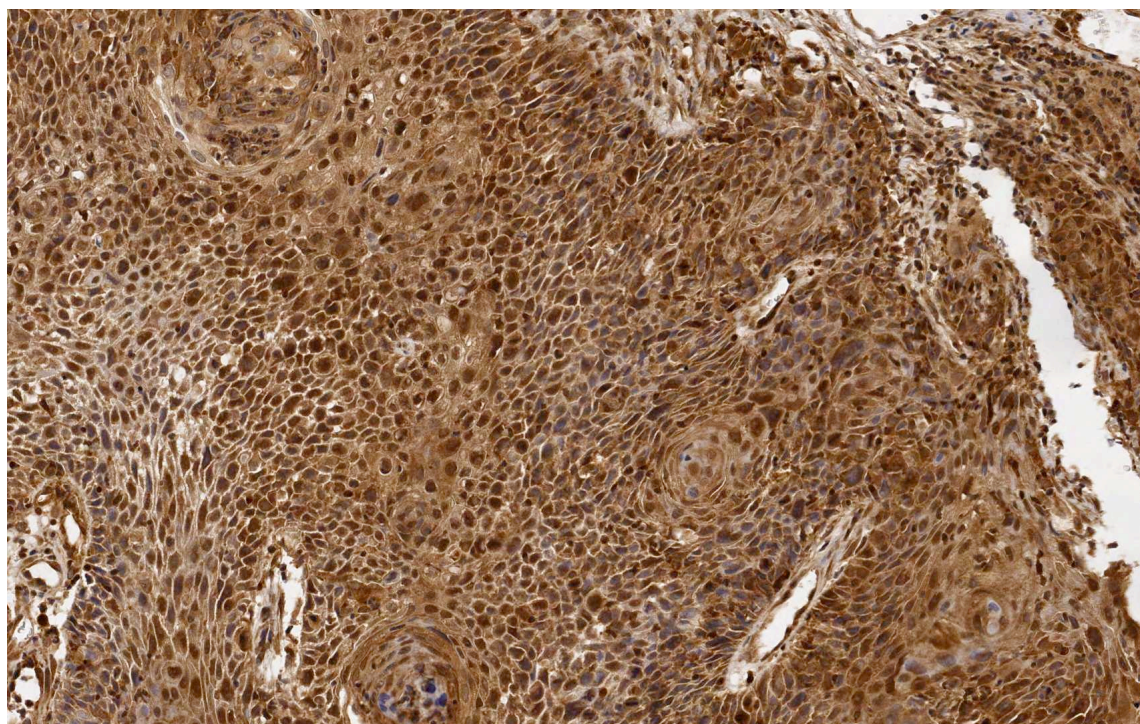


Figura 6 - Fotomicrografia de carcinoma epidermóide do colo uterino mostrando forte intensidade de expressão imunohistoquímica (“3+”) em citoplasma e núcleo para NF- κ B p65 (40x).

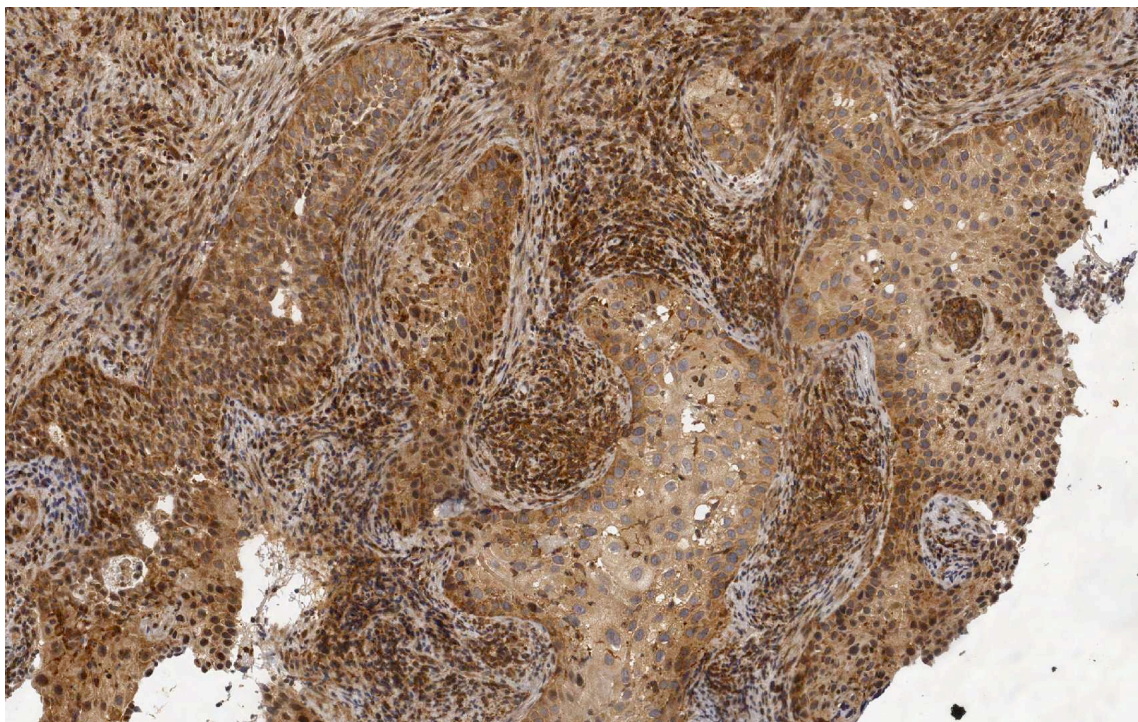


Figura 7 - Fotomicrografia de carcinoma epidermóide do colo uterino mostrando moderada intensidade de expressão imunoistoquímica (“2+”) em citoplasma e núcleo para NF- κ B p65 (20x).

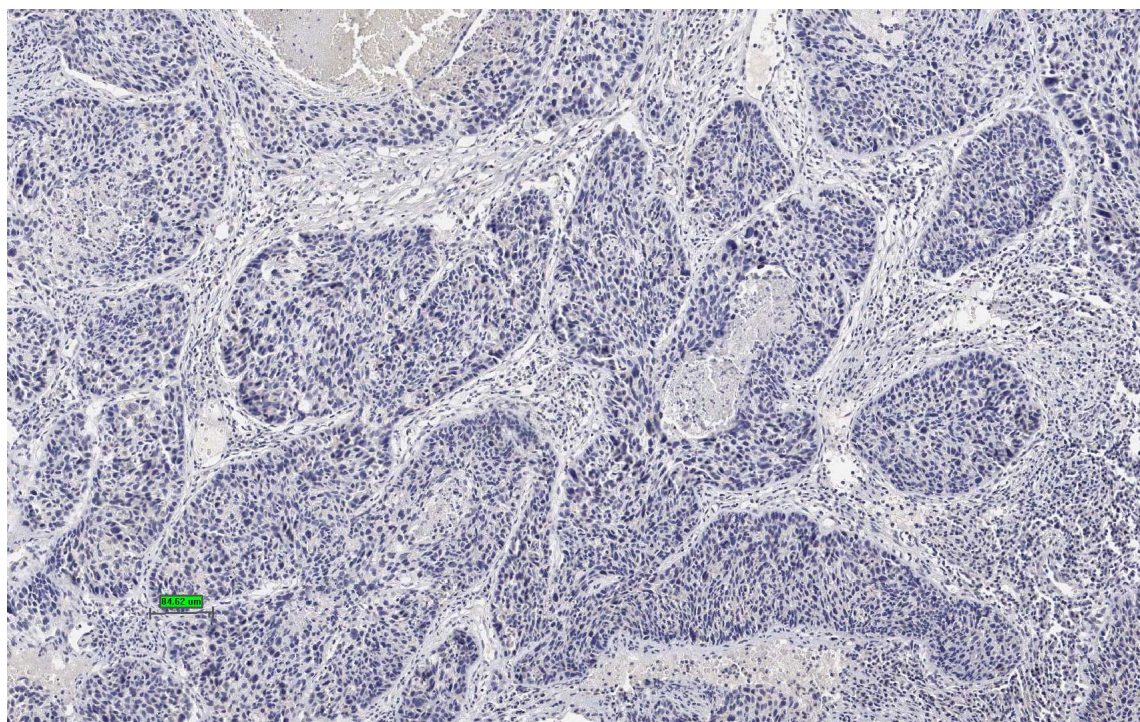


Figura 8 - Fotomicrografia de carcinoma epidermóide do colo uterino mostrando ausência de expressão imunoistoquímica de IKK α (20x).

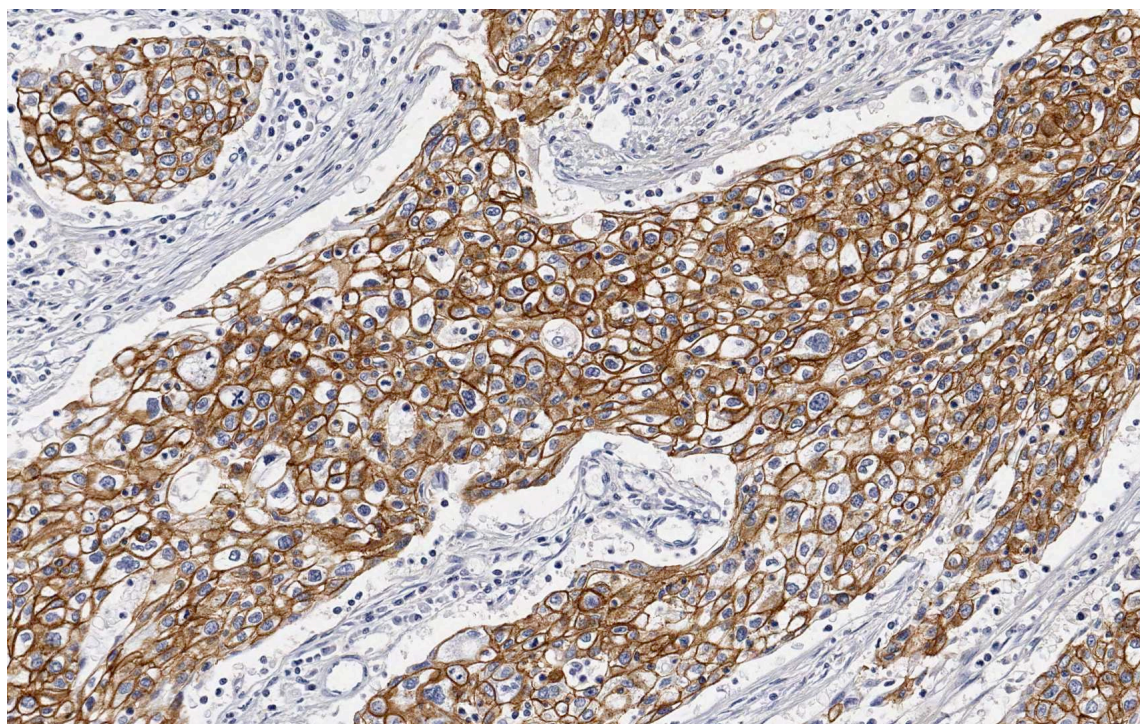


Figura 9 - Fotomicrografia de carcinoma epidermóide do colo uterino mostrando forte intensidade de expressão imunoistoquímica (“3+”) em membrana para HER-2 (40x).

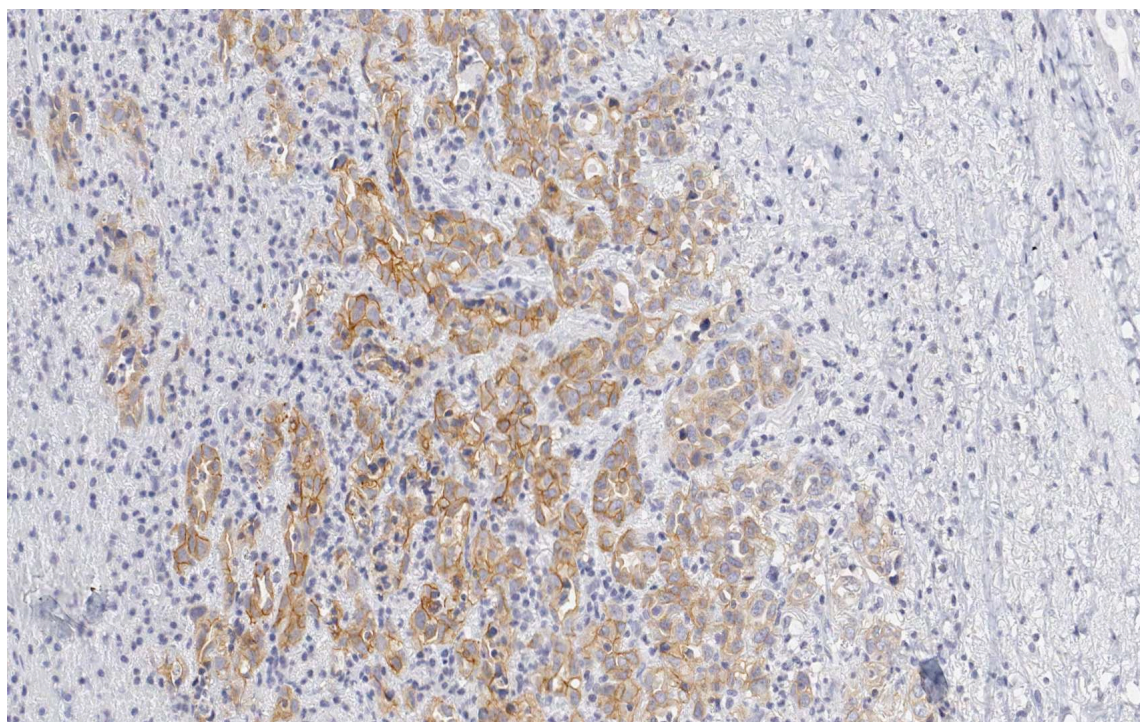


Figura 10 - Fotomicrografia de carcinoma epidermóide do colo uterino mostrando moderada intensidade de expressão imunoistoquímica (“2+”) em membrana para HER-2 (20x).

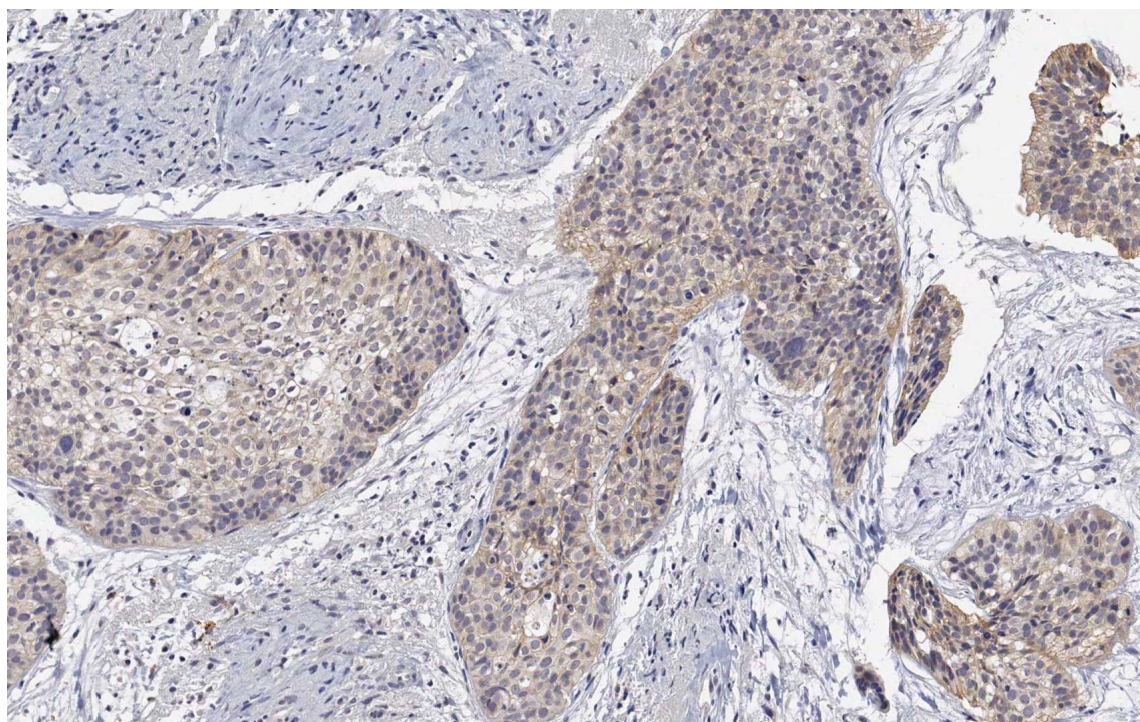


Figura 11 - Fotomicrografia de carcinoma epidermóide do colo uterino mostrando fraca intensidade de expressão imunohistoquímica (“1+”) em membrana para HER-2 (20x).

3.3.6 PROTOCOLO DE HIBRIDAÇÃO *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH)

Foi utilizada a sonda HER2/*neu* Dako® cod. K5331 para o ensaios de FISH. Após a desparafinização em duas lavagens com xilol 100% de 5 minutos cada, a lâmina foi reidratada por meio de duas lavagens com etanol 100% de 5 minutos cada. Em seguida, as lâminas foram tratadas com 0,2mmol/L de HCl por 20 minutos, água destilada por 2 minutos e 2X tampão citrato (SSC; NaCl 0,3mmol/L e citrato de sódio 0,03mmol/L) por 3 minutos. As lâminas foram, então, incubadas nesse mesmo tampão por 30 minutos a 82°C em banho-maria; as lâminas foram, então, incubadas por 36 minutos a 37°C em tampão de protease (0,05mmol/L Tris-HCl pH 7,8, 0,01mmol/L ácido etileno diamino tetraacético, e 0,01mmol/L NaCl) para a digestão protéica. Finalmente, as lâminas foram levadas a formalina 10% em tampão salina fosfato por 10 minutos. A desidratação foi realizada com três mudanças consecutivas de etanol 70%, 85% e 100%. Tanto a sonda para o FISH quanto o DNA alvo foram denaturados juntamente por 5 minutos a 75°C e incubados *overnight* a 37°C. Em seguida a lâmina foi lavada em tampão pós-hibridação (SSC e NP40) por 3 minutos a 74°C e montada com contraste DAPI (SSC 2X/0,03 ug/mL 4',6-diaminido-2-fenilindoleidihidrocloro) para a identificação dos núcleos. As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência.

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

trissomia quando houve 3 sinais para a sonda centromérica e 2 sinais para sonda alvo; amplificado quando houve mais de 4 sinais da sonda alvo (Figura 12) e 2 sinais de sonda centromérica e polissomia quando houve mais de 4 sinais tanto para as sondas centroméricas quanto para as sondas alvos.

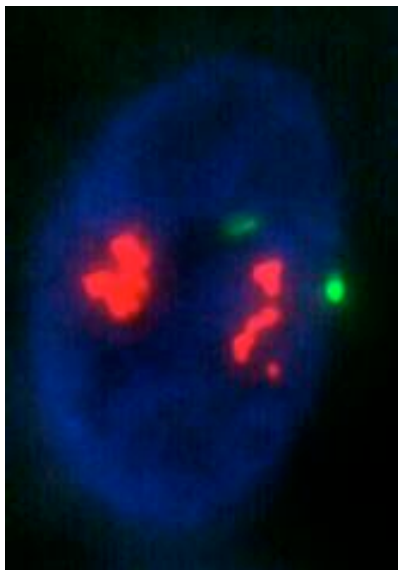


Figura 12 - Amplificação gênica de HER-2 observada por hibridação *in situ* fluorescente (FISH). Os sinais vermelhos correspondem ao gene HER-2 e os sinais verdes ao cromossomo 17.

3.3.7 SOBREVIDA GLOBAL, SOBREVIDA CÂNCER ESPECÍFICA E SOBREVIDA LIVRE DE DOENÇA

A sobrevida global foi definida pelo período de tempo, em meses, decorrido entre a data da histerectomia radical e data do óbito ou do último seguimento.

A sobrevida câncer específica foi definida pelo período de tempo, em meses, decorrido entre a data da histerectomia radical e data do óbito por câncer ou do último seguimento.

A sobrevida livre de doença foi determinada pelo período de tempo, em meses, decorrido entre a data da histerectomia radical e data do diagnóstico da recidiva ou do último seguimento.

3.3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados coletados dos prontuários foram transcritos para ficha padronizada e digitados em computador para gerenciamento do banco de dados e análise estatística. A confecção do banco de dados e as análises foram feitas no programa estatístico “Statistical Package for Social Sciences” versão 16.0 for Mac (SPSS, Inc., Chicago, IL).

As variáveis de interesse foram as expressões imunoistoquímicas de NF- κ B p65, NF- κ B-p50, IKK α e HER-2. As variáveis de controle foram: idade, realização de braquiterapia pós operatória, presença de doença residual após tratamento radioterápico, intervalo entre término da radioterapia e a cirurgia, comprometimento linfonodal e grau de diferenciação histológica.

Inicialmente foram calculadas frequências simples de todas as variáveis.

As associações entre as variáveis categóricas foram analisadas pelo teste por qui-quadrado bi-caudal e pelo teste de Fisher quando pelo menos uma frequência esperada foi menor do que 5.

As curvas de sobrevida foram estimadas pelo método de Kaplan e Meier, e a comparação entre as curvas foi realizada pelo teste de log rank (Kaplan e Meier, 1958).

O tempo de seguimento foi calculado a partir da data da cirurgia até a data da última informação objetiva na atualização dos dados. As taxas de sobrevida livre de doença foram analisadas com base na data da primeira recidiva local ou à distância. As taxas de sobrevida global foram calculadas de acordo com a data da última informação objetiva na atualização dos dados.

Para todos os testes realizados, considerou-se um erro alfa de até 5% ($p < 0,05$).

3.4 CASUÍSTICA

3.4.1 COMPOSIÇÃO DA AMOSTRA

Dentre as pacientes tratadas no Hospital do Câncer A.C. Camargo por câncer do colo uterino no período de janeiro de 1992 a junho de 2001, 67 foram submetidas à radioterapia seguido de histerectomia. Em 34 casos foi possível a obtenção de amostra da biópsia prévia à radioterapia e 32 foram os casos elegíveis para o estudo por tratar-se de carcinomas epidermóides. Das 16 pacientes com doença residual após histerectomia, 12 tiveram blocos de parafina disponíveis para análise.

3.4.2 DADOS DEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS

Para as 32 pacientes estudadas, a idade variou entre 22 e 67 anos, com mediana de 45 anos. Quanto ao estágio clínico (FIGO), 1 (3,1%) paciente apresentava-se no estágio IB2 e 31 (96,9%) pacientes no estágio IIB.

A dose mediana da RE foi 45Gy (29-45Gy) e média de 44,2Gy. Nenhuma paciente recebeu complemento em paramétrio.

A dose mediana e média de BATD no ponto A foi 12Gy (10-15Gy). Cinco (15,6%) pacientes foram submetidas a BATD pós-operatória em fundo vaginal com dose total de 12Gy (6 Gy em 2 inserções), onde 4 apresentavam doença residual na peça de HR.

O tempo mediano de duração do tratamento radioterápico neoadjuvante foi de 41 dias (27-108) com dose total mediana de 57Gy (41-60). O intervalo mediano entre o término do tratamento radioterápico e a HR foi de 81,5 dias (45-154).

3.4.3 DADOS DE ANATOMIA PATOLÓGICA

Quanto ao grau histológico, 26 (81,2%) foram considerados moderadamente diferenciados (G2) e 6 (18,8%) pouco diferenciados (G3).

Vinte e quatro (75%) pacientes foram submetidas à linfadenectomia pélvica com mediana de 8,5 (2-28) linfonodos ressecados. Destas, 4 (16,7%) apresentaram linfonodos comprometidos.

No que se refere à peça de HR, 16 (50%) pacientes apresentaram doença residual (DR) e 16 (50%) tiveram resposta completa à radioterapia. Quando os linfonodos ressecados foram avaliados, uma paciente apresentou resposta completa em colo, porém DR em linfonodo pélvico. Portanto, 15 (46,9%) pacientes tiveram

resposta completa em pelve, quando considerados a resposta em colo uterino e linfonodos.

3.4.4 DADOS DO SEGUIMENTO

O tempo mediano do seguimento foi de 73,5 meses, variando de 8 a 151 meses.

Ao final da atualização do seguimento, das 32 pacientes, 8 (25%) haviam evoluído com recidiva tumoral (4 recidivas loco-regionais e 4 metástases à distância), dentre as quais todas morreram por câncer. Três pacientes (9,4%) morreram por outras causas e 21 (65,6%) estavam vivas e sem sinais de recidiva tumoral.

4 RESULTADOS

4.1 EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE NF- κ B, IKK α E HER-2 EM MATERIAL DE BIÓPSIA PRÉVIA À RADIOTERAPIA

Em relação à expressão de NF- κ B-p65, 29 (90,6%) pacientes apresentaram tumores com expressão positiva em citoplasma e 19 (59,4%) em núcleo. No caso da expressão de NF- κ B-p50, 31 (96,9%) apresentaram tumores com expressão positiva em citoplasma e 19 (59,4%) em núcleo. Não foi encontrada expressão imunoistoquímica de IKK α tanto em citoplasma quanto em núcleo nos casos estudados.

Quanto à expressão de HER-2, 7 (21,9%) pacientes apresentaram expressão positiva e 25 (78,1%) negativa. A tabela 1 resume as frequências das expressões imunoistoquímicas entre as 32 pacientes.

Tabela 1 - Frequências das expressões imunoistoquímicas de NF- κ B-p65, NF- κ B-p50, IKK α e HER-2 nos tumores das 32 pacientes submetidas à radioterapia seguido de histerectomia radical.

Variável	Categoria	n	(%)
NF- κ B-p65 citoplasma	Negativa	3	(9,4)
	Positiva	29	(90,6)
NF- κ B-p65 núcleo	Negativa	13	(40,6)
	Positiva	19	(59,4)
NF- κ B-p50 citoplasma	Negativa	1	(3,1)
	Positiva	31	(96,9)
NF- κ B-p50 núcleo	Negativa	13	(40,6)
	Positiva	19	(59,4)
IKK α	Negativa	32	(100)
	Positiva	0	(0)
HER-2	0	17	(53,1)
	1+	8	(25)
	2+	6	(18,8)
	3+	1	(3,1)
HER-2	Negativa	25	(78,1)
	Positiva	7	(21,9)

4.2 ANÁLISE DA HIBRIDAÇÃO *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH)

As 32 pacientes foram avaliadas, sendo que 6 pacientes apresentaram tumores com expressão imunistoquímica 2+ e 1 caso 3+. Somente foi encontrada amplificação do HER-2 no caso com expressão 3+ (3,1% dos casos) (Figura 12).

4.3 EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE NF- κ B, IKK α E HER-2 NOS TUMORES DOS PACIENTES COM DOENÇA RESIDUAL NA PEÇA DA HISTERECTOMIA RADICAL

Com relação à expressão de NF- κ B-p65, 6/12 (50%) pacientes apresentaram tumores com expressão positiva em citoplasma e não houve expressão em núcleo. No caso da expressão NF- κ B-p50, 6/12 (50%) apresentaram tumores com expressão positiva em citoplasma e 9/12 (75%) em núcleo. Nenhum caso apresentou expressão imunistoquímica de IKK α tanto em citoplasma quanto em núcleo.

Não foi encontrada expressão imunistoquímica de HER-2.

A tabela 2 resume as frequências das expressões imunistoquímicas entre as 12 pacientes.

A tabela 3 resume a mudança do padrão de expressão imunistoquímica de NF- κ B entre a biópsia pré-operatória e da doença residual nos 12 pacientes.

4.4 TESTES DE ASSOCIAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS

Não foi realizada associação entre as variáveis clinicopatológicas e expressão de NF- κ B-p50 e NF- κ B-p65 no citoplasma devido a alta taxa de positividade (96,9% e 90,6%) e do IKK α devido à ausência de expressão. Não houve correlação entre as variáveis clinicopatológicas estudadas e a expressão prévia à radioterapia de NF- κ B-p50 no núcleo (Tabela 4) e NF- κ B-p65 no núcleo (Tabela 5).

Em relação à expressão de HER-2, não houve diferença significativa em relação à resposta à radioterapia neoadjuvante, apesar de 85,7% dos pacientes HER-2 positivo apresentarem doença residual em colo frente a 40% dos pacientes com HER-2 negativo ($p=0,08$). Também não houve diferença significativa entre as demais variáveis estudadas. A tabela 6 mostra a distribuição de HER-2 em relação às variáveis estudadas.

Tabela 2 - Frequências das expressões imunoistoquímicas de NF- κ B-p65, NF- κ B-p50, IKK α e HER-2 nos tumores das 12 pacientes com doença residual após radioterapia.

Variável	Categoria	n	(%)
NF- κ B-p65 citoplasma	Negativa	6	(50)
	Positiva	6	(50)
NF- κ B-p65 núcleo	Negativa	12	(100)
	Positiva	0	(0)
NF- κ B-p50 citoplasma	Negativa	6	(50)
	Positiva	6	(50)
NF- κ B-p50 núcleo	Negativa	3	(25)
	Positiva	9	(75)
IKK α	Negativa	12	(100)
	Positiva	0	(0)
HER-2	Negativa	12	(100)
	Positiva	0	(0)

Tabela 3 - Padrão de expressão imunohistoquímica de NF- κ B entre o material da biópsia pré-operatória e a doença residual das 12 pacientes com resposta incompleta à radioterapia.

Variável	Amostra da	Amostra da	n (%)
	Biópsia Pré-Operatória	Doença Residual	
	Expressão	Expressão	
NF- κ B-p65 em núcleo	Positiva	Negativa	12 (100)
NF- κ B-p50 em núcleo	Positiva	Negativa	3 (25)
	Negativa	Positiva	3 (25)
	Positiva	Positiva	6 (50)
NF- κ B-p65 em citoplasma	Positiva	Negativa	6 (50)
	Negativa	Positiva	1 (8,3)
	Positiva	Positiva	5 (41,7)
NF- κ B-p50 em citoplasma	Positiva	Negativa	6 (50)
	Positiva	Positiva	6 (50)

Tabela 4 - Correlação entre as variáveis clinicopatológicas e a expressão de NF- κ B p50 no núcleo das células neoplásicas das 32 pacientes submetidas à radioterapia seguida de histerectomia radical.

Variável	Categoria	Expressão de NF- κ B-p50 núcleo		p
		Negativa	Positiva	
Idade	<45 anos	8	9	0,43
	\geq 45 anos	5	10	
Linfonodo comprometido	Não	7	13	1,0
	Sim	1	3	
Doença residual em colo	Não	8	8	0,28
	Sim	5	11	
Doença residual em pelve	Não	8	7	0,16
	Sim	5	12	
Grau histológico	G2	9	17	0,19
	G3	4	2	

Tabela 5 - Correlação entre as variáveis clinicopatológicas e a expressão de NF- κ B-p65 no núcleo das células neoplásicas das 32 pacientes submetidas à radioterapia seguida de histerectomia radical.

Variável	Categoria	Expressão de NF- κ B-p65 núcleo		p
		Negativa	Positiva	
Idade	<45 anos	9	8	0,16
	\geq 45 anos	4	11	
Linfonodo comprometido	Não	7	13	1,0
	Sim	1	3	
Doença residual em colo	Não	5	11	0,28
	Sim	8	8	
Doença residual em pelve	Não	5	10	0,43
	Sim	8	9	
Grau histológico	G2	9	17	0,19
	G3	4	2	

Tabela 6 - Correlação entre as variáveis clinicopatológicas e a expressão de HER-2 na membrana das células neoplásicas das 32 pacientes submetidas à radioterapia seguida de histerectomia radical.

Variável	Categoria	Expressão de HER-2		p
		Negativa	Positiva	
Idade	<45 anos	12	5	0,4
	≥45 anos	13	2	
Linfonodo comprometido	Não	16	4	1,0
	Sim	3	1	
Doença residual em colo	Não	15	1	0,083
	Sim	10	6	
Doença residual em pelve	Não	14	1	0,088
	Sim	11	6	
Grau histológico	G2	21	5	0,59
	G3	4	2	

Idade abaixo de 45 anos ($p=0,28$), grau histológico ($p=0,65$), duração do tratamento radioterápico acima de 40 dias e intervalo de tempo entre o término da radioterapia e a HR maior que 80 dias ($p=0,72$) não tiveram correlação com a presença de doença residual após a radioterapia neoadjuvante.

Nas biópsias prévias à radioterapia, foi encontrada correlação entre a expressão de HER-2 e NF- κ B-p65 em núcleo, onde entre as pacientes com HER-2 positivo, 85,7% apresentaram NF- κ B-p65 negativo. Não houve correlação entre as expressões de HER-2 e NF- κ B-p50 em núcleo, e entre HER-2 e NF- κ B-p50 ou p65 no citoplasma (tabela 7).

Tabela 7 - Correlação entre as expressões de HER-2 e NF- κ B nas amostras de tumor das 32 pacientes submetidas à radioterapia seguida de histerectomia radical.

Variável	Categoria	Expressão de HER-2		p
		Negativa	Positiva	
NF- κ B-p65 em núcleo	Negativa	7	6	0,01
	Positiva	18	1	
NF- κ B-p50 em núcleo	Negativa	10	3	1,0
	Positiva	15	4	
NF- κ B-p65 em citoplasma	Negativa	2	1	0,53
	Positiva	23	6	
NF- κ B-p50 em citoplasma	Negativa	1	0	1,0
	Positiva	24	7	

4.5 SOBREVIDA LIVRE DE DOENÇA

A sobrevida livre de doença foi de 73,7% em 5 anos (gráfico 1).

À análise univariada, para amostra total das 32 pacientes, não foi observado impacto em sobrevida livre de doença para as variáveis: idade abaixo de 45 anos ($p=0,97$), grau histológico ($p=0,60$), realização de BATD adjuvante ($p=0,36$), presença de doença residual ($p=0,34$) e presença de comprometimento linfonodal ($p=0,096$).

As expressões imunistoquímicas das células neoplásicas em núcleo, previamente à radioterapia, de NF- κ B-p65 ($p=0,97$), NF- κ B-p50 ($p=0,53$) e em membrana de HER-2 ($p=0,80$) também não tiveram impacto no risco de recidiva.

4.6 SOBREVIDA CÂNCER ESPECÍFICA

A sobrevida câncer específica foi de 72,5% em 5 anos.

À análise univariada, das 32 pacientes estudadas, não foi observado impacto em sobrevida câncer específica para as variáveis: idade abaixo de 45 anos ($p=0,99$), grau histológico ($p=0,57$), realização de BATD adjuvante ($p=0,38$), presença de doença residual ($p=0,31$) e presença de comprometimento linfonodal ($p=0,11$).

As expressões imunistoquímicas das células neoplásicas em núcleo, previamente à radioterapia, de NF- κ B-p65 ($p=0,99$), NF- κ B-p50 ($p=0,52$) e em membrana de HER-2 ($p=0,84$) também não tiveram impacto no risco de óbito por câncer.

4.7 SOBREVIDA GLOBAL

A sobrevida global da amostra foi de 66,5% (gráfico 2).

À análise univariada, das 32 pacientes estudadas, não foi observado impacto em sobrevida global para as variáveis: idade abaixo de 45 anos ($p=0,72$), grau histológico ($p=0,32$), realização de BATD adjuvante ($p=0,23$), presença de doença residual ($p=0,20$) e presença de comprometimento linfonodal ($p=0,35$).

As expressões imunohistoquímicas das células neoplásicas em núcleo, previamente à radioterapia, de NF- κ B-p65 ($p=0,90$), NF- κ B-p50 ($p=0,28$) e em membrana de HER-2 ($p=0,74$) também não tiveram impacto no risco de óbito.

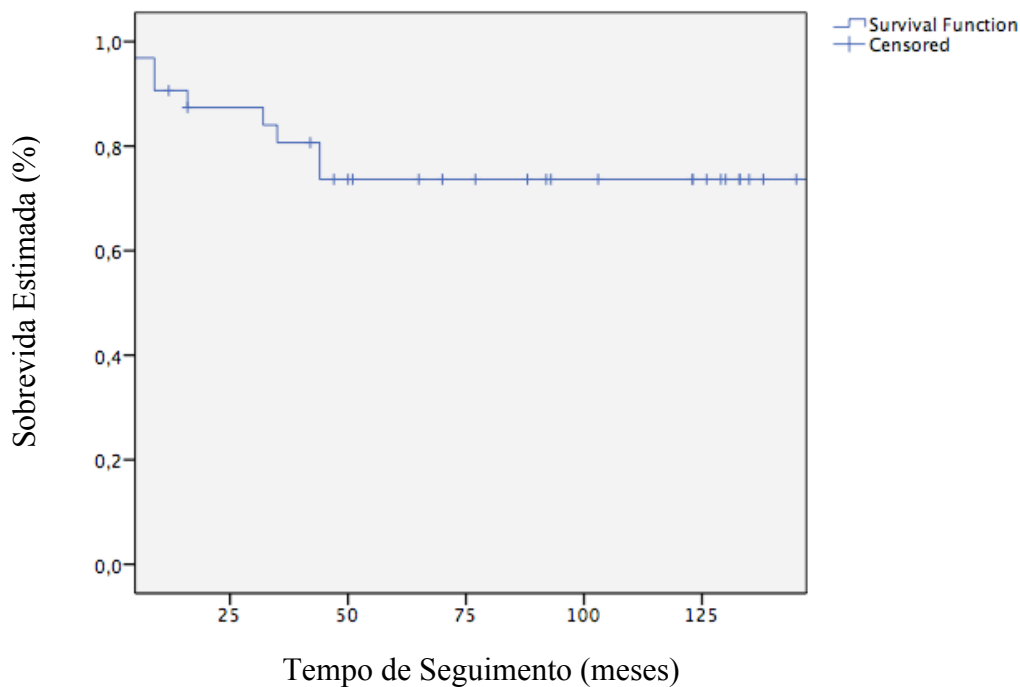


Gráfico 1 - Curva de sobrevida livre de doença para as 32 pacientes portadoras de carcinoma epidermóide do colo uterino.

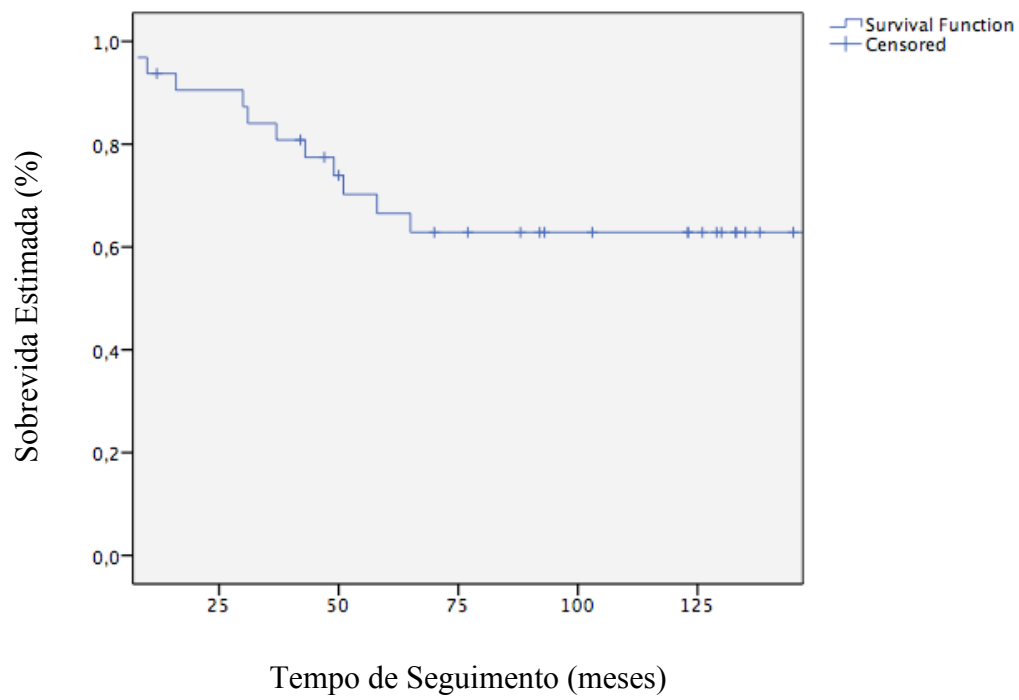


Gráfico 2 - Curva de sobrevida global para as 32 pacientes portadoras de carcinoma epidermóide do colo uterino.

5 DISCUSSÃO

O tratamento preferencial do câncer do colo uterino inicial, estágio IB1, é a histerectomia radical. Os potenciais benefícios são: a preservação da função ovariana na pré-menopausa, menor estreitamento e fibrose vaginal, avaliação patológica linfonodal e a possibilidade de tratamento de eventuais recidivas pélvicas com radioterapia. Entretanto, baseado em estudos fase III, no caso da presença de 2 fatores de risco intermediário (tamanho acima de 4cm, invasão linfovascular e invasão profunda do estroma) há indicação de radioterapia adjuvante (Sedlis et al., 1999) e caso presença de fatores de alto risco (linfonodos comprometidos, margens comprometidas e invasão parametrial) há indicação de radioterapia concomitante a quimioterapia (Peters et al., 2000).

Ainda em relação à doença inicial, Landoni et al. (1997) publicaram estudo fase III que incluiu 343 pacientes estádios IB1 a IIA que foram randomizadas para receber histerectomia radical ou radioterapia exclusiva. Receberam radioterapia adjuvante à cirurgia 54% dos pacientes estágio IB1 e 84% do estágio IB2. Não houve diferença em relação à sobrevida livre de doença ou sobrevida global entre os grupos. Portanto, a radioterapia é eficaz no tratamento primário da doença inicial e tal fato deve ser levado em consideração na decisão terapêutica de pacientes idosas ou com risco cirúrgico elevado.

Perez et al. (1995) publicaram série prospectiva não randomizada que mostrou resultados semelhantes no tratamento de tumores estádios IB-IIB em relação

à radioterapia exclusiva quando comparado à radioterapia seguida de cirurgia. Keys et al. (2003), já em uma série prospectiva randomizada que incluiu 256 pacientes com estágio IB2, não encontrou diferença significativa em relação ao risco de recidiva e óbito com a adição de histerectomia extrafascial à radioterapia apesar de 52% das pacientes submetidas a cirurgia apresentarem doença residual. A doença residual macroscópica em 12% dos casos esteve relacionada com o risco de óbito 7 vezes maior. Em outro conduzido por Keys et al. (1999), foram incluídas 369 pacientes estágio IB2 randomizadas em tratamento com radioterapia concomitante a cisplatina ou radioterapia exclusiva, sendo que ambos grupos receberam histerectomia extrafascial após tratamento radioterápico. O grupo que recebeu adição de cisplatina teve menor prevalência de doença residual (41% x 52%), menor risco de recidiva (21% x 37%) e melhor taxa de sobrevida em 5 anos (83% x 74%). Não há estudo onde seriam randomizadas pacientes para receber quimioterapia concomitante a radioterapia seguido ou não de cirurgia.

O presente estudo foi realizado em uma coorte de pacientes tratada previamente aos resultados finais destes estudos fase III. Acreditava-se que a radioterapia neoadjuvante tornaria a cirurgia factível mesmo para o estágio IIB e a ausência cirúrgica do útero teria impacto em diminuição da recidiva locorregional.

Apesar da alta prevalência de doença residual, a realização de histerectomia após tratamento radioterápico atualmente não é recomendada de rotina pelo fato de não trazer impacto em sobrevida.

Por outro lado, a adição de quimioterapia mostrou-se superior à radioterapia exclusiva para o tratamento da doença avançada (estádio \geq IB2). Atualmente, o tratamento padrão para o câncer de colo uterino localmente avançado é baseado em

radioterapia concomitante ao uso de cisplatina, resultando em sobrevida global de 66% em 5 anos (Chemoradiotherapy for Cervical Cancer Meta-analysis Collaboration-CCCMC, 2010). Em metanálise publicada pelo mesmo grupo em 2008 (CCCMC), foram revisados 13 estudos fase III que incluíram pacientes estádios I a IVa. A adição de quimioterapia à radioterapia reduziu o risco de recidiva local, recidiva à distância e melhor sobrevida tanto com uso de cisplatina (Risco Relativo 0,83; $p=0,017$) quanto com uso de outros esquemas de quimioterapia (Risco Relativo 0,77; $p=0,009$).

Entretanto, quando há presença de doença macroscópica residual após o tratamento radioterápico, estudos retrospectivos mostram benefício da realização de histerectomia (Houvenaeghel et al., 2006; Mariagrazia, et al. 2005; Classe et al., 2006). Ainda não há resposta definitiva quanto ao melhor método de avaliação da resposta após tratamento radioterápico definitivo e a adição de novas tecnologias como a tomografia por emissão de pósitrons associada à tomografia computadorizada (PET-CT) poderá vir a ter papel de destaque (Kidd et al., 2010).

Vários marcadores biológicos já foram estudados no que se refere à resposta à radioterapia. Estes estão associados à apoptose, angiogênese e progressão tumoral (Noordhuis et al., 2011).

O mecanismo mais comum envolvido na falha do tratamento radioterápico é a repopulação da tumoral, que resulta no rápido crescimento entre as frações da irradiação. O estímulo dos fatores de crescimento e a seleção de clones resistentes resultam na rápida emergência da resistência ao tratamento (Kim et al., 2005; Seiwert et al., 2007). Portanto, a ativação de certas vias de sinalização em prol da sobrevivência e contra a apoptose poderiam induzir resistência ao tratamento.

O NF- κ B regula importantes processos celulares que vão desde o estabelecimento da resposta imunológica e inflamatória à regulação da proliferação celular através da ação sobre diversos genes alvo (Nair et al., 2003). O NF- κ B é conhecido como tendo importante função anti-apoptose no processo da carcinogênese (Han et al., 2008). O tratamento radioterápico tem como objetivo a eliminação da célula tumoral através da indução da apoptose e a via do NF- κ B pode ser ativada pela radioterapia. Outros estudos também mostraram que a inibição do NF- κ B aumenta a sensibilidade da célula tumoral à ação pró-apoptose de efetores como quimioterapia e radioterapia (Magné et al., 2008).

Estudos *in vitro* com cultura de células de câncer de mama mostraram que HER-2 pode ativar a cascata de Akt/NF- κ B (Zhou et al., 2000; Makino et al., 2004). Por outro lado, Shao et al. (2001) demonstraram que a fosforilação de Akt pode não ser necessária quando há a ativação da via do NF- κ B através de irradiação. Em outro estudo Guo et al. (2004) sugerem que no câncer de mama a hiperexpressão de HER-2 acelera a ativação da via NF- κ B e que o fenótipo radorresistente relacionado a HER-2 está diretamente ligado à via de sinalização do NF- κ B.

Cao et al. (2009) mostraram também para o câncer de mama, que o NF- κ B é necessário para a ativação do HER-2 induzida por irradiação. O via do HER-2 foi ativada tanto pelo NF- κ B basal quanto pela atividade induzida por irradiação em linhagens de células resistentes a radioterapia, indicando que a hiperexpressão de HER-2 mediada por NF- κ B está envolvida na repopulação tumoral relacionada à radioterapia. Como o HER-2 poderia também ativar a via do NF- κ B, esses dados corroboram a hipótese de uma via cíclica HER-2-NF- κ B-HER-2 de adaptação e

radioresistência. Entretanto, tais achados ainda não foram avaliados *in vivo* ou para outros tumores primários como o câncer do colo uterino.

Loercher et al. (2004) previamente sugeriram em cultura de células que a via do NF- κ B é intrinsecamente ativada no carcinoma epidermóide do colo uterino. Apenas 6 artigos publicados avaliaram o NF- κ B nas lesões pré-neoplásicas e no câncer do colo uterino.

Nair et al. (2003) avaliaram a expressão imunohistoquímica de NF- κ B em respectivamente 23 neoplasias intraepiteliais cervicais de baixo grau (NIC I), 27 neoplasias intraepiteliais cervicais de alto grau (NIC III) e 38 carcinomas epidermóides. Para o NIC I, foi encontrada alta expressão em citoplasma de NF- κ B-p50 e NF- κ B-p65 em respectivamente 60,8% e 86,9% dos casos. A expressão em núcleo não foi encontrada. Por outro lado, no NIC III, a alta expressão em núcleo de p50 e p65 foi observada em respectivamente 65% e 71% das células. No carcinoma epidermóide bem diferenciado, a alta expressão em núcleo de p50 e p65 foi observada em respectivamente 64% e 75% das células. No carcinoma moderadamente diferenciado, a alta expressão em núcleo de p50 e p65 foi observada em respectivamente 69% e 76% das células e no carcinoma de alto grau, a alta expressão em núcleo de p50 e p65 foi observada em 81% e 92% das células. Houve diferença estatística da expressão de p50 e p65 entre NIC III e câncer. Houve ainda diminuição progressiva da expressão de I κ B α durante a progressão de NIC ao câncer. Os autores sugerem que a fosforilação de I κ B α ocorre em fases iniciais e não seria encontrado em estádios mais avançados devido à degradação do I κ B α . Os autores também demonstraram que a translocação nuclear através da via clássica do NF- κ B observada no NIC III e câncer correlacionou-se com aumento da sua ligação

com o DNA. Concluem que no NIC I o p50, p65 e I κ B α localizam-se no citoplasma e no NIC III e câncer o NF- κ B se transloca ao núcleo e o I κ B α é fosforilado e degradado.

Ramdass et al. (2007) publicaram série de 2 instituições onde foi avaliado NF- κ B-p50 e p65 em 48 tecidos normais, 114 NIC e 114 carcinomas invasores. Mostraram aumento da expressão com o aumento da severidade da doença. No citoplasma encontraram expressão de p50 em tecido normal, NIC e no carcinoma em respectivamente 54%, 68% e 97% dos casos. No caso do p65, respectivamente 50%, 68% e 95% dos casos. No núcleo encontrou expressão de p50 em tecido normal, NIC e no carcinoma em respectivamente 15%, 67% e 86% dos casos. No caso do p65, respectivamente 31%, 39% e 59% dos casos.

Branca et al. (2006) avaliaram uma série de 152 NIC e 150 carcinomas invasores em relação à expressão imunoistoquímica de NF- κ B-p65 e também observaram um aumento progressivo da expressão em citoplasma em relação à severidade da doença, onde respectivamente houve alta expressão em NIC I, NIC II, NIC III e câncer em 5,3%, 10%, 21,6% e 39% dos casos. No caso da expressão em núcleo, somente foi encontrada alta expressão no NIC III em 3,1% e câncer em 8,8% dos casos.

Prusty et al. (2005) publicaram série onde sugerem uma ativação constitutiva do NF- κ B no câncer de colo uterino, sendo que também descrevem um aumento gradual desde o NIC I até o câncer. Notaram ainda uma alta expressão de p50 em núcleo e baixa de p65, e propuseram que ocorra no câncer do colo preferencialmente uma homodimerização entre p50/p50 ao contrário da heterodimerização mais comumente descrita entre p50/p65.

Li et al. (2009) também avaliaram amostras de tecido normal, NIC e carcinoma invasor de colo uterino. Corroboram o observado pelos estudos anteriores e descrevem um aumento gradual da expressão imunohistoquímica nuclear de p65 e p50 e da translocação nuclear por Western blot. Nos 79 carcinomas invasores estudados, a expressão nuclear aumentada de p65 (63,3%) e p50 (82,3%) estiveram relacionadas com alto grau, maior tamanho e invasão tecidual. A expressão de p65 também correlacionou-se com metástase linfonodal e pior sobrevida. Sugeriram que a ativação constitucional do NF- κ B no câncer do colo estaria relacionada com progressão tumoral, comportamento agressivo e pior prognóstico.

Apenas o estudo de Garg et al. (2010) analisaram o papel prognóstico da expressão de NF- κ B em pacientes com doença localmente avançada (IB2-IIIB) e que receberam tratamento definitivo com radioterapia associada a quimioterapia. Apenas 16 pacientes tiveram amostras de tumor obtidas antes do início do tratamento radioterápico e também após 48h. O estudo não descreve qual o NF- κ B estudado. O NF- κ B foi avaliado em núcleo e considerado positivo em 3/16 (19%) pré-tratamento e 5/16 (31%) após 48h. A expressão positiva antes do tratamento correlacionou-se com aumento de recidiva locorregional ($p=0,01$) e óbito por câncer ($p=0,03$), porém a análise estatística para sobrevida não utilizou o teste Kaplan-Meier e log-rank.

No presente estudo encontramos positividade para NF- κ B em citoplasma para p65 e p50 em respectivamente 90,6% e 96,9% dos casos. No caso da expressão em núcleo, ambos tiveram expressão positiva em 59,4% dos casos. Apesar de serem encontrados diferentes valores entre os estudos, também encontramos uma maior expressão em citoplasma em relação ao núcleo e é provável que haja o aumento constitucional da expressão do NF- κ B no câncer do colo uterino.

No grupo de pacientes que tiveram doença residual após tratamento com radioterapia, encontramos uma diminuição da expressão de NF- κ B p50 e p65 no citoplasma, ambas em 50% dos casos. Houve ainda o aumento da expressão de NF- κ B p50 em núcleo (75%) e não houve expressão de p65 em núcleo. O estímulo da radioterapia é conhecido por translocar o NF- κ B do citoplasma ao núcleo e tal fato pode também ser sugerido em nossa série. A não expressão de p65 pode estar relacionada com a homodimerização preferencial de p50/p50 sugerida por Prusty et al. (2005).

A expressão de NF- κ B tanto em citoplasma quanto em núcleo nas biópsias prévias à radioterapia não conseguiram predizer quais pacientes que não teriam resposta completa ao tratamento radioterápico. No entanto, podemos sugerir que a radioterapia favoreceria a translocação do NF- κ B, já que encontramos expressão menor em citoplasma e maior em núcleo para o p50 nos casos que não tiveram resposta completa ao tratamento radioterápico. Nesse grupo de pacientes a via do NF- κ B poderia estimular mais intensamente fatores anti-apoptose e reduziram a chance de resposta à radioterapia. Entretanto, não é possível através dos nossos dados avaliar se também houve a translocação de NF- κ B para o núcleo antes do evento de morte celular nos casos com resposta completa à radioterapia, pois as amostras de tumor foram obtidas somente após o término do tratamento radioterápico completo.

Não encontramos ainda diferença significativa entre a expressão de NF- κ B em relação a idade, grau histológico e presença de comprometimento linfonodal.

A expressão da proteína IKK α nas amostras de tumor não foi observada. Como previamente citado, Nair et al. (2003) sugerem que a fosforilação de I κ B α

ocorre em fases iniciais e não é encontrado em estádios mais avançados devido à degradação do $I\kappa B\alpha$. O mesmo poderia ocorrer com a $IKK\alpha$, enzima necessária para degradação do complexo NF- κ B. O presente estudo é o primeiro a avaliar por imunistoquímica a expressão de $IKK\alpha$ no câncer do colo uterino, porém não foi incluída a avaliação de $I\kappa B\alpha$.

A expressão imunistoquímica de HER-2 no câncer de colo uterino ainda é motivo de controvérsia, variando entre 0% e 42% (Kristensen et al., 2006; Oka et al., 1994; Ngan et al., 2001; Nakano et al., 1997). Uma das causas da discrepância entre os estudos é a diversidade das metodologias empregadas.

Shen et al. (2008) avaliaram a expressão de HER-2 nos tumores primários e linfonodos de 51 pacientes (estádios IB e IIA) submetidas a histerectomia radical. Nenhum paciente expressou HER-2 (2+ ou 3+) no primário ou linfonodo. Kristensen et al. (2006) encontraram alguma reação imunistoquímica em 12% de 132 casos, porém apenas 1 caso foi considerado 2+ e nenhum 3+. Berchuck et al. (1990) avaliaram 26 pacientes estágio I-IVB e todos os pacientes apresentaram expressão 1+, exceto um caso estágio IVB (3+).

Alguns estudos encontraram a expressão de HER-2 como fator de pior prognóstico em pacientes tratadas com radioterapia. Nakano et al. (1997) mostraram expressão positiva em 42% (categorizada qualquer expressão como positiva) dos 64 tratados com radioterapia (estádios I-IV). Houve aumento da expressão quanto mais avançado o estágio. Notaram ainda que a expressão positiva esteve relacionada com maior recidiva local e pior sobrevida em 5 anos (45% x 75%).

Oka et al. (1994) avaliaram 192 pacientes estágio III tratados com radioterapia e encontraram expressão de HER-2 em 20% dos casos, sendo 3+ em apenas 3,1%.

Houve melhor sobrevida em 5 anos para grupo HER-2 negativo (61% x 41%; $p=0,02$).

Niibe et al. (2003) avaliaram 21 pacientes com estágio avançado IIIB associado a metástase linfonodal retroperitoneal. A expressão imunoistoquímica de HER-2 no tumor primário mostrou-se positiva (considerado 1+ e 2+) em 43% dos pacientes e sugeriram que a expressão de HER-2 estava relacionada com a diminuição de sobrevida em análise multivariada ($p=0,02$).

Quando o tratamento foi realizado com radioterapia associado à quimioterapia, outros estudos também sugeriram a expressão de HER-2 como fator de mau prognóstico.

Yamashita et al. (2009) avaliaram a expressão de HER-2 em 57 casos submetidos a tratamento com radioterapia e quimioterapia estádios II-IV. Houve expressão em 13% dos casos. As pacientes com expressão de HER-2 utilizando um método dicotômico para positividade de expressão tiveram menor sobrevida, porém sem diferença significativa ($p=0,06$).

Pérez-Regadera et al. (2010) analisaram 136 pacientes com estádios IB2-IVA submetidas a tratamento radioterápico. Considerados HER-2 positivo somente os casos com a expressão 3+, sendo 23,5% dos casos. Trata-se do estudo com maior incidência de casos com expressão 3+. Os pacientes com HER-2 positivo tiveram menor sobrevida livre de doença em 5 anos (58% x 36%; $p=0,02$). O subgrupo de pacientes HER-2 positivo e que não receberam tratamento radioterápico associado a quimioterapia tiveram pior sobrevida livre de doença ($p=0,0014$).

Outros autores não encontraram correlação entre a expressão de HER-2 e o prognóstico (Leung et al., 2001; Ngan et al., 2001). Inclusive Lee et al. (2005)

sugeriram que a expressão de HER-2 está relacionada a melhor sobrevida tanto em análise univariada quanto multivariada. Neste estudo foi avaliada a expressão imunohistoquímica de HER-2 em 55 pacientes tratados com radioterapia utilizando um sistema de automatizado.

Em relação ao tipo histológico adenocarcinoma, Kihana et al. (1994) mostraram expressão intensa em 11 de 44 pacientes (25%). Destes, a maioria mostrou amplificação por hibridização slot blot, sendo esta mais frequente nos estádios II e III (39%) que no estágio I (9%). Encontrado pior prognóstico (recidiva e óbito) para os adenocarcinomas HER-2 positivo na análise univariada ($p < 0,005$) e multivariada ($p = 0,032$ para óbito; $p = 0,029$ para recidiva).

No presente estudo encontramos expressão positiva (2+ e 3+) em 21,9% dos casos, sendo apenas um caso com expressão 3+ (3,1%). Não encontramos impacto em risco de recidiva ou óbito para esse grupo de pacientes e este achado poderia ser justificado pelo tamanho da coorte estudada.

Pelo fato de não haver padronização da correlação entre amplificação gênica e expressão imunohistoquímica de HER-2 no câncer de colo uterino, foi realizado o teste de FISH nas amostras dos 32 casos. O único caso com amplificação gênica foi o que apresentou expressão imunohistoquímica 3+. Nenhum dos outros 31 casos, incluindo os 6 casos que tiveram expressão imunohistoquímica 2+, tinham amplificação gênica.

A baixa incidência de amplificação gênica para HER-2 é corroborada por outros estudos. Leniskova et al. (2009) avaliaram a expressão de HER-2 em NIC (678 casos) e câncer de colo uterino (136 casos) por imunohistoquímica e CISH (*chromogenic in situ hybridization*), não encontrando nos casos de NIC I e II alta

expressão (3+), 2.2% no NIC III e 0.7% nos carcinomas. Amplificação gênica foi observada em apenas 0.5% dos casos.

Rosty et al. (2004) não encontraram amplificação por FISH nos 84 casos de colo estudados. Mark et al. (1999) encontraram amplificação em 2 de 23 (9%) dos casos estudados por FISH. Kersemaekers (1999) avaliaram 136 pacientes estágio I e II, HER-2 foi apenas focalmente positivo em 12 casos e encontrado amplificação gênica por *Southern blot hybridization* em apenas 2 casos.

Apenas Zhang et al. (2002) descreveram uma grande prevalência de amplificação por FISH. Foi encontrada em 29% (24/84 casos) dos casos, sendo que 59 também tiveram avaliação imunoistoquímica. Dos 18 casos com amplificação, 78% (14/18) demonstraram também aumento da expressão imunoistoquímica do HER-2.

Em relação aos tumores recidivados a literatura é escassa. Chavez-Blanco et al. (2004) avaliaram 35 pacientes estágio IB2-IIIB e encontraram expressão 3+, sendo os demais não mostraram expressão. Quatro pacientes recidivaram e 2 tiveram respectivamente expressão 2+ e 3+, porém não foi encontrada amplificação gênica por FISH para os casos recidivados. Ambos não expressavam HER-2 na lesão inicial.

Bellone et al. (2003) estabeleceram cultura de células de câncer de colo uterino a partir de tumores de estágio inicial e observaram que populações de células HER-2 positivo podem ter vantagem e crescer a partir de tumores considerados inicialmente HER-2 negativo por imunoistoquímica.

Em relação à presença de doença residual, houve uma maior prevalência nos casos que expressavam HER-2 previamente à radioterapia, porém sem diferença estatística. O tamanho da presente coorte não foi capaz de demonstrar tal diferença.

Interessante salientar que nenhum caso com doença residual apresentou expressão de HER-2 na peça a histerectomia. O motivo da perda da expressão do HER-2 permanece em aberto. Tal achado ainda não foi descrito na literatura e uma hipótese seria a degradação da proteína em membrana relacionado à radioterapia.

Não encontramos ainda diferença significativa entre a expressão de HER-2 em relação a idade, tipo histológico, grau histológico e presença de comprometimento linfonodal.

Não está claro se no câncer do colo uterino a via principal de ativação do NF- κ B está relacionada ao HER-2, já que a expressão de HER-2 no câncer do colo uterino é evento muito menos prevalente e a expressão do NF- κ B parece ser evento constitucional.

No presente estudo, encontramos correlação entre a expressão de HER-2 e de p65 em núcleo. Dentre as pacientes com HER-2 positivo, 85,7% apresentaram NF- κ B-p65 em núcleo negativo. Não houve correlação entre expressão de HER-2 e a de NF- κ B-p50 em núcleo. A correlação entre HER-2 e NF- κ B sugerida no câncer de mama parece não estar presente no câncer do colo uterino quando analisado por imunohistoquímica.

Existem algumas razões para justificar os resultados discrepantes entre os diversos estudos. Os sistemas de escore utilizados são habitualmente baseados na proporção de células coradas em combinação com a intensidade de coloração. A interpretação da intensidade de coloração além de ser bastante subjetiva, pode sofrer variações entre os protocolos e até nos procedimentos de fixação de material. O número pequeno de pacientes em alguns estudos, diferentes sistemas de escore,

fontes diversas do anticorpo e variações de protocolo do estudo imunoistoquímico tornam a comparação entre os estudos sempre um grande desafio.

Nossos achados sugerem que a amplificação gênica do HER-2 é um evento raro no câncer do colo do útero e a expressão imunoistoquímica de HER-2, apesar de pouco prevalente, pode ter um papel na predição de resposta à radioterapia. Não encontramos correlação positiva entre a expressão de HER-2 e NF- κ B e o último não teve papel na predição de resposta à radioterapia. Sugerimos ainda que a expressão citoplasmática de NF- κ B pode ser um evento constitucional do câncer do colo do útero e que há a diminuição da expressão em citoplasma e aumento em núcleo após o tratamento com radioterapia para os casos que tem doença persistente. Entretanto, nossos resultados ainda deverão ser reproduzidos por outros estudos

A melhor estratificação de risco para pacientes com câncer do colo do útero é necessária para que no futuro os pacientes possam receber tratamento inicial ou complementar mais adequado e específico.

6 CONCLUSÕES

6.1 As expressões imunohistoquímicas positivas de NF- κ B-p65 e NF- κ B-p50 em citoplasma dos tumores do colo uterino avaliados previamente à radioterapia foram encontradas em respectivamente 90,6% e 96,9% dos casos estudados. As expressões de NF- κ B-p65 e NF- κ B-p50 em núcleo avaliados previamente à radioterapia foi de 59,4% dos casos. A expressão de HER-2 avaliados previamente à radioterapia foi de 21,9% dos casos. Não houve expressão imunohistoquímica de IKK α nos tumores do colo uterino avaliados previamente à radioterapia.

6.2 A amplificação gênica de HER-2 nos tumores primários do colo uterino foi encontrada em 3,1% dos casos estudados.

6.3 As expressões imunohistoquímicas positivas de NF- κ B-p65 e NF- κ B-p50 em citoplasma dos tumores residuais do colo uterino após radioterapia foi de 50%. A expressão de NF- κ B-p50 no núcleo dos tumores residuais do colo uterino após radioterapia foi de 75%. Não houve expressão imunohistoquímica de HER-2, IKK α e de NF- κ B-p65 no núcleo dos tumores residuais do colo uterino após radioterapia.

6.4 As expressões imunohistoquímicas positivas de HER-2, NF- κ B-p65 e NF- κ B-p50 não se correlacionaram com as variáveis anatomopatológicas estudadas ou com a presença de doença residual em colo uterino após o tratamento radioterápico.

6.5 As expressões imunistoquímicas positivas de NF- κ B-p65, NF- κ B-p50, IKK α e HER-2 não se associaram a piores taxas de sobrevida livre de doença, sobrevida global e sobrevida câncer específica.

7 REFERÊNCIAS

Ahmed KM, Cao N, Li JJ. HER-2 and NF-kappaB as the targets for therapy-resistant breast cancer. *Anticancer Res.* 2006;26(6B):4235-43.

Ahmed KM, Li JJ. NF- κ B-mediated adaptive resistance to ionizing radiation. *Free Radic Biol Med.* 2008; 44(1): 1–13.

Al Moustafa AE, Foulkes WD, Wong A, Jallal H, Batist G, Yu Q, Herlyn M, Sicinski P, Alaoui-Jamali MA. Cyclin D1 is essential for neoplastic transformation induced by both E6/E7 and E6/E7/ErbB-2 cooperation in normal cells. *Oncogene.* 2004;23(30):5252-6.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell.* New York and London; c2002, Chapter 15. Mechanisms of cell communication.

Badra FA, Karamouzis MV, Ravazoula P, Likaki-Karatza E, Tzorakoleftherakis E, Koukouras D, Iconomou G, Xiros N, Siablis D, Papavassiliou AG, Kalofonos HP. Non-palpable breast carcinomas: correlation of mammographically detected malignant-appearing microcalcifications and epidermal growth factor receptor (EGFR) family expression. *Cancer Lett.* 2006 Nov 28;244(1):34-41.

Baldwin AS. The NF κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights. *Annual Review of Immunology*. 1996;14:649-81.

Baeuerle PA, Baltimore D. NF κ B: ten years after. *Cell*. 1996;87(1):13-20.

Bellone S, Palmieri M, Gokden M, Joshua J, Roman JJ, Pecorelli S, Cannon MJ, Santin AD. Selection of HER-2/neu-positive tumor cells in early stage cervical cancer: implications for Herceptin-mediated therapy. *Gynecol Oncol*. 2003;91(1):231-40.

Berchuck A, Rodriguez G, Kamel A, Soper JT, Clarke-Pearson DL, Bast RC Jr. Expression of epidermal growth factor receptor and HER-2/neu in normal and neoplastic cervix, vulva, and vagina. *Obstet Gynecol*. 1990;76(3 Pt 1):381-7.

Bonizzi G, Karin M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* .2004; 25:280–8.

Bours V, Dejardin E, Goujon-Letawe F, Merville MP, Castronovo V. The NF-kappa B transcription factor and cancer: high expression of NF-kappa B- and I kappa B-related proteins in tumor cell lines. *Biochem Pharmacol*. 1994; 47:145-9.

Brach MA, Hass R, Sherman ML, Gunji H, Weichselbaum R, Kufe D. Ionizing radiation induces expression and binding activity of the nuclear factor kappa B. *J Clin Invest* .1991;88:691–5.

Branca M, Giorgi C, Ciotti M, Santini D, Di Bonito L, Costa S, Benedetto A, Bonifacio D, Di Bonito P, Paba P, Accardi L, Mariani L, Ruutu M, Syrjänen S, Favalli C, Syrjänen K; HPV-Pthogen ISS Study Group. Upregulation of nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) is related to the grade of cervical intraepithelial neoplasia, but is not an independent predictor of high-risk human papillomavirus or disease outcome in cervical cancer. *Diagn Cytopathol*. 2006;34(8):555-63.

Broders AC. The grading of carcinoma. *Minnesota Med*. 1925; 8: 726-30.

Bristow RG, Hill RP. Molecular and Cellular Basis of Radiotherapy. In Tannock IF, Hill RP, Bristow RG, Harrington L. The Basic Science of Oncology. Canada. Mcgraw-Hill Companies, Fourth Edition, Chapter 14, pg. 261-284.

Cao N, Li S, Wang Z, Ahmed KM, Degnan ME, Fan M, Dynlacht JR, Li JJ. NF-kappaB-mediated HER2 overexpression in radiation-adaptive resistance. *Radiat Res*. 2009;171(1):9-21.

Classe JM, Rauch P, Rodier JF, Morice P, Stoeckle E, Lasry S, Houvenaeghel G; Groupe des Chirurgiens de Centre de Lutte Contre le Cancer. Surgery after concurrent chemoradiotherapy and brachytherapy for the treatment of advanced cervical cancer: morbidity and outcome: results of a multicenter study of the GCCLCC (Groupe des Chirurgiens de Centre de Lutte Contre le Cancer). *Gynecol Oncol*. 2006;102(3):523-9.

Chaturvedi MM, Sung B, Yadav VR, Kannappan R, Aggarwal BB. NF- κ B addiction and its role in cancer: 'one size does not fit all'. *Oncogene*. 2011;30(14):1615-30.

Chavez-Blanco A, Perez-Sanchez V, Gonzalez-Fierro A, Vela-Chavez T, Candelaria M, Cetina L, Vidal S, Dueñas-Gonzalez A. HER2 expression in cervical cancer as a potential therapeutic target. *BMC Cancer*. 2004;4:59.

Chemoradiotherapy for Cervical Cancer Meta-Analysis Collaboration. Reducing uncertainties about the effects of chemoradiotherapy for cervical cancer: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 18 randomized trials. *J Clin Oncol*. 2008;26(35):5802-12.

Chemoradiotherapy for Cervical Cancer Meta-analysis Collaboration. Reducing uncertainties about the effects of chemoradiotherapy for cervical cancer: Individual patient data meta-analysis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010;(1): CD008285.

Chen X, Shen B, Xia L, Khaletzkii A, Chu D, Wong JY, Li JJ. Activation of nuclear factor kappaB in radioresistance of TP53-inactive human keratinocytes. *Cancer Res.* 2002;62:1213–21.

Citri A, Yarden Y. EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006 Jul;7(7):505-16.

Dejardin E, Deregowski V, Chapelier M, Jacobs N, Gielen J, Merville MP, Bours V. Regulation of NF-kappaB activity by I kappaB related proteins in adenocarcinoma cells. *Oncogene.* 1999, 18:2567-77.

Deveraux QL, Roy N, Stennicker HR, Van Arsdale T, Zhou Q, Srinivasula SM, Alnemri ES, Salvesen GS, Reed JC. IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspase. *EMBO J.* 1998, 17:2215-23.

Diaz-Cano SJ. General morphological and biological features of neoplasms: integration of molecular findings. *Histopathology.* 2008 Jul; 53(1):1-19

Dolcet X, Llobet D, Xavier JP. NF-kB in development and progression of human cancer. *Virchows Arch.* 2005, 446: 475–82

Fan M, Ahmed KM, Coleman MC, Spitz DR, Li JJ. NF-kappaB and MnSOD mediate adaptive radioresistance in low dose irradiated mouse skin epithelial

cells. *Cancer Res.* 2007;67:3220–28.

Ferrigno R, Novaes PER, Pellizzon ACA, Maia MAC, Fogarolli RC, Gentil AC, Salvajoli JV. High-Dose-Rate brachiterapy in the treatment of uterine cervix cancer. Analysis of dose effectiveness and late complications. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* 2001; 50(5): 1123-35.

Finnegan TJ, Carey LA. Gene-expression analysis and the basal-like breast cancer subtype. *Future Oncol.* 2007 Feb;3(1):55-63.

Foo SY, Nolan GP. NF-kappaB to the rescue: RELs, apoptosis and cellular transformation. *Trends in Genetics.* 1999;15(6):229-35.

Galang CK, Garcia-Ramirez J, Solski PA, Westwick JK, Der CJ, Neznanov NN, Oshima RG, Hauser CA. Oncogenic Neu/ErbB-2 increases ets, AP-1, and NF-kappaB-dependent gene expression, and inhibiting ets activation blocks Neu-mediated cellular transformation. *J Biol Chem.* 1996;271:7992–8.

Garg AK, Jhingran A, Klopp AH, Aggarwal BB, Kunnumakkara AB, Broadus RR, Eifel PJ, Buchholz TA. Expression of nuclear transcription factor kappa B in locally advanced human cervical cancer treated with definitive chemoradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2010;78(5):1331-6.

Ge J, Xu H, Li T, Zhou Y, Zhang Z, Li S, Liu L, Shao F. A Legionella type IV effector activates the NF-kappaB pathway by phosphorylating the IkappaB family of inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106: 13725–30.

Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 1998;16:225-60.

Grandis JR, Sok JC. Signaling through the epidermal growth factor receptor during the development of malignancy. *Pharmacol Ther*. 2004;102(1):37-46.

Guo G, Wang T, Gao Q, Tamae D, Wong P, Chen T, Chen WC, Shively JE, Wong JY, Li JJ. Expression of ErbB2 enhances radiation-induced NF-kappaB activation. *Oncogene*. 2004;23:535–45.

Guttridge DC, Albanese C, Reuther JY, Pestell RG, Baldwin AS Jr. NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Mol Cell Biol*. 1999; 19:5785-99.

Haffty BG, Brown F, Carter D, Flynn S. Evaluation of HER-2 neu oncoprotein expression as a prognostic indicator of local recurrence in conservatively treated breast cancer: a case-control study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1996;35:751–7.

Han S, Ritzenthaler JD, Zheng Y, Roman J. PPARbeta/delta agonist stimulates human lung carcinoma cell growth through inhibition of PTEN expression: the involvement of PI3K and NF-kappaB signals. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008;294(6):L1238-49.

Harrington K, Jankowska P, Hingorani M. Molecular biology for the radiation oncologist: the 5 Rs of radiobiology meet the hallmarks of cancer. *Clin Oncol*. 2007;19(8):561-71.

Hayden MS, Ghosh S. NF-kB in immunobiology. *Cell Research*. 2011; 21:223-44.

Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev*. 2004;18:2195–224.

Herrmann JL, Beham AW, Sarkiss M, Chiao PJ, Rands MT, Bruckheimer EM, Brisbay S, McDonnell TJ. Bcl-2 suppresses apoptosis resulting from disruption of the NF-kappa B survival pathway. *Exp Cell Res*. 1997;237(1):101-9.

Herscher LL, Cook JA, Pacelli R, Pass HI, Russo A, Mitchell JB. Principles of chemoradiation: theoretical and practical considerations. *Oncology* 1999;13:11–22.

Hoff MHB, Park C, Wright EC. Radiation and microenvironment-tumorigenesis and therapy. *Nature Reviews Cancer*. 2005; 867-75.

Houvenaeghel G, Lelievre L, Gonzague-Casabianca L, Buttarelli M, Moutardier V, Goncalves A, Resbeut M. Long-term survival after concomitant chemoradiotherapy prior to surgery in advanced cervical carcinoma. *Gynecol Oncol*. 2006;100(2):338-43.

Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(5):341-54.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011;61(2):69-90.

Kane LP, Shapiro VS, Stokoe D, Weiss A. Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB kinase. *Curr Biol* 1999;9:601-4.

Kaplan E, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958; 8: 423-46.

Karin M, Cao Y, Greten FR, Li Z. NF- kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nature Review Cancer*. 2002; 2:301-9.

Kato Jr T., Delhase M, Hoffmann A, Karin M. CK2 is a C-terminal IkappaB

kinase responsible for NF-kappaB activation during the UV response. *Mol Cell*. 2003;12: 829–39.

Kersemaekers AM, Fleuren GJ, Kenter GG, Van den Broek LJ, Uljee SM, Hermans J, Van de Vijver MJ. Oncogene alterations in carcinomas of the uterine cervix: overexpression of the epidermal growth factor receptor is associated with poor prognosis. *Clin Cancer Res*. 1999;5(3):577-86.

Keys HM, Bundy BN, Stehman FB, Muderspach LI, Chafe WE, Suggs CL 3rd, Walker JL, Gersell D. Cisplatin, radiation, and adjuvant hysterectomy compared with radiation and adjuvant hysterectomy for bulky stage IB cervical carcinoma. *N Engl J Med*. 1999;340(15):1154-61.

Keys HM, Bundy BN, Stehman FB, Okagaki T, Gallup DG, Burnett AF, Rotman MZ, Fowler WC Jr; Gynecologic Oncology Group. Radiation therapy with and without extrafascial hysterectomy for bulky stage IB cervical carcinoma: a randomized trial of the Gynecologic Oncology Group. *Gynecol Oncol*. 2003;89(3):343-53.

Kidd EA, Siegel BA, Dehdashti F, Rader JS, Mutch DG, Powell MA, Grigsby PW. Lymph node staging by positron emission tomography in cervical cancer: relationship to prognosis. *J Clin Oncol*. 2010;28(12):2108-13.

Kihana T, Tsuda H, Teshima S, Nomoto K, Tsugane S, Sonoda T, Matsuura S, Hirohashi S. et al. Prognostic significance of the overexpression of c-erbB-2 protein in adenocarcinoma of the uterine cervix. *Cancer* 1994;73:148–53.

Kim JJ, Tannock IF. Repopulation of cancer cells during therapy: an important cause of treatment failure. *Nature Reviews Cancer*. 2005; 516-25.

Kim SH, Oh JM, No JH, Bang YJ, Juhnn YS, Song YS. Involvement of NF-kappaB and AP-1 in COX-2 upregulation by human papillomavirus 16 E5 oncoprotein. *Carcinogenesis*. 2009;(5):753-7.

Kountourakis P, Pavlakis K, Psyrris A, Rontogianni D, Xiros N, Patsouris E, Pectasides D, Economopoulos T. Prognostic significance of HER3 and HER4 protein expression in colorectal adenocarcinomas. *BMC Cancer*. 2006;6:46.

Kristensen GB, Holm R, Abeler VM, Tropé CG. Evaluation of the prognostic significance of cathepsin D, epidermal growth factor receptor, and c-erbB-2 in early cervical squamous cell carcinoma. An immunohistochemical study. *Cancer*. 1996 Aug 1;78(3):433-40.

Kunsch C, Ruben SM, Rosen CA. Selection of optimal kB/Rel DNA-binding motifs: interaction of both subunits of NF-kB with DNA is required for transcriptional activation. *Molecular and Cellular Biology*.

1992;12(10):4412-21.

Kurokawa H, Arteaga CL. Inhibition of erbB receptor (HER) tyrosine kinases as a strategy to abrogate antiestrogen resistance in human breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2001;7:4436s-42s.

La Rosa FA, Pierce JW, Sonenshein GE. Differential regulation of the c-myc oncogene promoter by the NF-kappaB rel family of transcription factors. *Mol Cell Biol.* 1994; 14:1039-44

Landoni F, Maneo A, Colombo A, Placa F, Milani R, Perego P, Farini G, Ferri L, Mangioni C. Randomised study of radical surgery versus radiotherapy for stage Ib-IIa cervical cancer. *Lancet.* 1997; 350:535-40.

Lee CM, Shrieve DC, Zempolich KA, Lee RJ, Hammond E, Handrahan DL, Gaffney DK. Correlation between human epidermal growth factor receptor family (EGFR, HER2, HER3, HER4), phosphorylated Akt (P-Akt), and clinical outcomes after radiation therapy in carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol.* 2005;99(2):415-21.

Lesnikova I, Lidang M, Hamilton-Dutoit S, Koch J. HER2/neu (c-erbB-2) gene amplification and protein expression are rare in uterine cervical neoplasia: a tissue microarray study of 814 archival specimens. *APMIS.* 2009;117(10):737-45.

Leung TW, Cheung AN, Cheng DK, Wong LC, Ngan HY. Expressions of c-erbB-2, epidermal growth factor receptor and pan-ras proto-oncogenes in adenocarcinoma of the cervix: correlation with clinical prognosis. *Oncol Rep.* 2001;8:1159 – 64.

Li J, Jia H, Xie L, Wang X, Wang X, He H, Lin Y, Hu L. Association of constitutive nuclear factor-kappaB activation with aggressive aspects and poor prognosis in cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer.* 2009;19(8):1421-6.

Li JJ, Rhim JS, Schlegel R, Vousden KH, Colburn NH. Expression of dominant negative Jun inhibits elevated AP-1 and NF-kappaB transactivation and suppresses anchorage independent growth of HPV immortalized human keratinocytes. *Oncogene.* 1998;16(21):2711-21.

Li N, Karin M. Is NF-kappaB the sensor of oxidative stress? *The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* 1999; 13 (10):1137-43.

Li Z, Xia L, Lee ML, Khaletskiy A, Wang J, Wong JYC, Li JJ. Effector genes altered in MCF-7 human breast cancer cells after exposure to fractionated ionizing radiation. *Radiat Res.* 2001;155:543–53.

Loercher A, Lee TL, Ricker JL, Howard A, Geoghegan J, Chen Z, Sunwoo JB, Sitcheran R, Chuang EY, Mitchell JB, Baldwin AS Jr, Van Waes C.

Nuclear factor-kappaB is an important modulator of the altered gene expression profile and malignant phenotype in squamous cell carcinoma.

Cancer Res. 2004;64(18):6511-23.

Luo J.L., Kamata H, Karin MIKK/NF- κ B signaling: balancing life and death - a new approach to cancer therapy. *J. Clin. Invest.* 2005; 115:2625–32.

Magné N, Chargari C, Deutsch E, Castadot P, Ghalibafian M, Bourhis J, Haie-Meder C. Molecular profiling of uterine cervix carcinoma: an overview with a special focus on rationally designed target-based anticancer agents.

Cancer Metastasis Rev. 2008;27(4):737-50.

Makino K, Day CP, Wang SC, Li YM, Hung MC. Upregulation of IKKalpha/IKKbeta by integrin-linked kinase is required for HER2/neu-induced NF-kappaB antiapoptotic pathway. *Oncogene.* 2004;23(21):3883-7.

Mariagrazia D, Anna F, Gabriella F, Francesco F, Daniela S, Giuseppe D, Alessio M, Giovanni S. Preoperative chemoradiotherapy in locally advanced cervical cancer: long-term outcome and complications. *Gynecol Oncol.* 2005;99(3 Suppl 1):S166-70.

Mark HF, Feldman D, Das S, Sun CL, Samy M, Lathrop J. HER-2/neu oncogene amplification in cervical cancer studied by fluorescent in situ hybridization. *Genet Test.* 1999;3:237–42.

May MJ, Ghosh S. Signal transduction through NF- κ B. *Immunol Today*. 1998;19(2):80-8.

Mercurio F, Manning AM. Multiple signals converging on NF κ B. *Curr Opin Cell Biol*. 1999;11(2):226-32.

Ministério da Saúde, Instituto Nacional do Câncer. Câncer de Colo do Útero. Disponível em <http://www.inca.gov.br/>. Acessado em 01/03/2011.

Moasser MM. The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene*. 2007;26(45):6469-87.

Nair A, Venkatraman M, Maliekal TT, Nair B, Karunagaran D. NF-kappaB is constitutively activated in high-grade squamous intraepithelial lesions and squamous cell carcinomas of the human uterine cervix. *Oncogene*. 2003;22(1):50-8.

Nakano T, Oka K, Ishikawa A, Morita S. Correlation of cervical carcinoma c-erbB-2 oncogene with cell proliferation parameters in patients treated with radiation therapy for cervical carcinoma. *Cancer*. 1997;79(3):513-20.

Narisawa-Saito M, Handa K, Yugawa T, Ohno S, Fujita M, Kiyono T. HPV16 E6-mediated stabilization of ErbB2 in neoplastic transformation of human cervical keratinocytes. *Oncogene*. 2007 May 10;26(21):2988-96.

National Comprehensive Cancer Network – NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. Cervical Cancer. Version 1.2012. Available from: < URL: <http://www.nccn.org> > [11/08/2011].

Nees M, Geoghegan JM, Hyman T, Frank S, Miller L, Woodworth CD. Papillomavirus type 16 oncogenes downregulate expression of interferon-responsive genes and upregulate proliferation associated and NF-kappaB-responsive genes in cervical keratinocytes. *J Virol.* 2001;(9):4283-96.

Ngan HY, Cheung AN, Liu SS, Cheng DK, Ng TY, Wong LC. Abnormal expression of epidermal growth factor receptor an erbB-2 in squamous cell carcinoma of the cervix: correlation with human papillomavirus and prognosis. *Tumour Biol.* 2001; 22 (3): 176-83.

Niibe Y, Nakano T, Ohno T, Suzuki Y, Oka K, Tsujii H. Prognostic significance of c-erbB-2/HER2 expression in advanced uterine cervical carcinoma with para-aortic lymph node metastasis treated with radiation therapy. *Int J Gynecol Cancer.* 2003;13:849–55.

Noordhuis MG, Eijssink JJ, Roossink F, de Graeff P, Pras E, Schuurin E, Wisman GB, de Bock GH, van der Zee AG. Prognostic cell biological markers in cervical cancer patients primarily treated with (chemo)radiation: a systematic review. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2011;79(2):325-34.

Oka K, Nakano T, Arai T. c-erbB-2 Oncoprotein expression is associated with poor prognosis in squamous cell carcinoma of the cervix. *Cancer*. 1994;73(3):664-71.

Orlowski RZ, Baldwin AS Jr. NF-kappaB as a therapeutic target in cancer. *Trends Mol Med*. 2002;8:385-9.

Pajonk F, Pajonk K, McBride WH. Inhibition of NF-kappaB, clonogenicity, and radiosensitivity of human cancer cells. *J Natl Cancer Inst*. 1999;91:1956-60.

Pecorelli S, Zigliani L, Odicino F. Revised FIGO staging for carcinoma of the cervix. *Int J Gynaecol Obstet*. 2009;105(2):107-8.

Perez CA, Grigsby PW, Camel HM, Galakatos AE, Mutch D, Lockett MA. Irradiations alone or combined with surgery in stage IB, IIa and IIb carcinoma of the uterine cervix: update of a nonrandomized comparison. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1995;31:703-16

Pérez-Regadera J, Sánchez-Muñoz A, De-la-Cruz J, Ballestín C, Lora D, García-Martín R, Alonso-Carrión L, Mendiola C, Lanzós E. Cisplatin-based radiochemotherapy improves the negative prognosis of c-erbB-2 overexpressing advanced cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2010;20(1):164-72.

Perkins ND, Schmid RM, Duckett CS, Leung K, Rice NR, Nabel GJ. Distinct combinations of NF- κ B subunits determine the specificity of transcriptional activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. 1992;89(5):1529-33.

Peters WA, Liu PY, Barrett RJ, Stack RJ, Monk BJ, Berek JS, Souhami L, Grigsby P, Gordon W, Alberts DS. Concurrent chemotherapy and pelvic radiation therapy compared with pelvic radiation therapy alone as adjuvant therapy after radical surgery in high-risk early-stage cancer of the cervix. *J Clin Oncol*. 2000, 18:1606–13.

Pianetti S, Arsura M, Romieu-Mourez R, Coffey RJ, Sonenshein GE. Her-2/neu overexpression induces NF- κ B via a PI3-kinase/Akt pathway involving calpain-mediated degradation of IkappaB-alpha that can be inhibited by the tumor suppressor PTEN. *Oncogene* 2001;20:1287–1299.

Piver MS, Rutledge F, Smith JP. Five classes of extended hysterectomy for women with cervical cancer. *Obstet Gynecol*. 1974;44(2):265-72.

Prusty BK, Husain SA, Das BC. Constitutive activation of nuclear factor - κ B:preferential homodimerization of p50 subunits in cervical carcinoma. *Front Biosci*. 2005;10:1510-9.

Ramdass B, Maliekal TT, Lakshmi S, Rehman M, Rema P, Nair P, Mukherjee G, Reddy BK, Krishna S, Radhakrishna Pillai M. Coexpression of Notch1 and NF-kappaB signaling pathway components in human cervical cancer progression. *Gynecol Oncol.* 2007;104(2):352-61.

Rayet B, Gelinas C. Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene.* 1999, 18:6938-47.

Ross JS, Fletcher JA. The HER-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. *Stem Cells.* 1998;16(6):413-28.

Rosty C, Couturier J, Vincent-Salomon A, Genin P, Fréneaux P, Sigal-Zafrani B, Sastre-Garau X. Overexpression/amplification of HER-2/neu is uncommon in invasive carcinoma of the uterine cervix. *Int J Gynecol Pathol.* 2004;23(1):13-7.

Schwartz SA, Hernandez A, Mark Evers B. The role of NFkappaB/IkappaB proteins in cancer: implications for novel treatment strategies. *Surg Oncol.* 1999;8(3):143-53.

Sedlis A, Bundy BN, Rotman MZ, Lentz SS, Muderspach LI, Zaino RJ. A randomized trial of pelvic radiation therapy versus no further therapy in selected patients with stage IB carcinoma of the cervix after radical

hysterectomy and pelvic lymphadenectomy: a gynecologic oncology group study. *Gynecol Oncol.* 1999, 73:177–83.

Seiwert T, Salama JK, Vokes EE. The Concurrent Chemoradiation Paradigm - General Principles. *Nat Clin Pract Oncol.* 2007; 4(2):86-100.

Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell.* 1986;46(5):705-16.

Seo SI, Song SY, Kang MR, Kim MS, Oh JE, Kim YR, Lee JY, Yoo NJ, Lee SH. Immunohistochemical analysis of NF-kappaB signaling proteins IKKepsilon, p50/p105, p52/p100 and RelA in prostate cancers. *APMIS.* 2009;117(8):623-8.

Sergina NV, Moasser MM. The HER family and cancer: emerging molecular mechanisms and therapeutic targets. *Trends Mol Med.* 2007 Dec;13(12):527-34.

Senftleben U, Cao Y, Xiao G, Greten FR, Krahn G, Bonizzi G, Chen Y, Hu Y, Fong A, Sun SC, Karin M. Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science.* 2001. 293:1495–9.

Shao R, Tsai EM, Wei K, von Lindern R, Chen YH, Makino K, Hung MC. E1A inhibition of radiation-induced NF-kappaB activity through suppression of IKK activity and IkappaB degradation, independent of Akt activation. *Cancer Res.* 2001;61(20):7413-6.

Shen L, Shui Y, Wang X, Sheng L, Yang Z, Xue D, Wei Q. EGFR and HER2 expression in primary cervical cancers and corresponding lymph node metastases: implications for targeted radiotherapy. *BMC Cancer.* 2008;8:232.

Shingleton HM, Orr JW. *Cancer of the cervix.* Philadelphia, J.B, B. Lippincott Company, 1995. cap. 6, p.93-122: Diagnosis, staging and selection of therapy for invasive tumors.

Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science.* 1987;235(4785):177-82.

Solan NJ, Miyoshi H, Carmona EM, Bren GD, Paya CV. RelB cellular regulation and transcriptional activity are regulated by p100. *J Biol Chem.* 2002;277:1405–18.

Szumiel I. Intrinsic radiation sensitivity: cellular signaling is the key. *Rad Res.* 2008;169(3): 249-58.

Tang G, Minemoto Y, Dibling B, Purcell NH, Li Z, Karin M, Lin A. Inhibition of JNK activation through NF-kappaB target genes. *Nature* 2001; 414:313–7.

Visconti R, Cerutti J, Battista S, Fedele M, Trapasso F, Zeki K, Miano MP, de Nigris F, Casalino L, Curcio F, Santoro M, Fusco A. Expression of the neoplastic phenotype by human thyroid carcinoma cell lines requires NFkappaB p65 protein expression. *Oncogene* 1997, 15:1987-94.

Williams JR, Zhang Y, Zhou H, Russel J, Gridley DS, Koch CJ, Little JB. Genotype-dependent radiosensitivity: clonogenic survival, apoptosis and cell-cycle redistribution. *Int J Radiat Biol.* 2008 Feb;84(2):151-64.

Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2007; 25:118-45.

Yamashita H, Murakami N, Asari T, Okuma K, Ohtomo K, Nakagawa K. Correlation among six biologic factors (p53, p21(WAF1), MIB-1, EGFR, HER2, and Bcl-2) and clinical outcomes after curative chemoradiation therapy in squamous cell cervical cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2009;74(4):1165-72.

- Yang HY, Zhou BP, Hung MC, Lee MH. Oncogenic signals of HER-2/neu in regulating the stability of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *J Biol Chem*. 2000;275:24735–9.
- Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2(2):127-37.
- Yasmeen A, Bismar TA, Dekhil H, Ricciardi R, Kassab A, Gambacorti-Passerini C, Al Moustafa AE. ErbB-2 receptor cooperates with E6/E7 oncoproteins of HPV type 16 in breast tumorigenesis. *Cell Cycle*. 2007;6(23):2939-43.
- Yu D, Hung MC. Overexpression of ErbB2 in cancer and ErbB2-targeting strategies. *Oncogene*. 2000;19:6115–21.
- Zhang A, Månér S, Betz R, Angström T, Stendahl U, Bergman F, Zetterberg A, Wallin KL. Genetic alterations in cervical carcinomas: frequent low-level amplifications of oncogenes are associated with human papillomavirus infection. *Int J Cancer*. 2002;101(5):427-33.
- Zhou BP, Hu MC, Miller SA, Yu Z, Xia W, Lin SY, Hung MC. HER-2/neu blocks tumor necrosis factor-induced apoptosis via the Akt/NF-kappaB pathway. *J Biol Chem*. 2000;275(11):8027-31.