

FABRICIA LEAL ZAGANELLI

**Avaliação da linfangiogênese intratumoral em
carcinoma
precoce do colo de útero**

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

Área de concentração: Obstetrícia e Ginecologia
Orientador: Prof. Dr. Jesus Paula Carvalho

São Paulo

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

“Deus nos fez perfeitos,
Ele não escolhe os mais capacitados,
e sim capacita os escolhidos.”

Albert Einstein

Agradecimentos

Deus - em primeiro lugar, pois sem Ele seria impossível chegar até aqui. Peço perdão por minhas inseguranças, que foram muitas. "Agradeço todas as dificuldades que enfrentei, pois se não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar." *Chico Xavier*

Prof. Dr. Jesus Paula Carvalho, meu orientador - meus mais sinceros respeito e admiração e obrigada por ter sido muito mais do que um orientador, despertando em mim a vontade de fazer. Agradeço por sua capacidade de transformar cada momento do seu dia em reflexões positivas para que eu, aluna que iniciava a vida acadêmica, visse que as dificuldades existem, mas que existem também ferramentas para superá-las. O senhor é um exemplo de professor.

Magnífico Reitor da Universidade Federal do Espírito Santo, Doutor Rubens Sérgio Rasseli - agradeço pelo carinho que sempre teve comigo e que me proporcionou a continuidade nos estudos até a chegada a este doutorado. Meus eternos agradecimentos.

Prof^a. Dr^a. Margareth Vetis Zaganelli - sua extrema generosidade comigo em vários momentos da minha vida ajudaram-me a prosseguir e a lutar por meus ideais. A senhora é muito mais do que uma tia querida, é um exemplo de profissional. Obrigada.

Prof. Dr. João Alvécio Sossai - admirável e generoso, pois consegue ajudar não só seus alunos próximos, mas também os que estão distantes. Obrigada.

Prof. Dr. João Carlos Sampaio Góes - um exemplo profissional para alunos que iniciam a vida acadêmica. Obrigada por ter me aberto portas que estão fazendo toda a diferença na minha vida.

Dra. Renata Sampaio Goes - obrigada por ser uma amiga tão querida.

Prof. Dr. Edmund C. Baracat - meu eterno agradecimento por esta oportunidade. "Tudo o que um sonho precisa para ser realizado é alguém que acredite nele." *Roberto Shinyashiki*

Prof. Dr. Marcelo A. Calil - pela disponibilidade irrestrita e por possibilitar com que este trabalho se concretizasse.

Prof^ª Dr^ª. Filomena Marino Carvalho - seus gestos de carinho, atenção e delicadeza foram muito além das funções de uma professora, demonstrando-se uma mãe que me fez perceber o quanto é uma pessoa especial na sua forma de ser. Saiba como foram bem-vindos seus ensinamentos e ações, os puxões de orelha que sempre ocorreram na hora certa e seus sorrisos quando acertávamos o dever de casa. Muito obrigada!

Prof. Dr. Altamiro Dias - por me acolher em seu ambulatório e dividir o conhecimento diário com paciência e amizade.

Dra. Eloá Muniz de Freitas Alves - pela paciência e carinho quando estávamos afobados devido aos prazos e só a senhora, com seu jeitinho doce, nos ajudou a conseguir. Obrigada.

Meus pais - quando iniciava os primeiros passinhos nas areias de Conceição da Barra, vocês já me encorajavam a superar os desafios da vida e a utilizar os tropeços como um trampolim para chegar mais longe. O que me tornei só foi possível por ser um pedacinho de vocês.

Meu esposo - amado e companheiro, você esteve comigo em momentos extremamente difíceis que transcorreram ao mesmo tempo desta tese e, apesar de tudo, você foi minha força. Amo você!

Meus irmãos - Juninho, nunca vou me esquecer daquele dia quando fui me matricular na Faculdade de Direito e você não permitiu. Olhe só aonde chegamos. Adriana, amada cunhada, o que seria de mim sem sua “ajudinha” com a informática? Fred, obrigada pelo carinho, alegria e, acima de tudo, pela paz que me trouxe em suas visitas. Aninha, minha cunhada tão querida, conseguimos rir muito decifrando o *endnote*. Irmãos, como vocês fazem a vida valer a pena!

Vovô Galdino e vovó Elisa - tudo começou com vocês e, hoje, fruto desse grande amor, nasceram filhos e agora netos, que se espelham em vocês a cada dia para dar orgulho a esses avós tão maravilhosos.

Aos amigos do IBCC - tantos amigos (Fernanda e Gislei, Noemi e Andréa, Vera e Marli, enfermeira Luciana, Janete), que foram fundamentais para que conseguisse esta vitória.

Aos amigos do Centro de Referência da Mulher - Prof. Dr. Luiz Henrique Gebrim, Prof. Dr. José Carlos Pascalicchio e Dr. Alisson Zanatta, por acreditaram em mim quando ainda não havia conquistado este título.

Aos amigos - que fiz durante o curso, pela verdadeira amizade que construímos e, em particular, àqueles que estavam sempre ao meu lado.

A todos, registro minha gratidão.

Resumo

Zaganelli FL. **Avaliação da linfangiogênese intratumoral em carcinoma precoce de colo de útero.** [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010. 97 p.

A incidência do câncer cervical permanece elevada em nosso país, provavelmente devido ao rastreamento ser realizado principalmente em áreas urbanas e haver áreas menos favorecidas onde os programas de rastreamento não são efetivos. É bem sabido que a mortalidade pelo câncer raramente é devida ao tumor primário, mas à disseminação metastática das células tumorais em órgãos distantes. A via linfática é considerada a preferencial para disseminação metastática nos tumores ginecológicos. E o estágio clínico e os linfonodos regionais são considerados os fatores prognósticos mais potentes no carcinoma de colo útero. A compreensão da linfangiogênese pode ser considerada uma importante chave na elucidação dos mecanismos usados pelas células tumorais na sua disseminação. Os objetivos do presente estudo são avaliar as características clínico-patológicas do câncer do colo do útero e sua associação com o comprometimento linfonodal e o desfecho; avaliar a linfangiogênese intratumoral pela análise quantitativa da microdensidade vascular linfática (MDVL), usando o método imunoistoquímico para marcação dos vasos linfáticos e três métodos morfométricos para a quantificação; determinar a associação entre a MDVL, características clínico-patológicas de apresentação, comprometimento linfonodal, desfecho e a expressão de podoplanina em células neoplásicas e a expressão da podoplanina em células fibroblásticas do estroma intratumoral. Os estudos sobre a MLVD em câncer de colo de útero são raros e controversos. Nossos resultados demonstraram que a MLVD foi mais acentuada nos tumores de menor tamanho (<2 cm), nos estádios iniciais (IB1), com menos infiltrações, sem comprometimento vascular e sem comprometimento linfonodal, provavelmente porque a indução da linfangiogênese pode ser um evento inicial na progressão do câncer, quando ainda nem todos os vasos neoformados estão funcionantes ou patentes. Isto explicaria a elevada MLVD nos tumores iniciais quando os linfonodos estavam frequentemente negativos. Observou-se que não houve associação significativa entre expressão de podoplanina em células neoplásicas e comprometimento vascular, comprometimento dos linfonodos ou desfecho. A expressão de podoplanina em fibroblastos do estroma intratumoral no câncer precoce de colo de útero está associada a melhor prognóstico. Até o presente, acredita-se que este seja o primeiro estudo a investigar o papel da expressão da podoplanina no estroma intratumoral de carcinoma precoce do colo do útero, relacionando-a com MLVD, comprometimento dos linfonodos e o desfecho.

Palavras-chave: Carcinoma do colo de útero. Histerectomia radical. Linfangiogênese. Podoplanina. Metástase neoplásica.

Zaganelli FL. **Evaluation of intratumoral lymphangiogenesis in early-stage carcinoma of the uterine cervix.** [Thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010. 97p.

Cervix carcinoma incidence remains still high in our country, probably as the screening occurrence is carried out mainly in the urban areas and there are less favored areas where the screening programs are not effective. It is well known that the cancer mortality is rarely caused by the primary tumor, but it is caused by the metastatic spread of tumor cells in distant organs. The lymphatic route is considered the choice for the metastatic dissemination in the gynecological tumors. And the clinical stage and the regional lymphonodes are considered the most powerful prognostic factors in the uterine cervix cancer. The understanding of the lymphangiogenesis can be considered an important key for the elucidation of the mechanisms used in the tumor cells dissemination. The current study objectives are to evaluate the clinic-pathological characteristics of the uterine cervix carcinoma and its association with the lymphnodal involvement and outcome; to evaluate the intratumoral lymphangiogenesis by the quantitative analysis of the lymphatic vessel micro density (LVMD), using the immunoistochemical method for marking the lymphatic vessels and three morphometric methods for the quantification. To determine the association between the LVMD, the clinic-pathological characteristics, the lymphnodal involvement and outcome and the podoplanin expression in neoplastic cells and in fibroblastic cells of the intratumoral stroma. Studies about the LVDM in uterine cervical cancer are rare and controversial. Our results demonstrated that the LVDM was more remarkable in the smaller tumors (<2cm), in the initial stages (IB1), with less infiltrations, with no vascular involvement and no lymphnodal involvement. Probably because the induction of lymphangiogenesis may be an early event in cancer progression, while still not all the newly formed vessels are functioning or patent. This would explain the high LVMD in the initial tumors while the lymphonodes were frequently negative. It was noted that there were no significant association between podoplanin expression in neoplastic cells and vessel involvement, lymphonodes involvement or outcome. Podoplanin expression in fibroblasts of the intratumoral stroma in early cervix carcinoma was associated to better prognosis. To date, it is believed that this is the first study to investigate the role of podoplanin expression in intratumoral stroma of cervix carcinoma, relating it to LVMD, lymph node involvement and outcome.

Keywords: Uterine cervix cancer. Radical hysterectomy. Lymphangiogenesis. Podoplanin. Neoplastic metastasis.

Lista de Abreviaturas e Siglas

ANOVA	Análise de variância
cAmp	AMP cíclico
CAPPesq	Comissão de Ética para Análises de Projetos de Pesquisa
CEL	Expressão da podoplanina em célula intratumoral
CLEC-2	Receptor-2 lecitina- <i>like</i> tipo C
DAB	3-3'-diaminobenzamida
DVL	Densidade linfovascular
DVP	Densidade vascular ponto
DVT	Densidade vascular traço
DVV	Densidade vascular vaso
EMT	Transição epitélio-mesenquimal
EVL	Embolização vascular linfática
FIGO	Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
GI	Grau de liberdade
IBCC	Instituto Brasileiro de Controle do Câncer
INCA	Instituto Nacional do Câncer
ITS	Estroma intratumoral
LMVD	Microdensidade densidade vascular linfática
LYVE 1	Receptor endotelial de vaso linfático (<i>lymphatic vessel endothelial receptor -1</i>)
MDVL	Microdensidade densidade vascular linfática
OMS	Organização Mundial da Saúde
p	Probabilidade de erro alfa
PBS	Tampão fosfato de sódio
pH	Potencial de Hidrogênio
PLAG	Agregação plaquetária
TMA	Microarranjo de tecidos
TTS	Tempo de sobrevida total
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular (<i>vascular endothelial</i>

growth factor)

VEGFR Receptor de crescimento endotelial vascular (*vascular endothelial growth factor receptor*)

Lista de Símbolos

H_2O_2	Água Oxigenada
%	Porcentagem
μm	Micrômetro
mm	Milímetro
\square^2	Qui-quadrado

Lista de Figuras

Figura 1	Instrumento de precisão para construção de microarranjos de tecidos, do fabricante <i>Beecher Instruments, Silver Spring, MD</i>	17
Figura 2	(A) Transferência do bloco doador, (B) Bloco receptor.....	17
Figura 3	144 casos tornaram-se apenas cinco lâminas de TMA.....	18
Figura 4	Bloco de TMA (A), corte histológico de TMA corado pela Hematoxilina-Eosina (B).....	19
Figura 5	Detalhe de um dos casos de (A) adenocarcinoma e (B) carcinoma de células escamosas, presentes em bloco de TMA.	19
Figura 6	Imunocoloração para podoplanina em vasos linfáticos intratumoral em caso de carcinoma de células escamosas.....	22
Figura 7	Expressão de podoplanina em células neoplásicas com mais intensidade de coloração na interface com o estroma intratumoral circunjacente (exame imunistoquímico, D2-40, aumento original 100X).....	22
Figura 8	Expressão forte de podoplanina em células fibroblásticas do estroma intratumoral (exame imunistoquímico, D2-40, aumento original 400X).....	23
Figura 9	Ki 67 positivo em > 50% das células neoplásicas em casos de adenocarcinoma grau I.....	24
Figura 10	(A) Quantificação da densidade vascular (DVL), (B) cálculo da DVL pelo método morfométrico de Weibel com graticulo 10 linhas e 10 pontos e (C) representação histológica da expressão da podoplanina em fibroblastos do estroma intratumoral.....	26

Lista de Gráficos

Gráfico 1	Curvas de sobrevida (Kaplan-Meyer) segundo o acometimento dos linfonodos, utilizando estatística de Breslow.	39
Gráfico 2	Correlação entre os resultados dos métodos para avaliação da densidade vascular.....	41

Lista de Tabelas

Tabela 1	Características clínico-patológicas de carcinomas de colo de útero submetidos a tratamento cirúrgico primário no período de 2000 a 2008.....	29
Tabela 2	Estadiamento clínico segundo o comprometimento dos linfonodo.....	30
Tabela 3	Estadiamento clínico segundo desfecho das pacientes.....	31
Tabela 4	Tipo histológico segundo o comprometimento dos linfonodos.....	31
Tabela 5	Tipo histológico segundo o desfecho das pacientes.....	32
Tabela 6	Distribuição do acometimento de paramétrio nos grupos.....	32
Tabela 7	Distribuição do acometimento de paramétrio segundo o desfecho das pacientes.....	33
Tabela 8	Distribuição do acometimento da vagina segundo o comprometimento dos linfonodos.....	33
Tabela 9	Distribuição do acometimento de vagina segundo o desfecho das pacientes.....	34
Tabela 10	Distribuição do acometimento do útero segundo o comprometimento dos linfonodos.....	34
Tabela 11	Distribuição do acometimento do útero segundo o desfecho das pacientes.....	35
Tabela 12	Distribuição do grau histológico segundo o comprometimento dos linfonodos.....	35
Tabela 13	Distribuição do grau histológico nos grupos segundo o desfecho das pacientes.....	36
Tabela 14	Distribuição do comprometimento vascular segundo o comprometimento dos linfonodos.....	36
Tabela 15	Distribuição do comprometimento vascular segundo o desfecho das pacientes.....	37
Tabela 16	Distribuição da expressão do Ki-67 segundo o acometimento	

dos linfonodos.....	37
Tabela 17 Distribuição da expressão do Ki-67 segundo o desfecho das pacientes.....	38
Tabela 18 Comparativo de médias segundo o comprometimento dos linfonodos.....	38
Tabela 19 Comparações das médias segundo o desfecho das pacientes...	39
Tabela 20 Associação entre comprometimento de linfonodos e desfecho das pacientes.....	40
Tabela 21 Distribuição conjunta da classificação entre os métodos DVV e DVP.....	42
Tabela 22 Distribuição conjunta da classificação entre os métodos DVV e DVT.....	42
Tabela 23 MDVL segundo a faixa etária das pacientes.....	43
Tabela 24 MDVL segundo o estadiamento clínico das pacientes.....	43
Tabela 25 MDVL segundo o tipo histológico.....	44
Tabela 26 MDVL e tamanho do tumor.....	44
Tabela 27 MDVL e acometimento de paramétrio.....	45
Tabela 28 MDVL e acometimento de vagina.....	45
Tabela 29 MDVL e acometimento de linfonodos.....	46
Tabela 30 MDVL e grau histológico.....	46
Tabela 31 MDVL e comprometimento vascular.....	47
Tabela 32 MDVL e profundidade de invasão.....	47
Tabela 33 MDVL e expressão do Ki-67.....	48
Tabela 34 MDVL e desfecho das pacientes.....	48
Tabela 35 Resultados do modelo para o desfecho, incluindo a MDVL.....	49
Tabela 36 Resultados do modelo para o desfecho.....	49
Tabela 37 Resultados do modelo para o acometimento dos linfonodos, incluindo a MDVL.....	50
Tabela 38 Resultados do modelo para o acometimento dos linfonodos.....	50
Tabela 39 MDVL e expressão de podoplanina em células neoplásicas.....	51
Tabela 40 MDVL e a expressão da podoplanina no estroma intratumoral....	51

Tabela 41	Expressão da podoplanina em células neoplásicas e comprometimento vascular.....	52
Tabela 42	Expressão da podoplanina em células neoplásicas e estado dos linfonodos.....	52
Tabela 43	Expressão da podoplanina em células neoplásicas e desfecho das pacientes.....	52
Tabela 44	Expressão da podoplanina em células neoplásicas e expressão da podoplanina no estroma intratumoral.....	53
Tabela 45	Resultados do ajuste do modelo saturado para a expressão da podoplanina no estroma.....	54
Tabela 46	Resultados do ajuste do modelo final para a expressão de podoplanina no estroma.....	54
Tabela 47	Expressão da podoplanina em células fibroblásticas do estroma intratumoral e comprometimento de linfonodos.....	54
Tabela 48	Expressão da podoplanina em células fibroblásticas do estroma intratumoral e desfecho.....	55
Tabela 49	Modelo inicial para acometimento de linfonodos incluindo expressão da podoplanina nas células neoplásicas.....	55
Tabela 50	Modelo final para previsão de acometimento de linfonodos.....	56
Tabela 51	Modelo inicial para acometimento dos linfonodos incluindo expressão da podoplanina no estroma intratumoral.....	56
Tabela 52	Modelo quase final para o acometimento dos linfonodos incluindo expressão da podoplanina no estroma intratumoral.....	57
Tabela 53	Modelo inicial para previsão do desfecho incluindo a expressão da podoplanina nas células neoplásicas.....	58
Tabela 54	Modelo final para o desfecho incluindo a expressão da podoplanina nas células neoplásicas.....	58
Tabela 55	Modelo inicial para previsão do desfecho incluindo a expressão da podoplanina no estroma intratumoral.....	59
Tabela 56	Modelo final para previsão de desfecho incluindo a expressão da podoplanina no estroma intratumoral.....	59

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	3
3 OBJETIVOS.....	13
4 CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	14
4.1 Casuística.....	14
4.2 Métodos.....	14
4.2.1 Análise dos prontuários.....	14
4.2.2 Método anatomopatológico.....	15
4.2.3 Construção dos blocos de microarranjos de tecidos (TMA).....	16
4.2.4 Técnica de imunistoquímica.....	19
4.2.5 Interpretação imunistoquímica.....	21
4.2.6 Método de avaliação da microdensidade vascular.....	24
4.3 Análise estatística.....	27
5 RESULTADOS.....	29
5.1 Análise comparativa dos grupos segundo o comprometimento dos linfonodos e desfecho.....	30
5.2 Comparação dos métodos de avaliação da linfangiogênese.....	41
5.3 Associações entre MDVL e características clínico-patológicas.....	43
5.4 Análise multivariada com inclusão da MDVL na previsão do desfecho das pacientes.....	48
5.5 Associação entre a MDVL e a expressão da podoplanina pelas células neoplásicas e células fibroblásticas do estroma intratumoral.....	50
5.6 Associação entre expressão de podoplanina em células neoplásicas com comprometimento vascular, acometimento de linfonodos e desfecho.....	51
5.7 Avaliação da expressão da podoplanina em células fibroblásticas do estroma intratumoral.....	53

¹ Este trabalho foi revisado de acordo com as novas regras ortográficas.

5.8 Análise multivariada incluindo a MDVL, expressão de podoplanina pelas células neoplásicas e em células fibroblásticas do estroma para previsão do acometimento dos linfonodos e no desfecho das pacientes.....	58
6 DISCUSSÃO.....	61
7 CONCLUSÕES.....	65
8 APÊNDICES E ANEXO.....	67
9 REFERÊNCIAS.....	71

Esta dissertação ou 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 de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

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

1. INTRODUÇÃO

O câncer de colo de útero é o segundo tipo de câncer mais comum entre mulheres em todo o mundo. A estimativa em 1990 foi de 371.200 casos novos de câncer invasivo de colo uterino em todo o mundo, quase 80% deles em países em desenvolvimento¹. No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA), em 2005, estimou a incidência de 22 casos para cada 100.000 mulheres, com a ocorrência de 20.690 casos novos e 8.000 mortes. Para 2008, a estimativa foi de 19,18 casos por 100.000^{2,3} e para o ano de 2010 foi de 18,47 casos por 100.000 mulheres⁴.

Apesar do câncer de colo uterino ser prevenível com rastreamento citológico, no Brasil a mortalidade por essa causa ainda é elevada, persistindo como problema de saúde pública⁵.

A metástase é considerada a principal causa de mortalidade em câncer, sendo o sistema linfático a principal via de disseminação para a maioria dos carcinomas, normalmente precedendo a via vascular. O acometimento dos linfonodos regionais em tumores sólidos é um marcador para disseminação, estágio avançado e pior prognóstico. A importância da metástase linfática é bem reconhecida no tratamento e estadiamento do câncer. O estado linfonodal determina a multimodalidade de tratamento em pacientes com tumores sólidos como câncer de mama, colorretal e de cabeça e pescoço. Nos carcinomas do colo uterino, o estado dos linfonodos pélvicos e para-aórticos é um dos fatores prognósticos mais importantes, ao lado do estadiamento clínico⁶⁻⁸.

O processo de metástase é bastante complexo e inclui modificações moleculares nas células neoplásicas que as capacitam para invasão do estroma local, entrada nos vasos linfáticos e implantação nos linfonodos regionais. Esse processo não é somente mecânico, mas envolve intrínsecas interações moleculares entre células neoplásicas, microambiente e sistema vascular linfático^{9,10}.

A invasão dos vasos linfáticos precede as metástases regionais, fazendo com que a identificação de comprometimento vascular em espécimes cirúrgicos seja de valor prognóstico e, em geral, associado a altas taxas de comprometimento linfonodal^{11,12}. A formação de novos vasos linfáticos - a linfangiogênese - está provavelmente relacionada à disseminação metastática¹³⁻¹⁵. Entretanto, sua avaliação em carcinomas do colo uterino foi pouco estudada e os resultados têm sido controversos^{16,17}.

Os mecanismos e o papel da linfangiogênese na disseminação regional ainda são pouco conhecidos, assim como a metodologia na sua avaliação, seja pela escolha do melhor marcador, seja pelo compartimento a ser avaliado (intra ou peritumoral)¹⁸⁻²⁰. O estroma intratumoral encerra muitos dos segredos das interações entre as células neoplásicas e o hospedeiro. Nele ocorre o fenômeno da linfangiogênese, além do trânsito de várias moléculas implicadas na interação entre neoplasia e hospedeiro.

Entre essas moléculas destaca-se a podoplanina, inicialmente pesquisada nos tecidos por ser um marcador específico de vasos linfáticos, mas que pode ser expressa em células neoplásicas e em células do estroma intratumoral^{10,19,21-24}. Já foi descrita sua presença em células neoplásicas, sobretudo escamosas, de várias localizações^{19,22,24,25}. Sua descrição no carcinoma escamoso cervical está limitada a raros trabalhos e com resultados controversos quanto ao seu significado^{16,21}.

Ainda mais controverso é o significado da expressão de podoplanina em células fibroblásticas do estroma intratumoral^{10,23}. No câncer do colo de útero seu significado ainda não foi investigado. Portanto, trata-se de um cenário em que a compreensão das características moleculares do complexo microambiente neoplásico relacionadas à linfangiogênese poderá resultar no desenvolvimento de estratégias para o controle da progressão tumoral²⁶⁻²⁸.

2. REVISÃO DA LITERATURA

O estágio clínico e o estado dos linfonodos regionais são considerados os fatores prognósticos mais potentes no carcinoma de colo útero. Outras variáveis histológicas também podem contribuir, tais como: o tipo histológico, grau de diferenciação, embolização linfática, nível de infiltração da parede cervical e o padrão de infiltração²⁹. O comprometimento vascular é a característica histológica com mais poder de previsão de linfonodos comprometidos²⁷ e o comprometimento linfonodal é o principal fator relacionado à sobrevida³⁰.

Compreender os mecanismos pelos quais as células neoplásicas atingem os linfonodos é de fundamental importância, pois nesses mecanismos pode estar a chave para intervenções terapêuticas^{22,23}. O conhecimento do sistema linfático nos tumores e da linfangiogênese é tema de muito interesse atual e motivou a realização do presente estudo.

A primeira descrição do sistema linfático foi feita em 1627, quando foram identificados os vasos linfáticos como sendo vaso leitoso (*milk vein*) no mesentério de um cachorro (*well-fed dog*). Na mesma época, foi descrita a circulação sanguínea³¹. Mesmo assim, passaram-se décadas para que se iniciasse a formulação de teorias sobre o desenvolvimento desses vasos.

O sistema linfático surge em torno da sexta ou sétima semana do desenvolvimento embrionário³², por volta de quatro semanas após o aparecimento dos primeiros componentes da circulação sanguínea.

A respeito da linfangiogênese, duas teorias foram propostas: centrífuga e centrípeta. A teoria mais aceita foi a descrita por Florence Sabin (1902), centrífuga, sugerindo que, precocemente, no desenvolvimento fetal, os sacos linfáticos primitivos seriam originados de

brotamento de células endoteliais a partir de veias do embrião. Segundo essa teoria centrífuga, os vasos linfáticos se espalhariam periféricamente pelos tecidos e órgãos e a partir desses sacos linfáticos primitivos dariam origem aos capilares linfáticos³³.

Já a teoria centrípeta, proposta por Huntington e McClure (1908), preconizava que os vasos linfáticos primitivos surgiam no mesênquima a partir de linfangioblastos, independentes das veias, crescendo centripetamente e estabelecendo conexões com as veias mais tardiamente³⁴.

Os vasos linfáticos são muito similares aos vasos sanguíneos, inclusive histologicamente. Devido a isto, a maioria dos estudos no passado envolveu principalmente pesquisas relacionadas à angiogênese (formação dos vasos sanguíneos) e abordou menos sobre linfangiogênese (formação dos vasos linfáticos). Mas com a recente descoberta de marcadores específicos de endotélio de vasos linfáticos, os estudos sobre os linfáticos estão despertando acentuado interesse³⁵.

O conceito inicial de propagação linfática do tumor indicava que a metástase de células tumorais ocorria unicamente a partir da invasão de vasos linfáticos preexistentes em áreas marginais ao tumor, isto é, o tumor não seria linfangiogênico. Foram observados agrupamentos de vasos linfáticos contendo células tumorais na periferia dos tumores, porém o mesmo não foi verificado no centro do tumor³⁶.

É necessária a preexistência de vasos linfáticos peritumorais para que as células tumorais metastatizem para outros locais³⁷. Estímulos moleculares específicos produzidos nos tumores induzem o sistema linfático preexistente a proliferar³⁸.

Há alguns anos, pesquisadores no assunto falharam ao tentarem identificar vasos linfáticos funcionantes dentro do tumor, direcionando a

suspeita de que a linfangiogênese poderia não ter importante papel na metástase tumoral^{39,40}.

Essa ideia foi sustentada por outros autores que, promovendo a injeção de substâncias dentro dos linfáticos, não detectaram qualquer tipo de sinal intrínseco proveniente dos vasos linfáticos dentro do tumor⁴¹.

No entanto, essa ausência de sinal poderia ter sido apenas reflexo, pelo fato de os vasos linfáticos estarem colabados dentro do tumor, conseqüente ao aumento de pressão e estresse mecânico gerado pelas células tumorais em proliferação. Sugeriu-se, ainda, a necessidade de haver dilatação e proliferação dos vasos linfáticos no estroma de tecidos tumorais para que houvesse produção de fatores de crescimento pelas células tumorais³⁸.

Entretanto, linfáticos preexistentes talvez precisassem ser estimulados pelas células tumorais a ponto de induzir a formação de novos vasos linfáticos pelo tumor. Esses estudos não conseguiram concluir se a passagem das células tumorais para os vasos linfáticos é um processo passivo ou ativo^{38,42}.

O interesse pelo estudo dos vasos linfáticos dentro dos tumores é recente^{36,38,39,43-46}, pois para vários autores, até há pouco tempo, os vasos linfáticos não eram considerados parte ativa e funcionante do estroma tumoral^{36,38,43,46}.

Avaliação de 97 pacientes com carcinoma escamoso de cabeça e pescoço salientou associação da densidade linfática intratumoral e pior prognóstico e recidiva. Enfatizou, também, que densidade linfática peritumoral estava associada à sobrevida favorável⁴⁷.

Estudo com 52 pacientes com carcinoma escamoso de cabeça e pescoço ressaltou que áreas com aumento da densidade linfática

peritumoral estavam associadas à metástase linfonodal, mas não houve correlação com sobrevida⁴⁸.

A densidade linfática intratumoral e também peritumoral associou-se à metástase de nódulo linfático. E alta densidade linfática intratumoral associou-se à baixa sobrevida total na pesquisa com 81 pacientes com carcinoma escamoso de cabeça e pescoço⁴⁹.

Foram acompanhados 45 pacientes com câncer de mama correlacionado a mais densidade de vaso linfático com invasão linfovascular, mas não com a sobrevida⁵⁰.

Apenas a minoria de 180 pacientes com câncer de mama apresentou linfáticos intratumorais, cuja densidade linfática peritumoral associou-se à metástase para nódulo linfático⁵¹.

Outros 113 pacientes também com câncer de mama apresentaram significativo aumento da densidade de vasos linfáticos associado a: metástase linfonodal, pior prognóstico e sobrevida livre de doença e presença do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF-C)⁵².

Ao acompanhar 202 pacientes com melanoma de pele, registrou-se aumento da densidade linfática peritumoral associada à melhora da sobrevida total e intervalo livre de doença⁵³.

Acentuada densidade linfática intratumoral foi constatada em 37 pacientes com melanomas. As metástases correlacionaram-se com curto intervalo livre de doença e menos sobrevida total⁵⁴.

Foi apurado também, em 44 pacientes com melanoma, aumento da densidade linfática ao redor do melanoma maligno comparado com derme normal, carcinoma basocelular e carcinoma de célula de Merkel. A densidade linfática pode diferenciar o melanoma que metastatizou daquele que não⁵⁵.

Observou-se em 45 pacientes com melanoma que densidade linfática peritumoral associou-se à metástase para linfonodo sentinela e a menos sobrevida total. Maior rede de linfáticos intratumorais prediz o *status* do gânglio linfático⁵⁶.

Representativa densidade de vasos linfáticos associou-se a significativo aumento da sobrevida em 85 pacientes com câncer cervical⁵⁷.

Alta densidade linfática intratumoral associou-se a metástase linfonodal e pior sobrevida total⁵⁸ em 111 pacientes com carcinoma precoce de colo de útero.

Estudo com 90 pacientes com câncer epitelial de ovário relatou que a densidade vascular linfática não se associou à sobrevida total ou sobrevida livre de progressão tumoral⁵⁹. Outro trabalho com 108 pacientes obteve os mesmos resultados⁶⁰.

Em 117 pacientes com câncer gástrico verificou-se que a densidade vascular linfática associou-se à metástase linfonodal e à pior sobrevida total⁶¹.

Há relato de que em carcinoma de células transicionais do trato urinário a densidade linfática intratumoral associou-se à sobrevida livre de doença e à sobrevida total⁶². Essa série abordou 125 indivíduos.

Alta densidade linfática peritumoral associou-se a metástase linfonodal e sobrevida total na casuística composta de 103 pacientes com câncer de pequenas células de pulmão⁶³.

VEGF-C e VEGF-D agem através do seu receptor fator de crescimento endotelial vascular receptor (VEGFR-3) e promovem metástases. Para que isso ocorra, não só deve ser considerada linfangiogênese intratumoral ou peritumoral, mas também outras alterações sutis na célula tumoral e sua interação com células endoteliais

linfáticas. O conhecimento dessas vias de sinalização poderá indicar terapias-alvo para inibição da metástase regional⁶⁰. Com o desenvolvimento da biologia molecular e celular, novos marcadores específicos para vasos linfáticos têm sido identificados.

O primeiro progresso real nos estudos da linfangiogênese foi a identificação dos fatores de crescimento de vasos endoteliais (VEGFs). Entre os fatores dessa família estão VEGF-C e VEGF-D, os quais, agora se sabe, são apenas ligantes. Atuam na linfangiogênese através de receptores com atividade tirosina-quinase, ativando o VEGFR-3, o qual é um receptor altamente expresso no endotélio dos vasos linfáticos e é considerado um marcador de vaso linfático⁶⁴⁻⁶⁹.

Nos últimos anos tem-se presenciado a identificação de marcadores específicos para endotélio de vasos linfáticos incluindo a podoplanina, uma mucoproteína presente nas membranas do podócitos glomerulares^{70,71}.

A avaliação da linfangiogênese se faz a partir da medida da microdensidade densidade vascular linfática (MDVL). Os primeiros estudos com determinação da MDVL usaram anticorpos diretamente contra os marcadores de células endoteliais⁷².

Secção imunoistoquímica em pequena magnificação em áreas de tecido com elevado número de vasos linfáticos fortemente marcados⁵² determinou a densidade vascular linfática ao contar todos os vasos de áreas imunoistoquimicamente marcadas com magnificação x200.

Até pouco tempo atrás a MDVL era escassamente avaliada nas amostras de lâminas de tumor, devido a não ser considerada confiável como marcador de vasos linfáticos em secções de parafina. Com o advento dos anticorpos contra VEGFR-3⁷³⁻⁷⁸, podoplanina^{50,57,59,79} e também o *lymphatic vessel endothelial receptor-1* (LYVE-1)⁸⁰, tornou-se possível avaliar a MDVL em tecidos embebidos em parafina.

A podoplanina foi identificada pela primeira vez em 1990, em célula osteoblástica de murinos MC3Y3-E1⁸¹. Mas sua identificação especificamente em células endoteliais linfáticas ocorreu em 1996⁸². Inicialmente foi designada com antígeno E11 e foi posteriormente chamada podoplanina devido à sua baixa expressão nos podócitos dos corpúsculos renais.

Podoplanina humana, também chamada T1a-2, aggrus ou gp36, é uma glicoproteína transmembrana tipo-1 de 38 KDa, com 162 aminoácidos, sendo nove destes pertencentes ao domínio intracelular²². Pode também ser chamada de aggrus devido à sua capacidade de induzir agregação plaquetária sem necessitar de componentes do plasma⁸³. Foi demonstrado que o anticorpo monoclonal 8F11 é capaz de inibir a agregação plaquetária *in vitro* e também a metástase pulmonar em ratos proveniente do carcinoma de cólon *in vivo*⁸⁴.

Reconhecida como uma sialoglicoproteína celular de superfície, pertence à família das glicoproteínas transmembrana tipo I sialomucina-like, com domínio extracelular rico em resíduos de serina e treonina, uma única porção transmembrana e pequena cauda citoplasmática, com sítios para proteína kinase C e fosforilação do AMP cíclico (cAMP)⁸³.

A podoplanina possui também uma estrutura *disialyl-core* no domínio agregação plaquetária (PLAG), o qual é necessário para que ela consiga se ligar ao seu receptor específico⁸⁵. O receptor-2 lecitina-like tipo C (CLEC-2) foi identificado como um receptor endógeno da podoplanina em plaquetas⁸⁶. No entanto, já se encontrou que a partir da deleção do mutante CLEC-2-Fc a inibição da podoplanina induzida pela agregação plaquetária indicaria que o CLEC-2 seria ligante fisiológico da podoplanina⁸⁵.

A associação entre CLEC-2 e podoplanina foi confirmada por meio de citometria de fluxo e reportou-se ser dependente do ácido siálico no o-

glycanos da podoplanina. O recombinante CLEC-2 é inibido pela agregação plaquetária, induzido pela expressão da podoplanina em células tumorais e células endoteliais linfáticas⁸⁶. Esses achados sugerem que o CLEC-2 é uma proteína fisiológica alvo da podoplanina e a interação entre os dois poderia regular a capacidade de invasão tumoral e metástase, o que seria potencial alvo terapêutico para as metástases. A expressão da podoplanina na superfície de células tumorais induziria a agregação plaquetária por interagir com CLEC-2. Foi demonstrado que o CLEC-2 Fc inibido induziria a podoplanina à agregação plaquetária⁸⁵.

Nos tecidos normais, a podoplanina é expressa nos podócitos renais⁷⁰, músculo-esquelético, placenta, pulmão e coração⁸⁷, miofibroblastos da mama e glândula salivar, osteoblastos e células mesoteliais⁸⁸. É também expressa na superfície apical de células alveolares tipo I de ratos⁸⁹. Ocasionalmente, pode ser observada a expressão da podoplanina em áreas focais circunscritas da camada basal da epiderme humana⁹⁰.

Em condições normais, a podoplanina é parte importante em prevenir adesão celular e está envolvida na regulação da forma dos pés dos podócitos e em manter a permeabilidade glomérulo⁹¹⁻⁹³.

Apesar da função fisiológica da podoplanina permanecer desconhecida, foi referido que a podoplanina está envolvida na formação dos vasos linfáticos, mas não influencia na formação dos vasos sanguíneos⁹⁴. Pesquisa em ratos deficientes de podoplanina evidenciou que esses animais apresentavam defeitos em vasos linfáticos, associados a: diminuição do transporte linfático, linfedema congênito e vasos linfáticos dilatados⁷⁰ e normalmente morriam ao nascimento por falência respiratória^{94,95}.

A expressão da podoplanina pode ser avaliada por imunistoquímica. O anticorpo que reconhece a podoplanina é o D2-40⁹⁶.

A podoplanina é um marcador específico do endotélio de vasos linfáticos e não é expresso em vasos sanguíneos. Isto é observado tanto no desenvolvimento quanto na maturação das células endoteliais linfáticas e parece ser o marcador mais específico para endotélio de vasos linfáticos⁹⁷.

A podoplanina marcada detecta pequenos vasos linfáticos a partir da coexpressão com VEGFR-3, assim como conglomerado de vasos linfáticos e sinusoides hepáticos, mas não detecta vasos linfáticos grandes nem vênulas endoteliais calibrosas dos nódulos linfáticos⁷⁰.

Por microscopia eletrônica e microscopia imunoeletrônica, foi demonstrado que a podoplanina é principalmente expressa na superfície luminal da célula endotelial linfática e raramente fora da superfície do lúmen ou lateralmente à célula ou em organelas citoplasmáticas das células endoteliais⁹⁸.

A podoplanina não é um marcador exclusivo de endotélio linfático. Em tecido humano normal, a podoplanina já foi demonstrada em podócitos, células osteoblásticas, osteócitos, queratinócitos basais, células epiteliais do plexo coroide, células epiteliais tipo I do timo, células mioepiteliais, células de reserva de glândula sebácea, miofibroblastos de próstata, células da granulosa do ovário, células dendríticas folicular e células alveolares^{82,90,99}.

Os vasos linfáticos neoformados podem ser peritumorais e intratumorais. Os vasos linfáticos peritumorais apresentam-se mais largos e irregulares do que os intratumorais e têm MDVL mais baixa⁹⁸. Os vasos linfáticos intratumorais são usualmente pequenos, aplainados e irregulares e ocasionalmente contêm células tumorais. Vários autores identificaram vasos que expressavam podoplanina em tumores malignos de estroma de ovário⁵⁵, colo do útero⁵⁷, pâncreas^{100,101} e mama⁵⁰.

No carcinoma de mama inflamatório, foi identificada a proliferação de células endoteliais tanto no tumor quanto em áreas peritumorais, com significativo aumento da positividade da podoplanina nos vasos linfáticos das áreas peritumorais¹⁸.

No colo do útero, em uma série de cones e histerectomias radicais, a podoplanina esteve expressa em 71% das amostras, focalmente, mas não intratumoral no tumor *Bulk* e esteve presente em 59% das amostras^{21,102}.

O uso de podoplanina como marcador de endotélio linfático mostrou que o aumento da densidade vascular linfática não influencia a progressão do câncer epitelial de ovário e foi associado a prognóstico favorável no câncer de colo de útero¹⁰³.

Estudando a expressão da podoplanina em 151 pacientes, constatou-se que o adenocarcinoma exibiu menos expressão quando comparado com o carcinoma de células escamosas e adenoescamoso, sem correlação positiva com invasão de nódulo linfático e/ou metástase à distância nem com recorrência tumoral¹⁶.

Os vasos linfáticos e/ou os fatores de crescimento linfangiogênicos são atraentes alvos terapêuticos quando se cogitam estratégias de tratamento para progressão tumoral e metástases. O uso de antipodoplanina como estratégia terapêutica pode ser sugerido no tratamento das metástases tumorais, baseado em quatro considerações: a) a podoplanina é um marcador conhecido de células endoteliais linfáticas; b) ela é expressa em células tumorais de vários tipos de cânceres humanos; c) seu aumento parece estar associado a mau prognóstico e alto risco de metástase para nódulo linfático; d) está envolvida no processo de invasão tumoral¹⁶.

3. Objetivos

Objetivo Primário

- Avaliar a linfangiogênese intratumoral a partir da análise quantitativa da microdensidade vascular linfática (MDVL) em carcinomas precoce de colo do útero submetidos a tratamento cirúrgico.

Objetivos Secundários

- Descrever as características clínico-patológicas de apresentação dos carcinomas de colo do útero (idade da paciente, estadiamento clínico, tamanho do tumor, tipo e grau histológico, atividade proliferativa, embolização vascular linfática, extensão parametrial, extensão vaginal) e sua associação com o comprometimento linfonodal e o desfecho.
- Determinar a associação entre a microdensidade vascular linfática (MDVL) e características clínico-patológicas de apresentação, comprometimento linfonodal, desfecho, expressão de podoplanina em células neoplásicas e em células fibroblásticas do estroma intratumoral.

4. Casuística e Métodos

4.1 Casuística

Este projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do Instituto Brasileiro de Controle do Câncer (IBCC) e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq) - protocolo nº 0729/08 (ANEXO A).

Foram avaliados pacientes com diagnóstico de carcinoma de células escamosas e adenocarcinoma primário de colo de útero tratadas no IBCC no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2008.

Foram incluídas somente as pacientes com diagnóstico histológico confirmado de carcinoma primário de colo do útero (carcinoma de células escamosas e adenocarcinoma) estádios I e II, submetidas ao tratamento cirúrgico com histerectomia radical e linfadenectomia pélvica, operadas sempre pela mesma equipe de cirurgiões dessa Instituição e que tivessem a totalidade do tumor excisada e linfonodos regionais, com blocos de parafina disponíveis. Foram excluídas as gestantes, as submetidas a qualquer forma de tratamento neoadjuvante radioterápico ou quimioterápico e as com carcinomatose.

4.2 Métodos

4.2.1 Análise dos prontuários

Trata-se de estudo prognóstico tipo coorte histórica com análise dos prontuários dos quais foram coletadas as seguintes informações: idade da paciente no momento do diagnóstico, estadiamento clínico segundo a Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO)¹⁰⁴, tipo de cirurgia realizada, tratamento adjuvante, tempo de seguimento e desfecho. Essas informações constam no APÊNDICE A.

Do laudo anatomopatológico foram recuperados os seguintes dados: tamanho do tumor, extensão para paramétrio, extensão para vagina e corpo do útero e número de linfonodos retirados e comprometidos.

Foram obtidos 144 casos que preencheram os critérios de inclusão e de exclusão propostos. Todos os dados obtidos do prontuário foram inseridos em planilha eletrônica (*Excel Microsoft Office 2007*).

4.2.2 Método Anatomopatológico

Todos os casos foram revisados inicialmente por uma patologista do Departamento de Patologia do Instituto Brasileiro de Controle do Câncer (IBCC), Dr^a. Eloá Muniz de Freitas Alves, que selecionou os cortes mais representativos dos tumores e avaliou:

- Tipo histológico segundo critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS)¹⁰⁵: carcinoma de células escamosas ou adenocarcinoma;
- grau histológico baseado na diferenciação celular (escamosa ou glandular), pleomorfismo nuclear e atividade mitótica: 1 (bem diferenciado), 2 (moderadamente diferenciado) e 3 (pouco diferenciado);

- comprometimento vascular peritumoral: avaliado na parede cervical circunjacente ao tumor;
- nível de infiltração da parede cervical em centímetros, medida desde o ponto de início da invasão estromal até o nível mais profundo de invasão.

Todos os casos foram revisados por um segundo patologista, Dr. Bernardo G. L. Almeida, e os episódios divergentes foram avaliados em conjunto com uma terceira patologista, Prof^a. Dr^a. Filomena M. Carvalho, do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os dados foram incluídos no banco de dados.

No Departamento de Patologia selecionou-se uma área representativa do tumor para construção de blocos de microarranjos de tecidos para os estudos imunoistoquímicos.

4.2.3 Construção dos blocos de microarranjos de tecidos (TMA)

O procedimento foi realizado na Consultoria em Patologia, Botucatu (SP), sob orientação dos Professores Carlos E. Bacchi (diretor da Consultoria em Patologia) e Filomena M. Carvalho (Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo). Foi retirado um cilindro de 2,0 mm da área selecionada do tumor, em cada bloco de parafina, designado bloco doador. Esses cilindros foram enxertados em um bloco de parafina receptor em linhas e colunas com intervalo de 1,0 mm entre cada cilindro, obedecendo à orientação de um mapa de planejamento previamente desenhado. Foi utilizado um instrumento de precisão para construção de TMA, do fabricante *Beecher Instruments*,

Silver Spring, MD, posicionado em bancada fixa para trabalho (Figuras 1 e 2).

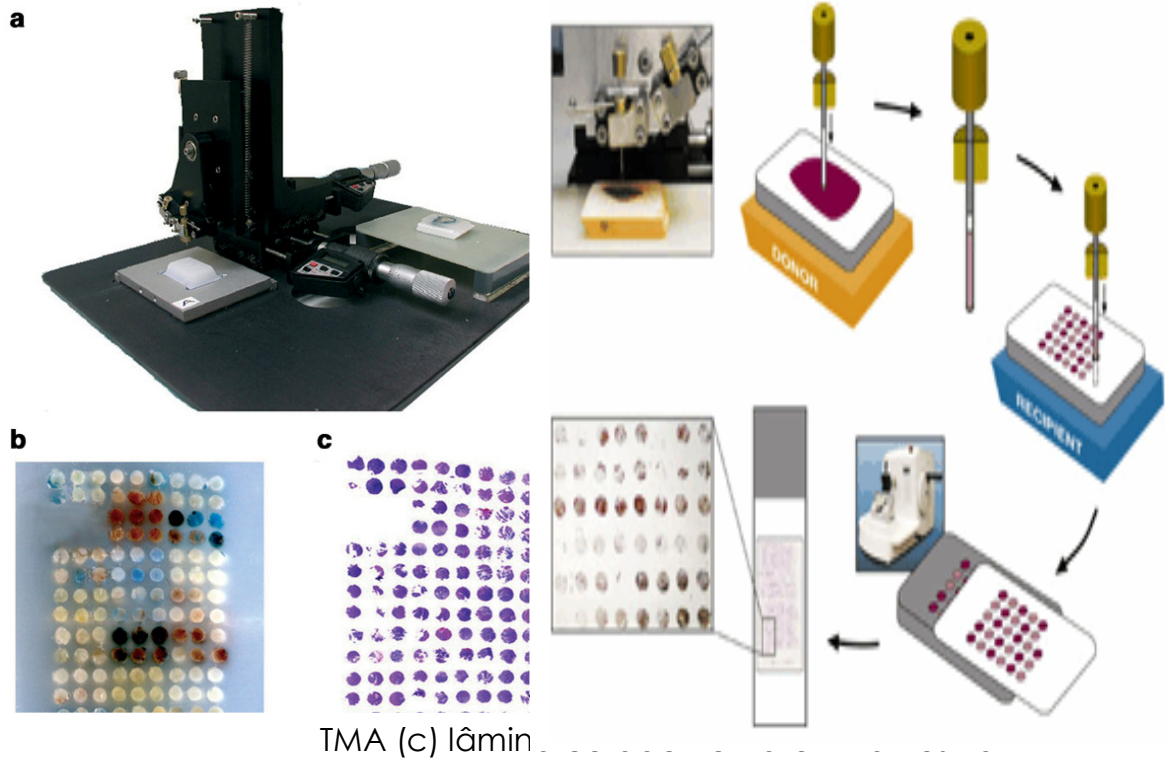


Figura 1 - Instrumento de precisão para construção de TMA, do fabricante Beecher Instruments, Silver Spring, MD.

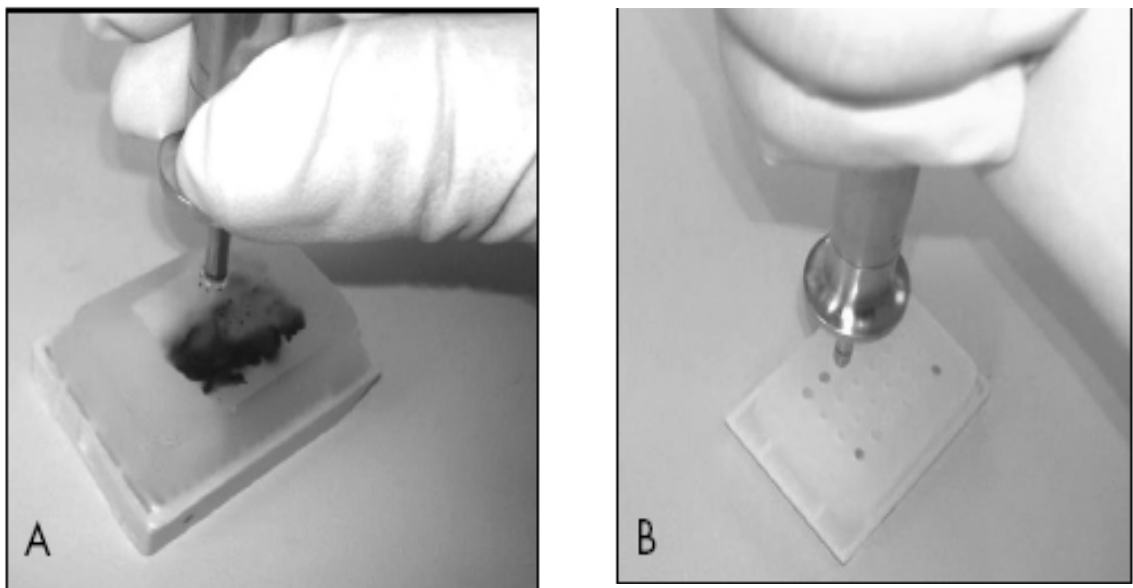


Figura 2 – (A) Transferência do bloco doador, (B) Bloco receptor.

Depois que os cilindros foram todos inseridos no bloco receptor, este foi aquecido por 10 minutos sob temperatura de 60°C. Os 144 blocos originais geraram cinco blocos de TMA (Figura 3). A seguir, foram cortadas fitas de 5 µm dos blocos em micrótomo convencional para confecção dos preparados histológicos, empregando-se lâminas apropriadas da marca *Starfrost*® slides, com técnica padronizada.



Figura 3 – 144 casos tornaram-se apenas cinco lâminas de TMA.

Os primeiros cortes histológicos foram corados pela técnica da Hematoxilina-Eosina (Figuras 4B e 5). A seguir, foram realizados os cortes histológicos para realização das reações imunoistoquímicas para podoplanina e proteína nuclear Ki-67 (Ki-67), sendo 15 casos convertidos para corte inteiro do bloco doador, devido à escassa representatividade do tumor no TMA.

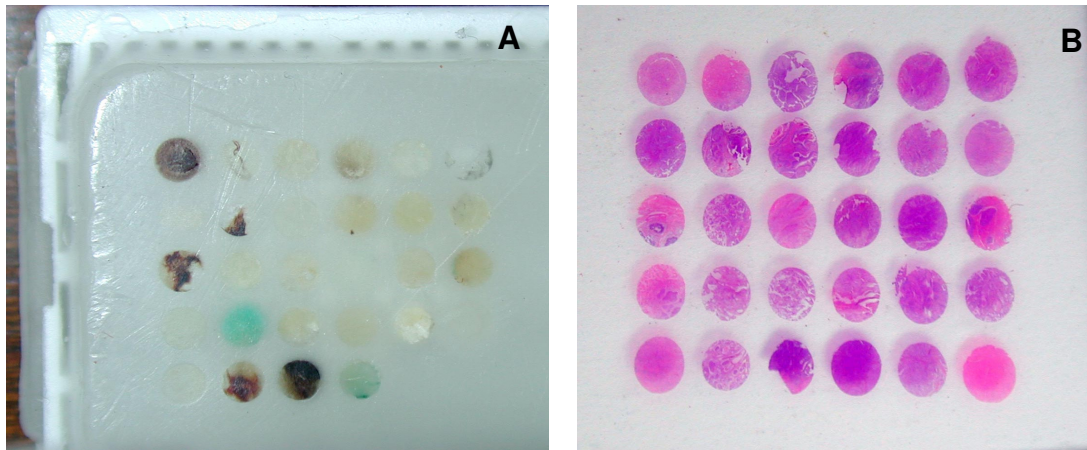


Figura 4 - Bloco de TMA (A), corte histológico de TMA corado com Hematoxilina-Eosina (B).

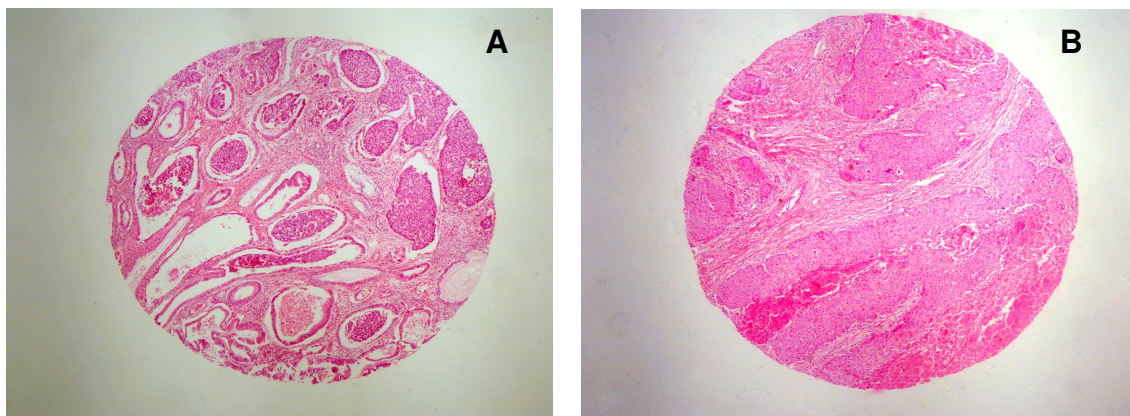


Figura 5 - Detalhe de um dos casos de (A) adenocarcinoma e (B) carcinoma de células escamosas, presentes em bloco de TMA.

4.2.4 Técnica de imunoistoquímica

Para a realização do exame imunoistoquímico, os cortes histológicos dos TMA, com espessura de 3 μm , foram estendidos em lâminas de vidro previamente tratadas pelo adesivo poli-D-lisina (*Sigma Chemical Corporation*, EUA), para evitar o descolamento dos mesmos durante a imunocoloração.

Os cortes foram mantidos em estufa por quatro horas e, a seguir, submetidos à desparafinização com quatro banhos sucessivos de xilol seguidos de passagem em álcool etílico-absoluto (quatro banhos),

lavagem com solução salina tamponada - tampão fosfato de sódio (PBS) e bloqueio da peroxidase endógena com solução de H₂O₂ a 3%.

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

- a) Ki-67: pelo calor em panela de pressão por oito minutos, com lâminas incubadoras em solução de ácido cítrico 0,21%, potencial de Hidrogênio (pH) 6,00.
- b) Podoplanina: pelo calor em forno de micro-ondas por 15 minutos, com lâminas incubadas em solução de ácido cítrico 0,21%, pH 6,00.

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

- a) Ki-67: clone MIB-1 (Ref. M7240-DAKO), diluição 1:4800;
- b) podoplanina: clone D2-40 (Ref. M3619-DAKO), diluição 1:400.

Após lavagem em PBS, as lâminas foram incubadas por 30 minutos com o anticorpo secundário, seguido pelo sistema de detecção com *NovoLink* polímero da Novocastra (Ref. 7161).

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

Nova lavagem em água corrente e água destilada foi feita e então os cortes foram contracorados pela Hematoxilina de Mayer e, a seguir, desidratados em cadeia crescente de etanóis, diafanizados em xilol,

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

4.2.5 Interpretação imunoistoquímica

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

A reação imunoistoquímica positiva para o anticorpo D2-40 foi considerada avaliando-se a expressão no citoplasma das células endoteliais (Figura 6) para a quantificação da angiogênese. Foram também consideradas as colorações no citoplasma de células neoplásicas (Figura 7) e no citoplasma de células estromais tipo fibroblásticas (Figura 8) para avaliação desses compartimentos. A positividade de podoplanina em células neoplásicas e em células do estroma foi considerada positiva quando a intensidade foi moderada a forte em mais de 10% das células.

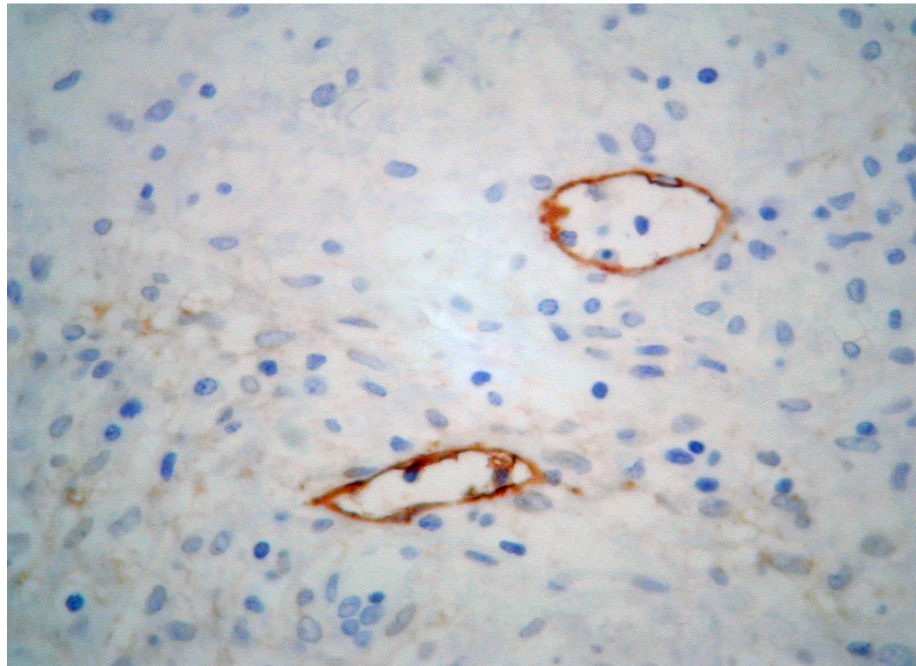


Figura 6 - Imunocoloração para podoplanina em vasos linfáticos intratumoral em caso de carcinoma de células escamosas.

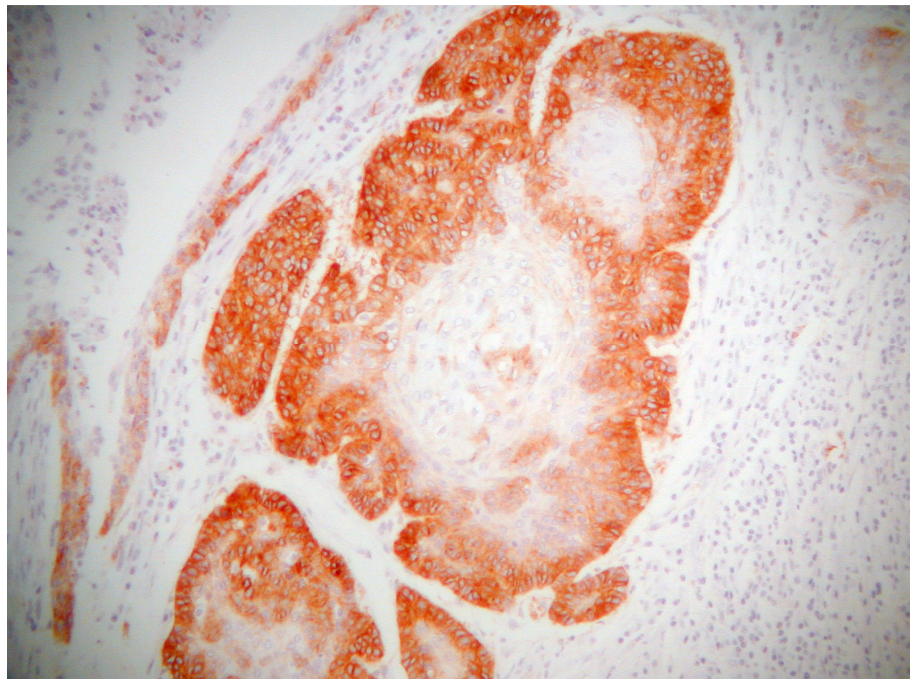


Figura 7 - Expressão de podoplanina em células neoplásicas com mais intensidade de coloração na interface com o estroma intratumoral circunjacente (exame imunoistoquímico, D2-40, aumento original 100X).

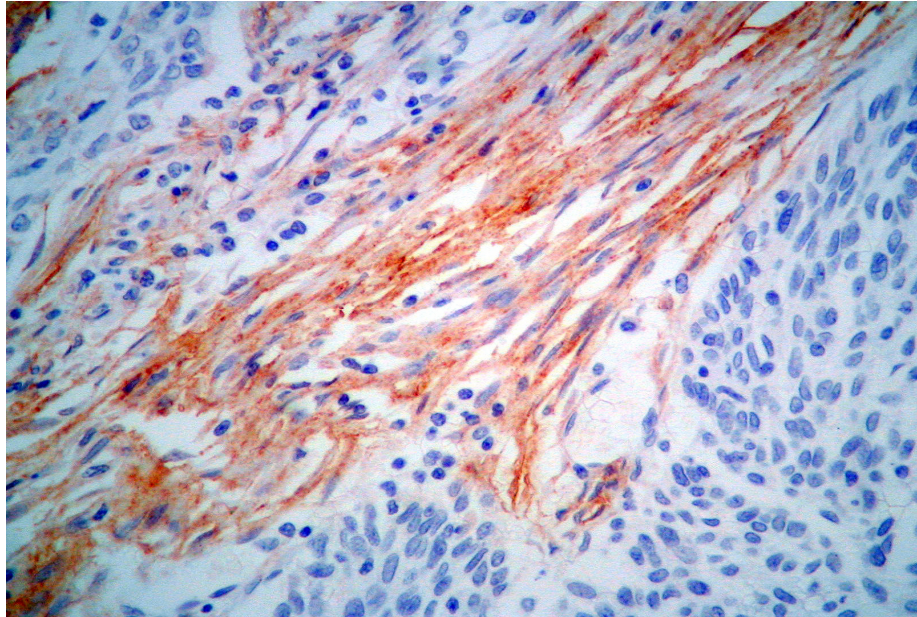


Figura 8 - Expressão forte de podoplanina em células fibroblásticas do estroma intratumoral (exame imunohistoquímico, D2-40, aumento original 400X).

A expressão de Ki-67 foi considerada positiva em núcleos das células neoplásicas (Figura 9) e sua avaliação foi semiquantitativa, baseada na porcentagem de células neoplásicas positivas, assim determinadas:

- <50% de células positivas;
- >50% de células positivas.

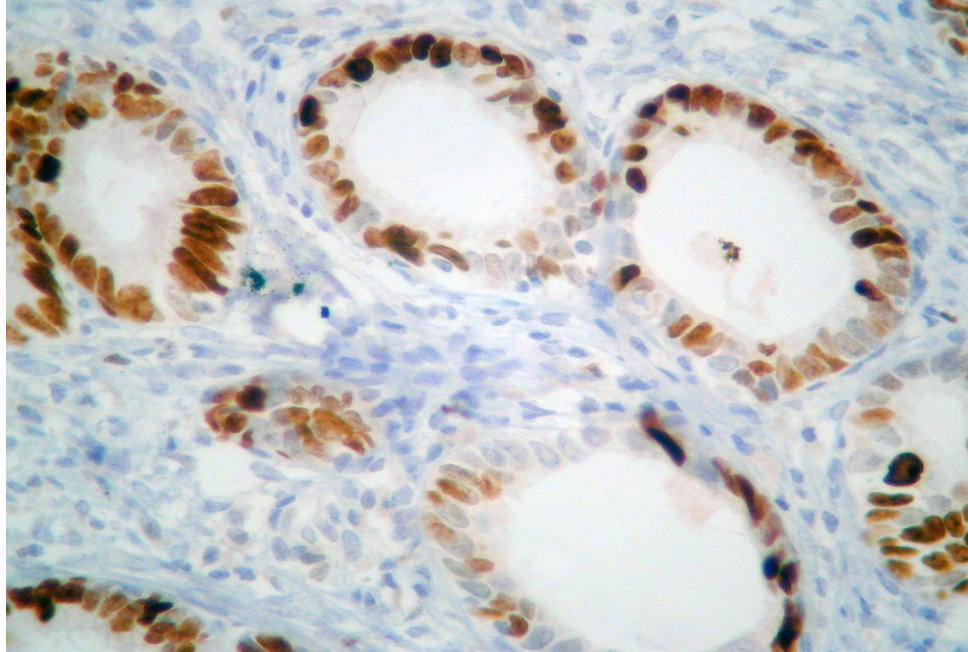


Figura 9 - Ki 67 positivo em > 50% das células neoplásicas em casos de adenocarcinoma grau I.

4.2.6 Método de avaliação da microdensidade vascular

A quantificação da MDVL foi baseada nos princípios de análise morfométrica descritos por Weibel¹⁰⁶. Os preparados foram examinados em microscópio óptico marca *Nikon* modelo *Alphaphot*, utilizando-se, para contagem, objetiva de 40x e ocular de 10x contendo graticulo de integração de 10 linhas e 100 pontos com aumento total de 400x (Figura 10).

Foram consideradas vasos linfáticos as estruturas coradas em marrom e com morfologia consistente com vaso, com ou sem lúmen. Foram selecionados os 10 campos do tumor com mais densidade vascular para as contagens. Foram empregados os seguintes métodos de avaliação:

- Densidade vascular avaliada por pontos incidentes em vasos (DVP): foram contados o número de pontos do graticulo coincidentes com vasos nos 10 campos selecionados e calculada a média.

- Densidade vascular avaliada por intersecções de linhas do graticulo com os vasos marcados (DVT): o número de intersecções das linhas com os vasos foi contado nos 10 campos e obtida a média.
- Densidade vascular avaliada pelo número de espaços vasculares (DVV): foram contados o número de vasos em cada campo e calculada a média nos 10 campos.

Para fins de análise estatística, a mediana dos resultados foi considerada a linha de corte entre a baixa e a alta densidade vascular, conforme a literatura¹⁰⁷.

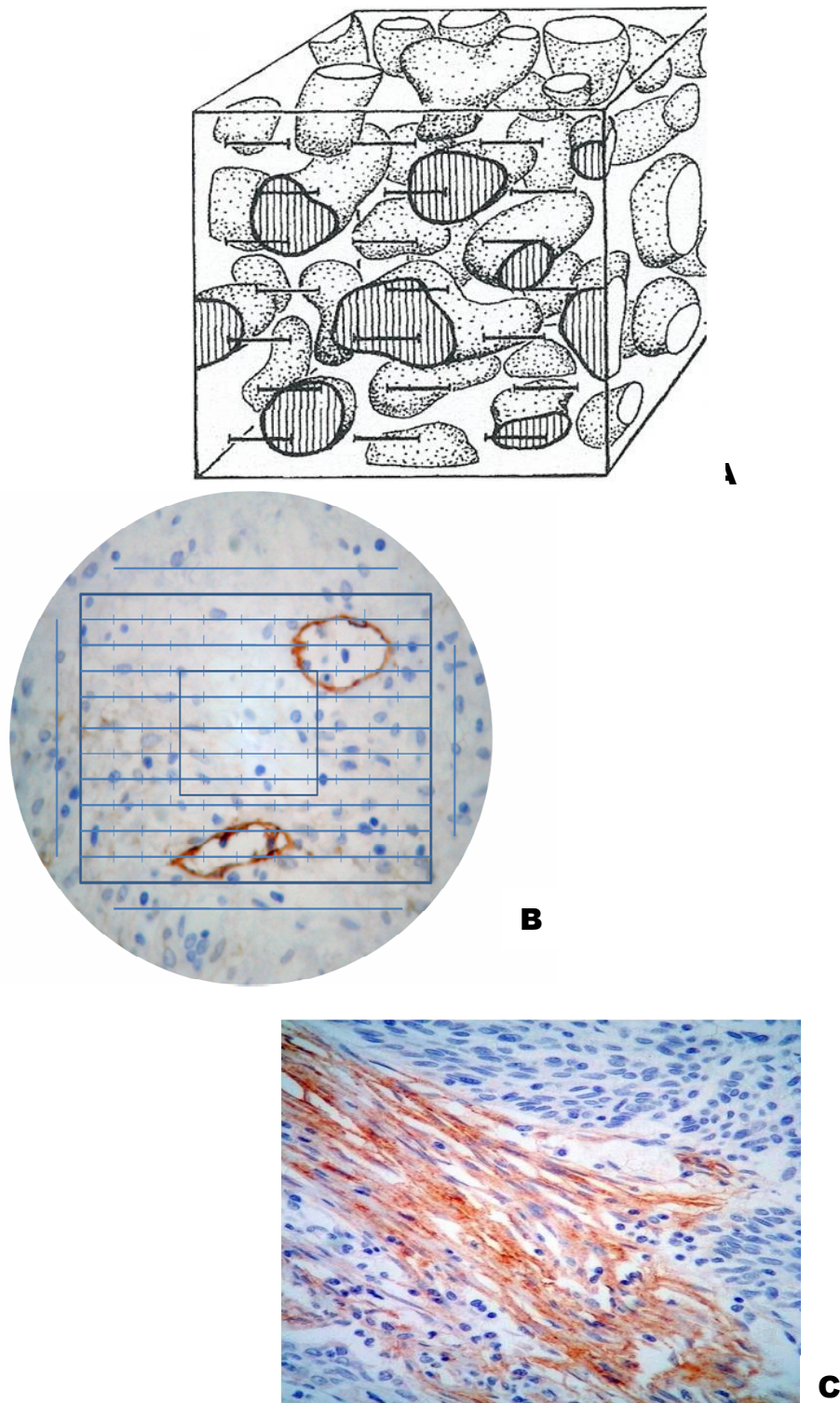


Figura 10 - (A) Quantificação da densidade vascular (DVL), (B) cálculo da DVL pelo método morfométrico de Weibel com graticulo 10 linhas e 10 pontos e (C) representação histológica da expressão da podoplanina em fibroblastos do estroma tumoral.

4.3 Análise estatística

A estatística descritiva abrangeu todas as variáveis, com a distribuição das frequências para as categóricas e intervalos, média e desvio-padrão para as numéricas.

Para análise de efeito dos grupos definidos segundo o desfecho e comprometimento dos linfonodos, foram elaboradas tabelas de contingência para as discretas. Para teste de associação foi empregado o teste Qui-quadrado com estatística de Person.

As médias dos grupos foram comparadas de acordo com a técnica de análise de variância (ANOVA) com estatística de F-Fischer.

A técnica de Kaplan e Meier ajustada com base na tábua de vida das pacientes foi aplicada na análise do tempo total de sobrevida (TTS).

Foi empregada a estatística de Breslow para comparação das curvas de sobrevida dos dois grupos pesquisados.

Os três métodos de avaliação da densidade vascular foram comparados calculando-se os coeficientes de correlação de Pearson.

Na avaliação da linfangiogênese com base nas medidas DVV, DVT DVP, a mediana de cada uma delas foi determinada e a partir delas os resultados foram classificados em alto (acima da mediana) e baixo (abaixo da mediana). Tabelas de contingência foram então criadas para avaliação da associação entre as classificações obtidas com essas três medidas; e a estatística Qui-quadrado de Person foi adotada nessas análises.

Modelo de regressão logística multinomial foi ajustado na análise da MDVL e da expressão de podoplanina em células fibroblásticas do

estroma, para verificar a associação com comprometimento linfonodal e desfecho.

Em todos os testes o nível de significância adotado foi de 5%. O nível descritivo associado a todas as estatísticas dos testes também foi calculado e apresentado.

5. RESULTADOS

As características clínico-patológicas da população estudada estão sumarizadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Características clínico-patológicas de carcinomas de colo de útero submetidos a tratamento cirúrgico primário no período de 2000 a 2008

Variáveis	Valores	N	%
Idade (anos)	20-83 (50,35±12,51)	144	
Estadiamento clínico	I B 1	84	58,33
	I B 2	44	30,56
	II A	16	11,1
Tamanho (cm)	0,2-10,0 cm (3,12±1,7 cm)	144	
	Até 2 cm	55	38,2
	2 a 3,9 cm	63	43,8
	>4 cm	26	18,1
Tipo histológico	Carcinoma céls escamosas	101	70,14
	Adenocarcinoma	43	29,86
Grau histológico	1	26	18,6
	2	84	60,0
	3	30	21,4
Profundidade de invasão (cm)	0,1-1,5 cm (0,81±0,38 cm)	144	78,5
	Até 1,0 cm	113	78,5
	>1,0 cm	31	21,5
Paramétrio	Não	133	92,4
	Sim	11	7,6
Vagina	Não	125	86,8
	Sim	19	13,2
Invasão do corpo do útero	Não	143	99,3
	Sim	1	0,7
Comprometimento vascular	Não	76	52,8
	Sim	68	47,2
KI-67	Até 50%	41	29,3
	>50%	99	70,7
Linfonodos pélvicos	Comprometidos	37	25,7
	Livres	107	74,3
Desfecho	Vivo	125	
	Morto	19	13,2%
Tempo de seguimento (anos)	0,67-12,25 (3,57 ± 2,06 anos)	144	
Tempo de sobrevivência (anos)	1-12 anos (3,52 ± 2,03anos)	144	

5.1 Análise comparativa dos grupos segundo o comprometimento dos linfonodos e desfecho

Na Tabela 2 compara-se o estadiamento clínico com o comprometimento dos linfonodos.

Tabela 2 - Estadiamento clínico segundo o comprometimento dos linfonodos

		Linfonodos regionais			
		Negativos	Positivos	Total	
Estádio clínico	IB1	n	64	20	84
		%	59,80%	54,10%	58,30%
	IB2	n	31	13	44
		%	29,00%	35,10%	30,6%
	II	n	12	4	16
		%	11,20%	10,80%	11,10%
Total	n	107	37	144	
	%	100,00%	100,00%	100,00%	

O teste de associação entre estadiamento clínico e comprometimento dos linfonodos teve estatística $\chi^2=0,502$, com $p=0,778$, indicando que as distribuições nos estádios foram equivalentes em ambos os grupos, independentemente do comprometimento dos linfonodos.

Na Tabela 3, a comparação do estadiamento clínico com o desfecho mostrou que no estágio IB2 houve mais óbitos (57,9%) quando comparado ao estágio IB1 (26,3%).

Tabela 3 - Estadiamento clínico segundo desfecho das pacientes

			Desfecho		Total
			Vivo	Morto	
Estádio clínico	IB1	n	79	5	84
		%	63,20%	26,30%	58,30%
	IB2	n	33	11	44
		%	26,40%	57,90%	30,60%
	IIA	n	13	3	16
		%	10,40%	15,80%	11,10%
Total	n	125	19	144	
	%	100,0%	100,0%	100,0%	

A estatística do teste de associação entre estadiamento clínico e desfecho foi $\chi^2= 9,632$, com $p=0,008$, evidenciando significativa associação.

Na Tabela 4, comparando o tipo histológico com o comprometimento de linfonodos, observou-se que o comprometimento dos linfonodos foi independente do tipo histológico.

Tabela 4 - Tipo histológico segundo o comprometimento dos linfonodos

			Linfonodos regionais		Total
			Negativos	Positivos	
Tipo histológico	Carcinoma de células escamosas	n	76	25	101
		%	71,00%	67,60%	70,10%
	Adenocarcinoma	n	31	12	43
		%	29,00%	32,40%	29,90%
	Total	n	107	37	144
		%	100,00%	100,00%	100,00%

O teste de associação entre tipo histológico e comprometimento dos linfonodos teve estatística $\chi^2=0,305$, com $p=0,851$, ressaltando-se que as distribuições dos tipos histológicos foram equivalentes em relação à condição dos linfonodos.

Na Tabela 5, comparando o tipo histológico com o desfecho, verificou-se que, do total de óbitos, 52,6% eram carcinomas de células escamosas e 47,40% eram adenocarcinomas. O teste de associação entre o tipo histológico e o desfecho teve estatística $\chi^2=2,313$, com $p=0,128$.

Tabela 5 - Tipo histológico segundo o desfecho das pacientes

				Desfecho		Total
				Vivo	Morto	
Tipo histológico	Carcinoma de células escamosas	n	91	10	101	
		%	72,80%	52,60%	70,10%	
	Adenocarcinoma	n	34	9	43	
		%	27,20%	47,40%	29,90%	
Total		n	125	19	144	
		%	100,0%	100,0%	100,0%	

Ao relacionar o comprometimento de paramétrio com linfonodos comprometido (Tabela 6), apurou-se que o acometimento de paramétrio foi mais frequente no grupo de pacientes com linfonodos comprometidos. O teste de associação entre acometimento de paramétrios e comprometimento dos linfonodos teve estatística $\chi^2=26,53$, com $p<0,001$.

Tabela 6 - Distribuição do acometimento de paramétrio nos grupos

				Linfonodos regionais		Total
				Negativos	Positivos	
Comprometimento dos paramétrios	Não	n	106	27	133	
		%	99,10%	73,00%	92,40%	
	Sim	n	1	10	11	
		%	0,90%	27,00%	7,60%	
Total		n	107	37	144	
		%	100,00%	100,00%	100,00%	

Na Tabela 7 relacionou-se o acometimento do paramétrio com o desfecho das pacientes e foram registrados 21,1% de mortes no grupo com comprometimento de paramétrio e 5,6% no grupo sem acometimento dos paramétrios. O teste de associação entre

acometimento de paramétrio e o desfecho da paciente teve estatística $\chi^2= 5,582$, com $p=0,018$.

Tabela 7 - Distribuição do acometimento de paramétrio segundo o desfecho das pacientes

				Desfecho		Total
				Vivo	Morto	
Acometimento paramétrio	Não	n	118	15	133	
		%	94,40%	78,90%	92,40%	
	Sim	n	7	4	11	
		%	5,60%	21,10%	7,60%	
	Total	n	125	19	144	
		%	100,0%	100,0%	100,0%	

Comparando o acometimento da vagina e o comprometimento dos linfonodos (Tabela 8), constataram-se 24,3 e 9,3%, respectivamente, em vagina comprometida e não comprometida. O teste de associação entre acometimento da vagina e comprometimento dos linfonodos teve estatística $\chi^2=5,385$, com $p=0,020$.

Tabela 8 - Distribuição do acometimento da vagina segundo o comprometimento dos linfonodos

				Linfonodos regionais		Total
				Negativos	Positivos	
Acometimento de vagina	Não	n	97	28	125	
		%	90,70%	75,70%	86,60%	
	Sim	n	10	9	19	
		%	9,30%	24,30%	13,20%	
	Total	n	107	37	144	
		%	100,00%	100,00%	100,00%	

Na correlação do acometimento da vagina com o desfecho das pacientes (Tabela 9), o desfecho foi independente do acometimento da vagina. O teste da associação entre acometimento da vagina e desfecho das pacientes teve estatística $\chi^2= 0,136$, com $p= 0,712$.

Tabela 9 - Distribuição do acometimento de vagina segundo o desfecho das pacientes

		Desfecho			
		Vivo	Morto	Total	
Acometimento de vagina	Não	n	108	17	125
		%	86,40%	89,50%	86,80%
	Sim	n	17	2	19
		%	13,60%	10,50%	13,20%
	Total	n	125	19	144
		%	100,0%	100,0%	100,0%

Não se verificou associação entre acometimento do corpo do útero com os linfonodos (Tabela 10). Não foi evidenciada diferença significativa nas distribuições do acometimento do corpo do útero nos grupos. A estatística do teste foi $\chi^2 = 0,312$, com $p = 0,577$.

Tabela 10 - Distribuição do acometimento do útero segundo o comprometimento dos linfonodos

		Linfonodos regionais			
		Negativos	Positivos	Total	
Comprometimento do corpo do útero	Não	n	107	36	143
		%	100,00%	97,30%	99,30%
	Sim	n	0	1	1
		%	0,00%	2,70%	0,70%
	Total	n	107	37	144
		%	100,00%	100,00%	100,00%

Da mesma maneira, o desfecho foi independente do acometimento do corpo do útero (Tabela 11).

Tabela 11 - Distribuição do acometimento do útero segundo o desfecho das pacientes

		Desfecho			
		Vivo	Morto	Total	
Comprometimento corpo do útero	Não	n	124	19	143
		%	99,20%	100,00%	99,30%
	Sim	n	1	0	1
		%	0,80%	0,00%	0,70%
	Total	n	125	19	144
		%	100,0%	100,0%	100,0%

Não foi realçada diferença significativa nas distribuições do acometimento do útero nos grupos. A estatística foi $\chi^2=0,312$, com $p=0,577$.

Ao relacionar o grau histológico com os linfonodos (Tabela 12), percebeu-se que o comprometimento dos linfonodos foi independente do grau histológico. Não se destacou diferença significativa nas distribuições do grau histológico nos grupos. A estatística do teste foi $\chi^2=2,663$, com $p=0,264$.

Tabela 12 - Distribuição do grau histológico segundo o comprometimento dos linfonodos

		Linfonodos regionais		Total	
		Negativos	Positivos		
Grau histológico	1	n	22	4	26
		%	21,40%	10,80%	18,60%
	2	n	58	26	84
		%	56,30%	70,30%	60,00%
	3	n	23	7	30
		%	22,30%	18,90%	21,40%
	Total	n	103	37	140
		%	100,00%	100,00%	100,00%

Na Tabela 13 o grau histológico relaciona-se com o desfecho das pacientes, não se ressaltando associação. Não foi referida diferença significativa nas distribuições do grau histológico nos desfechos e a estatística do teste foi $\chi^2= 3,738$, com $p=0,154$.

Tabela 13 - Distribuição do grau histológico nos grupos segundo o desfecho das pacientes

		Desfecho			
		Vivo	Morto	Total	
Grau histológico	1	n	25	1	26
		%	20,70%	5,30%	18,60%
	2	n	69	15	84
		%	57,00%	78,90%	60,00%
	3	n	27	3	30
		%	22,30%	15,80%	21,40%
Total	n	121	19	140	
	%	100,00%	100,00%	100,00%	

O comprometimento vascular associou-se fortemente ao comprometimento dos linfonodos (Tabela 14). O teste de associação entre o comprometimento vascular e o comprometimento dos linfonodos teve estatística $\chi^2=35,188$, com $p<0,001$.

Tabela 14 - Distribuição do comprometimento vascular segundo o comprometimento dos linfonodos

		Linfonodos regionais			
		Negativos	Positivos	Total	
Comprometimento vascular	Não	n	72	4	76
		%	67,30%	10,80%	52,80%
	Sim	n	35	33	68
		%	32,70%	89,20%	47,20%
	Total	n	107	37	144
		%	100,00%	100,00%	100,00%

A distribuição para o desfecho segundo o comprometimento vascular está demonstrada na Tabela 15. O comprometimento vascular foi 73,70% mais frequente no grupo de pacientes que foram a óbito. O teste de associação entre comprometimento vascular e comprometimento dos linfonodos teve estatística $\chi^2= 6,150$, com $p=0 013$.

Tabela 15 - Distribuição do comprometimento vascular segundo o desfecho das pacientes

		Desfecho			
		Vivo	Morto	Total	
Comprometimento vascular	Não	n	71	5	76
		%	56,80%	26,30%	52,80%
	Sim	n	54	14	68
		%	43,20%	73,70%	47,20%
	Total	n	125	19	144
		%	100,00%	100,00%	100,00%

A alta atividade proliferativa do tumor determinada pela expressão de Ki-67 acima de 50% não se relacionou com o comprometimento dos linfonodos (Tabela 16) nem com o desfecho (Tabela 17). A estatística do teste teve valor igual a $\chi^2=0,240$, com $p=0,624$. A distribuição do Ki-67 mostrou-se independente do comprometimento dos linfonodos. O teste de associação entre o marcador Ki-67 e o desfecho das pacientes teve estatística $\chi^2=1,745$, com $p=0,187$.

Tabela 16 - Distribuição da expressão do Ki-67 segundo o acometimento dos linfonodos

		Linfonodos		Total	
		Negativo	Positivo		
Ki 67	<50%	n	29	12	41
		%	28,20%	32,40%	29,30%
	>50%	n	74	25	99
		%	71,80%	67,60%	70,70%
Total	n	103	37	140	
	%	100,00%	100,00%	100,00%	

Tabela 17 - Distribuição da expressão do Ki-67 segundo o desfecho das pacientes

		Desfecho		Total	
		Vivo	Morto		
Ki 67	<50%	n	33	8	41
		%	27,30%	42,10%	29,30%
	>50%	n	88	11	99
		%	72,70%	57,90%	70,70%
Total		n	121	19	140
		%	100,00%	100,00%	100,00%

Ao comparar as médias de idade, tamanho do tumor e profundidade de infiltração com o comprometimento dos linfonodos, registrou-se que foram mais altas as médias de tamanho do tumor e nível de infiltração para o grupo com linfonodos comprometidos (Tabela 18).

Tabela 18 - Comparativo de médias segundo o comprometimento dos linfonodos

		N	Mé di a	Desvio	IC 95%		F- Fischer	p
					Inferior	Superior		
Tamanho (cm)	Negativos	107	2,84	1,6	2,53	3,15	11,702	0,001
	Positivos	37	3,91	1,74	3,33	4,49		
	Total	144	3,12	1,7	2,84	3,4		
Infiltração (cm)	Negativos	107	0,73	0,39	0,65	0,8	20,759	<0,001
	Positivos	37	1,04	0,26	0,95	1,12		
	Total	144	0,81	0,38	0,74	0,87		
Idade (anos)	Negativos	107	50,28	11,41	48,09	52,47	0,014	0,905
	Positivos	37	50,57	15,42	45,43	55,71		
	Total	144	50,35	12,51	48,29	52,41		

Na Tabela 19 apresentam-se as comparações das médias do tamanho do tumor, profundidade de invasão e idade das pacientes, segundo o desfecho. Observou-se que o tamanho do tumor foi maior no grupo de pacientes que foram a óbito. O nível de profundidade de infiltração da parede foi mais alto no grupo que foi a óbito, embora a diferença não tenha atingido nível de significância.

Tabela 19 - Comparações das médias segundo o desfecho das pacientes

		N	Média	Desvio	IC 95%		F-Fischer	p
					Inferior	Superior		
Tamanho (cm)	Vivo	125	2,93	1,55	2,66	3,21	11,801	0,001
	Morto	19	4,32	2,12	3,3	5,34		
	Total	144	3,12	1,7	2,84	3,4		
Infiltração	Vivo	125	0,79	0,39	0,72	0,85	3,007	0,085
	Morto	19	0,95	0,3	0,8	1,09		
	Total	144	0,81	0,38	0,74	0,87		
Idade	Vivo	125	50,22	11,99	48,09	52,34	0,115	0,705
	Morto	19	51,26	15,85	43,62	58,9		
	Total	144	50,35	12,51	48,29	52,41		

No Gráfico 1 apresentam-se as curvas de sobrevivência e o resultado do teste comparativo das mesmas segundo o comprometimento dos linfonodos. As pacientes que não tiveram linfonodos comprometidos tiveram maior sobrevivência (10,76 anos).

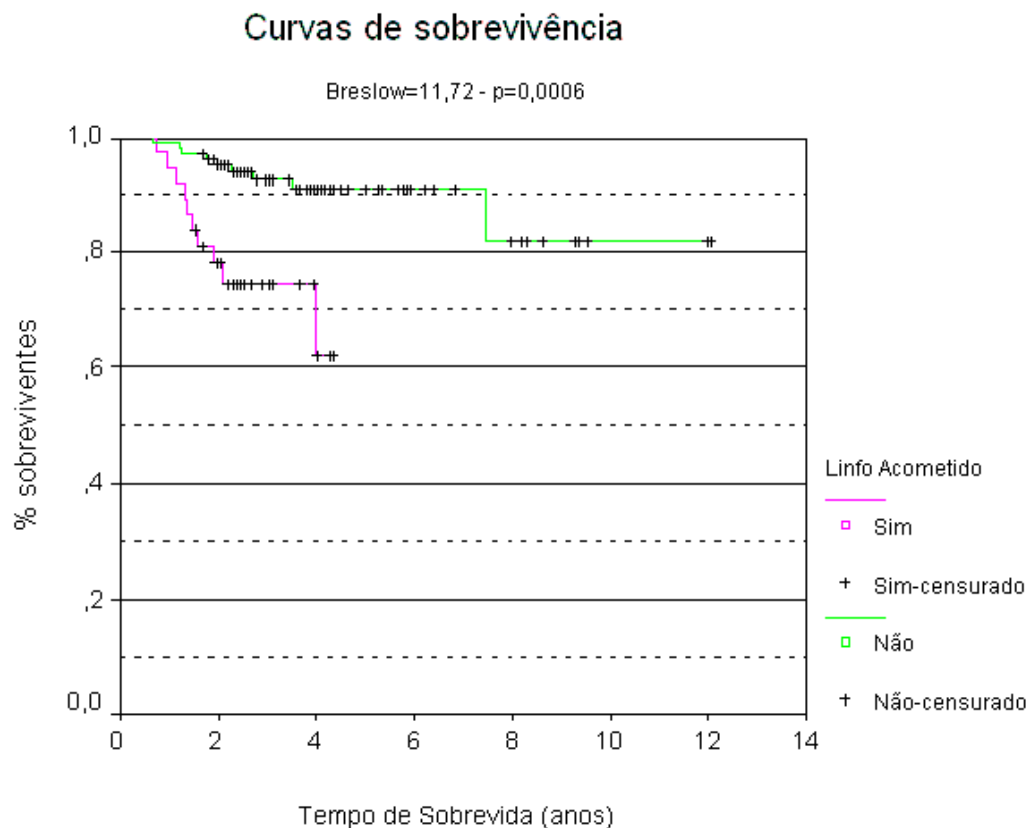


Gráfico 1 - Curvas de sobrevivência (Kaplan-Meier) segundo o acometimento dos linfonodos, utilizando estatística de Breslow.

Com base nesse teste comparativo, pôde-se concluir que as curvas de sobrevivência dos dois grupos são distintas. A estatística de Breslow teve nível descritivo igual a $p=0,0006$, indicando que o comprometimento dos linfonodos se associou à redução da sobrevida.

Nota-se que o tempo médio de sobrevida para o grupo com linfonodos comprometidos foi igual a 3,57 anos, com intervalo de confiança 95% igual a [3,14 ---- 3,99 anos]; e para o grupo com linfonodos não comprometidos foi igual a 10,76 anos, com intervalo de confiança 95% igual a [9,79 ---- 11,72 anos].

Quando foram associados os grupos linfonodos positivos e negativos ao desfecho das pacientes, detectou-se taxa de óbito mais alta no grupo de linfonodos positivos (10/27) do que no grupo com linfonodos negativos (9/98). No grupo de pacientes que foram a óbito, 52,6% tinham linfonodos positivos, enquanto no grupo de pacientes vivas a porcentagem foi de 21,60% (Tabela 20).

Tabela 20 - Associação entre comprometimento de linfonodos e desfecho das pacientes

		Desfecho		Total	
		Vivo	Morto		
Linfonodos positivos	Não	n	98	9	107
		%	78,40%	47,40%	74,30%
	Sim	n	27	10	37
		%	21,60%	52,60%	25,70%
	Total	n	125	19	144
		%	100,0%	100,0%	100,0%

A associação foi significativa, a estatística do teste foi $\chi^2=6,773$, com $p=0,009$.

5.2 Comparação dos métodos de avaliação da linfangiogênese

Foram comparados três métodos de avaliação da microdensidade vascular: DVV, DVT e DVP. Calcularam-se os coeficientes de correlação de Pearson, cujos resultados podem ser observados no Gráfico 2.

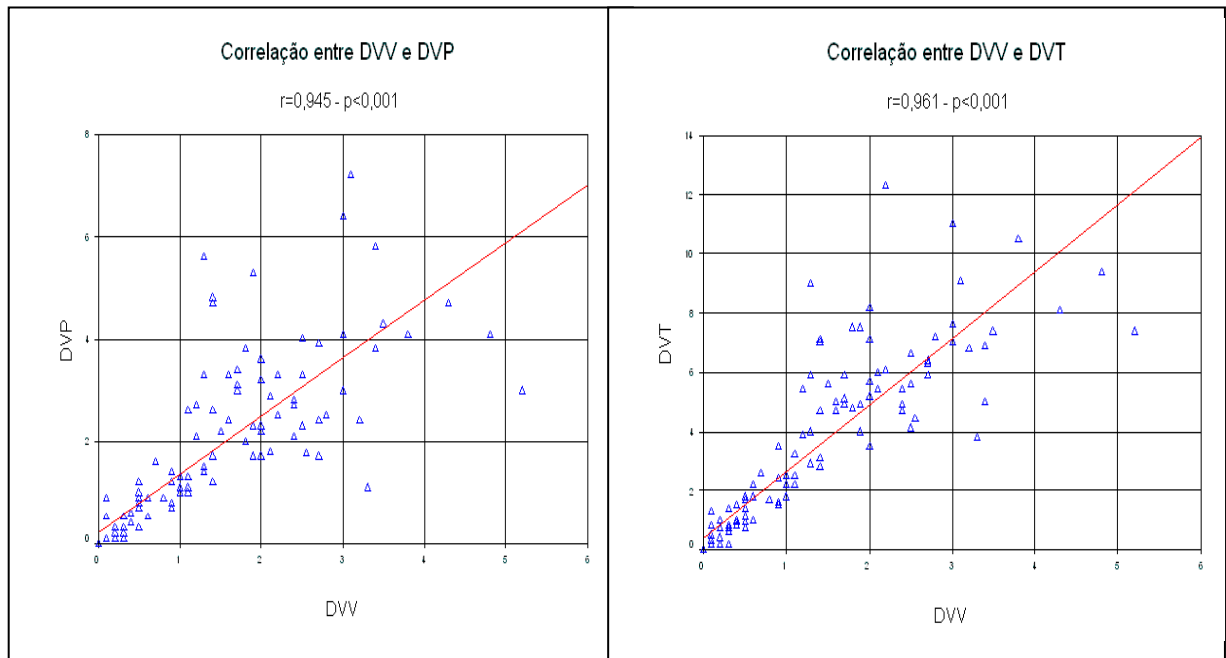


Gráfico 2 - Correlação entre os resultados dos métodos para avaliação da densidade vascular.

O método DVV apresentou correlações diretas, positivas, elevadas e significativas com os métodos DVT e DVP, caracterizando a equivalência entre os três métodos.

Na categorização da MDVL em alta e baixa, segundo o valor de corte na mediana, foram elaboradas as Tabelas 21 e 22 com as distribuições conjuntas dos métodos.

Tabela 21 - Distribuição conjunta da classificação entre os métodos DVV e DVP

		DVV			
		Baixo	Alto	Total	
DVP	Baixo	n	69	6	75
		%	97,20%	8,30%	52,40%
	Alto	n	2	66	68
		%	2,80%	91,70%	47,60%
	Total	n	71	72	143
		%	100,0%	100,0%	100,0%

*DVP = Densidade vascular ponto dentro do vaso.

**DVV= Densidade vascular por contagem direta de número de vasos por campo.

A concordância dos resultados da classificação pelos métodos foi avaliada com base na estatística *Kappa*, que teve valor $k=0,888$, com $p<0,001$.

Tabela 22 - Distribuição conjunta da classificação entre os métodos DVV e DVT

		DVV			
		Baixo	Alto	Total	
DVT	Baixo	n	69	3	72
		%	97,20%	4,20%	50,30%
	Alto	n	2	69	71
		%	2,80%	95,80%	49,70%
	Total	n	71	72	143
		%	100,0%	100,0%	100,0%

*DVT= Densidade vascular traço cortando vaso.

**DVV= Densidade vascular por contagem direta de número de vasos por campo.

A concordância dos resultados da classificação pelos métodos foi avaliada com base na estatística *Kappa*, que teve valor $k=0,930$, com $p<0,001$.

Assim, confirmou-se o alto nível de concordância entre os três métodos e optou-se pelo método DVV para avaliação da MDVL neste estudo, classificado em alto ou baixo (conforme acima ou abaixo da mediana).

5.3 Associações entre MDVL e características clínico-patológicas

Na Tabela 23 pode-se observar que a MDVL pode ser considerada independente da faixa etária. A estatística do teste foi $\chi^2= 0,001$, com $p=0,975$.

Tabela 23 - MDVL segundo a faixa etária das pacientes

		MDVL		Total	
		Baixo	Alto		
Faixa etária	Até 35 anos	n	9	8	17
		%	12,70%	11,10%	11,90%
	>35 anos	n	62	64	126
		%	87,30%	88,90%	88,10%
	Total	n	71	72	143
		%	100,00%	100,00%	100,00%

A associação entre MDVL e estadiamento clínico das pacientes pode ser visualizada na Tabela 24. A MDVL foi mais alta no estágio clínico IB1. A estatística do teste foi $\chi^2=14,435$, com $p=0,001$.

Tabela 24 - MDVL segundo o estadiamento clínico das pacientes

		MDVL		Total	
		Baixo	Alto		
Estádio clínico	IB1	n	30	53	83
		%	42,30%	73,60%	58,00%
	IB2	n	30	14	44
		%	42,30%	19,40%	30,80%
	IIA	n	11	5	16
		%	15,50%	6,90%	11,20%
	Total	n	71	72	143
		%	100,00%	100,00%	100,00%

Não foi detectada associação significativa entre MDVL e o tipo histológico. A estatística do teste teve valor $\chi^2= 0,615$, com $p=0,433$.

Tabela 25 – MDVL segundo o tipo histológico

			MDVL		Total
			Baixo	Alto	
Tipo histológico	Carcinoma de células escamosas	n	47	53	100
		%	66,20%	73,60%	69,90%
	Adenocarcinoma	n	24	19	43
		%	33,80%	26,40%	30,10%
Total		n	71	72	143
		%	100,00%	100,00%	100,00%

Verificou-se, pela Tabela 26, a associação entre tamanho do tumor e MDVL. A alta MDVL se associou aos menores tumores. A estatística do teste foi $\chi^2=18,116$, com $p<0,001$.

Tabela 26 - MDVL e tamanho do tumor

			MDVL		Total
			Baixo	Alto	
Tamanho	Até 2,0 cm	n	17	38	55
		%	23,90%	52,80%	38,50%
	2 a 4 cm	n	33	29	62
		%	46,50%	40,30%	43,40%
	>4,0 cm	n	21	5	26
		%	29,60%	6,90%	18,20%
Total		n	71	72	143
		%	100,00%	100,00%	100,00%

A distribuição conjunta de MDVL e acometimento de parâmetro não apresentou associação entre eles. A estatística do teste foi $\chi^2=1,639$, com $p=0,201$.

Tabela 27 - MDVL e acometimento de paramétrio

		MDVL			
		Baixo	Alto	Total	
Acometimento de paramétrio	Não	n	63	69	132
		%	88,70%	95,80%	92,30%
	Sim	n	8	3	11
		%	11,30%	4,20%	7,70%
Total	n	71	72	143	
	%	100,00%	100,00%	100,00%	

A MDVL pode ser considerada independente do acometimento da vagina. Isso pode ser percebido na Tabela 28, que exibe a distribuição conjunta de ambos. A estatística do teste foi $\chi^2=0,049$, com $p=0,826$.

Tabela 28 - MDVL e acometimento de vagina

		MDVL			
		Baixo	Alto	Total	
Acometimento de vagina	Não	n	63	62	125
		%	88,70%	86,10%	87,40%
	Sim	n	8	10	18
		%	11,30%	13,90%	12,60%
	Total	n	71	72	143
		%	100,00%	100,00%	100,00%

Na Tabela 29 demonstra-se a distribuição da MDVL segundo o acometimento dos linfonodos. A MDVL apresentou associação significativa com o acometimento dos linfonodos e a estatística do teste de associação foi $\chi^2=3,837$, com $p=0,050$. Alta MDVL se associou a linfonodos negativos.

Tabela 29 - MDVL e acometimento de linfonodos

		MDVL			
		Baixo	Alto	Total	
Linfonodos acometidos	Não	n	47	59	106
		%	66,20%	81,90%	74,10%
	Sim	n	24	13	37
		%	33,80%	18,10%	25,90%
	Total	n	71	72	143
		%	100,00%	100,00%	100,00%

A distribuição da MDVL segundo o grau histológico não ressaltou sua associação com o grau histológico (Tabela 30). A estatística do teste foi $\chi^2=1,599$, com $p=0,450$.

Tabela 30 - MDVL e grau histológico

		MDVL			
		Baixo	Alto	Total	
Grau histológico	1	n	14	12	26
		%	19,70%	17,60%	18,70%
	2	n	39	44	83
		%	54,90%	64,70%	59,70%
	3	n	18	12	30
		%	25,40%	17,60%	21,60%
	Total	n	71	68	139
		%	100,00%	100,00%	100,00%

Na Tabela 31 salienta-se a distribuição do comprometimento vascular segundo a MDVL. Esta apresentou associação inversa significativa com o comprometimento vascular. A estatística do teste foi $\chi^2=11,756$, com $p<0,001$.

Tabela 31 - MDVL e comprometimento vascular

		MDVL			Total
		Baixo	Alto		
Comprometimento vascular	Não	n	27	48	75
		%	38,00%	66,70%	52,40%
	Sim	n	44	24	68
		%	62,00%	33,30%	47,60%
	Total	n	71	72	143
		%	100,00%	100,00%	100,00%

Na distribuição da profundidade de invasão em função da MDVL (Tabela 32), a infiltração mais profunda se relacionou com menos densidade vascular linfática. A estatística do teste foi $\chi^2=6,147$, com $p=0,007$.

Tabela 32 - MDVL e profundidade de invasão

		MDVL			Total
		Baixo	Alto		
Profundidade de invasão	Até 1,0 cm	n	49	63	112
		%	69,00%	87,50%	78,30%
	>1,0 cm	n	22	9	31
		%	31,00%	12,50%	21,70%
	Total	n	71	72	143
		%	100,00%	100,00%	100,00%

Pôde-se constatar, a partir da Tabela 33, a distribuição da MDVL segundo o Ki-67. Não se enfatizou associação entre ambos. A estatística do teste foi $\chi^2=0,336$, com $p=0,562$.

Tabela 33 - MDVL e expressão do Ki-67

		MDVL			
		Baixo	Alto	Total	
Ki 67	<50 %	n	23	18	41
		%	32,40%	26,50%	29,50%
	>50%	n	48	50	98
		%	67,60%	73,50%	70,50%
Total	n	71	68	139	
	%	100,00%	100,00%	100,00%	

Apresenta-se na Tabela 34 a distribuição da MDVL segundo o desfecho das pacientes. Houve forte indício de associação inversa entre MDVL e óbito. A estatística do teste foi $\chi^2=3,088$, com $p=0,079$.

Tabela 34 - MDVL e desfecho das pacientes

		MDVL			
		Baixo	Alto	Total	
Desfecho	Vivo	n	58	66	124
		%	81,70%	91,70%	86,70%
	Morto	n	13	6	19
		%	18,30%	8,30%	13,30%
Total	n	71	72	143	
	%	100,00%	100,00%	100,00%	

5.4 Análise multivariada com inclusão da MDVL na previsão do desfecho das pacientes

O resultado do modelo ajustado para o desfecho das pacientes, incluindo múltiplas variáveis e a MDVL, está demonstrado na Tabela 35. O ajuste do modelo saturado revelou que a MDVL não apresentou contribuição significativa para o desfecho.

Tabela 35 - Resultados do modelo para o desfecho, incluindo a MDVL

Variável	Qui-quadrado	gl**	p
MDVL	0,05	1	0,820
Estadiamento clínico	4,61	2	0,100
Tipo histológico	7,46	1	0,006
Infiltração da parede cervical	0,2	1	0,655
Comprometimento vascular	0,99	1	0,320
Acometimento de linfonodos	2,09	1	0,148
Paramétrio comprometido	0,01	1	0,936
Vagina comprometida	0,65	1	0,422
Grau histológico	7,36	2	0,025
Ki-67	2,09	1	0,148
Tamanho	0,16	2	0,926

** gl = graus de liberdade da estatística (apresentados quando diferentes de 1).

* MDVL avaliada pelo método DVV (contagem de número de vasos linfáticos).

Na Tabela 36 encontram-se os resultados do modelo final ajustado para o desfecho. As variáveis associadas ao desfecho foram estágio clínico, tipo histológico, acometimento dos linfonodos e Ki-67. Houve indícios de que Ki 67 também tenha associação com o desfecho ($p=0,099$ no modelo ajustado, não apresentado na tabela).

Tabela 36 - Resultados do modelo para o desfecho das pacientes

Variável	Qui-quadrado	gl*	p
Estadiamento clínico	8,19	2	0,017
Tipo histológico	6,72	1	0,010
Acometimento de linfonodos	4,64	1	0,031
Grau histológico	6,41	2	0,041

* gl = graus de liberdade

O acometimento dos linfonodos não contribuiu significativamente para o resultado da MDVL, no modelo saturado (Tabela 37).

Tabela 37 - Resultados do modelo para o acometimento dos linfonodos, incluindo a MDVL

Variável	Qui-quadrado	gl	p
MDVL	0,11	1	0,742
Estadiamento clínico	1,69	2	0,430
Tipo histológico	1,56	1	0,211
Infiltração da parede	1,76	1	0,185
Comprometimento vascular	12,42	1	0,000
Paramétrio comprometido	8,85	1	0,003
Vagina comprometida	1,86	1	0,173
Grau histológico	1,41	2	0,493
Ki-67	0,09	1	0,764
Tamanho	1,61	2	0,446

** gl = graus de liberdade.

* MDVL avaliada pelo método DVV (contagem de número de vasos linfáticos).

Os resultados do modelo final ajustado para o acometimento dos linfonodos evidenciaram que as variáveis associadas ao acometimento dos linfonodos foram: comprometimento vascular, comprometimento de paramétrio e profundidade de invasão (Tabela 38).

Tabela 38 - Resultados do modelo para o acometimento dos linfonodos

Variável	Qui-quadrado	gl*	p
Comprometimento vascular	19,51	1	<0,001
Comprometimento de paramétrio	10,91	1	0,001
Profundidade de invasão	4,92	1	0,027

* gl = graus de liberdade.

5.5 Associação entre a MDVL e a expressão da podoplanina pelas células neoplásicas e células fibroblásticas do estroma intratumoral

Inferese, pela Tabela 39, que a expressão de podoplanina em células neoplásicas associou-se à alta MDVL. A estatística do teste foi $\chi^2=7,825$, com $p=0,005$.

Tabela 39 - MDVL e expressão de podoplanina em células neoplásicas

		MDVL			Total
		Baixo	Alto		
Podoplanina em células neoplásicas	Não	n	63	49	112
		%	88,70%	68,10%	78,30%
	Sim	n	8	23	31
		%	11,30%	31,90%	21,70%
Total		n	71	72	143
		%	100,00%	100,00%	100,00%

* MDVL avaliada pelo método DVV (contagem de número de vasos linfáticos).

**Cel + = expressão da podoplanina em células neoplásicas.

A Tabela 40 mostra a expressão da podoplanina em células fibroblásticas do estroma intratumoral segundo a MDVL. Esta pode ser considerada independente do estroma. A estatística do teste de associação foi $\chi^2=0,030$, com $p=0,862$.

Tabela 40 - MDVL e a expressão da podoplanina no estroma intratumoral

		MDVL			Total
		Baixo	Alto		
Estroma	Negativo	n	58	58	116
		%	81,70%	80,60%	81,10%
	Positivo	n	13	14	27
		%	18,30%	19,40%	18,90%
Total		n	71	72	143
		%	100,00%	100,00%	100,00%

* MDVL avaliada pelo método DVV (contagem de número de vasos linfáticos).

**Estroma = expressão da podoplanina no estroma intratumoral.

5.6 Associação entre expressão de podoplanina em células neoplásicas com comprometimento vascular, acometimento de linfonodos e desfecho

Não houve associação significativa entre a expressão de podoplanina em células neoplásicas e comprometimento vascular, comprometimento dos linfonodos ou desfecho. Os resultados estão nas Tabelas 41 a 43.

Tabela 41 - Expressão da podoplanina em células neoplásicas e comprometimento vascular

				Comprometimento vascular		Total
				Não	Sim	
Podoplanina em células neoplásicas	Não	n	60	52	112	
		%	74,10%	82,50%	77,80%	
	Sim	n	21	11	32	
		%	25,90%	17,50%	22,20%	
Total	n	81	63	144		
	%	100,0%	100,0%	100,0%		

O teste de associação entre a expressão de podoplanina em células neoplásicas e o comprometimento vascular teve estatística $\chi^2=1,469$, com $p=0,225$, indicando não ser significativa a associação.

Tabela 42 - Expressão da podoplanina em células neoplásicas e estado dos linfonodos

				Linfonodos acometidos		Total
				Não	Sim	
Podoplanina em células neoplásicas	Não	n	82	30	112	
		%	76,60%	81,10%	77,80%	
	Sim	n	25	7	32	
		%	23,40%	18,90%	22,20%	
Total	n	107	37	144		
	%	100,0%	100,0%	100,0%		

A expressão de podoplanina em células neoplásicas associada ao acometimento dos linfonodos teve estatística $\chi^2=0,314$, com $p=0,575$, acentuando-se não ser significativa a associação.

Tabela 43 - Expressão da podoplanina em células neoplásicas e desfecho das pacientes

				Desfecho		Total
				Viva	Morta	
Podoplanina em células neoplásicas	Não	n	95	17	112	
		%	76,00%	89,50%	77,80%	
	Sim	n	30	2	32	
		%	24,0%	10,50%	22,20%	
Total	n	125	19	144		
	%	100,0%	100,0%	100,0%		

O teste de associação entre a expressão de podoplanina em células neoplásicas e o desfecho para as pacientes teve estatística $\chi^2=1,732$, com $p=0,188$, sem significância.

5.7 Avaliação da expressão da podoplanina em células fibroblásticas do estroma intratumoral

Tabela 44 - Expressão da podoplanina em células neoplásicas e expressão da podoplanina no estroma intratumoral

		Estroma			
		Negativa	Positiva	Total	
Podoplanina em células neoplásicas	Não	n	90	22	112
		%	76,60%	81,50%	78,30%
	Sim	n	26	5	31
		%	22,40%	18,50%	21,70%
	Total	n	116	27	143
		%	100,0%	100,0%	100,0%

O teste de associação entre a expressão de podoplanina em células neoplásicas e a expressão de podoplanina no estroma intratumoral teve estatística igual $\chi^2=0,196$, com $p=0,658$, reportando não ser significativa a associação.

No modelo de regressão logística ajustado para avaliação da associação entre a expressão de podoplanina no estroma e as demais variáveis potencialmente prognósticas, a expressão de podoplanina no estroma se associou a comprometimento linfonodal e desfecho (Tabelas 45 e 46).

Tabela 45 - Resultados do ajuste do modelo saturado para a expressão da podoplanina no estroma

Variável	Qui-quadrado	p
Estadiamento clínico	1,21	0,546
Tipo histológico	1,78	0,182
Idade	2,06	0,151
Infiltração	0,76	0,384
Acomet. vascular	0,11	0,744
Acomet. de linfonodos	3,58	0,058
Desfecho	5,02	0,025
Tamanho	4,37	0,113

O modelo final, obtido após a retirada de todas as variáveis com contribuição não-significativa, teve os seguintes resultados, apresentados na Tabela 46.

Tabela 46 - Resultados do ajuste do modelo final para a expressão de podoplanina no estroma

Variável	Qui-quadrado	p
Comprometimento de linfonodos	8,19	0,004
Desfecho	6,05	0,014

Na Tabela 47 o teste de associação entre a expressão de podoplanina em células fibroblásticas do estroma intratumoral e o comprometimento linfonodos teve estatística $\chi^2=5,985$, com $p=0,014$, indicando ser significativa a associação.

Tabela 47 - Expressão da podoplanina em células fibroblásticas do estroma intratumoral e comprometimento de linfonodos

		Linfonodo acometido		Total	
		Não	Sim		
Estroma	Negativo	n	91	25	116
		%	85,80%	67,60%	81,10%
	Positivo	n	15	12	27
		%	14,20%	32,40%	18,90%
Total		n	106	37	143
		%	100,00%	100,00%	100,00%

Pearson Chi-Square $X^2=5,985$ $P=0,014$.

A estatística do teste salientou significativa associação entre a expressão de podoplanina em células fibroblásticas do estroma intratumoral e o comprometimento de linfonodos foi $\chi^2=5,985$, com $p=0,014$.

Tabela 48 - Expressão da podoplanina em células fibroblásticas do estroma intratumoral e desfecho das pacientes

		Desfecho		Total	
		Vivo	Morto		
Estroma	Negativo	n	98	18	116
		%	79,00%	94,70%	81,10%
	Positivo	n	26	1	27
		%	21,00%	5,30%	18,90%
Total		n	124	19	143
		%	100,00%	100,00%	100,00%

5.8 Análise multivariada incluindo a MDVL, expressão de podoplanina pelas células neoplásicas e em células fibroblásticas do estroma para previsão do acometimento dos linfonodos e no desfecho das pacientes

Tabela 49 - Modelo inicial para acometimento de linfonodos incluindo expressão da podoplanina nas células neoplásicas

Variável	Qui-quadrado	gl	p
Podoplanina em células neoplásicas	2,00	1	0,157
Faixa etária	12,37	1	0,000
Estádio	5,71	2	0,058
Tipo histológico	5,72	1	0,017
MDVL	1,86	1	0,173
Tamanho	1,74	2	0,419
Parâmetro comprometido	10,64	1	0,001
Vagina comprometida	3,98	1	0,046
Grau histológico	4,56	2	0,102
Comprometimento vascular	17,57	1	0,000
Infiltração da parede	1,87	1	0,171
Ki 67 alto	0,23	1	0,629

Após a retirada das variáveis com menos contribuição, chegou-se ao modelo final (Tabela 50).

Tabela 50 – Modelo final para previsão de acometimento de linfonodos

Variável	Qui-quadrado	gl	p
Faixa etária	4,96	1	0,026
Paramétrio comprometido	10,54	1	0,001
Comprometimento vascular	21,87	1	0,000
Profundidade de invasão	4,37	1	0,037

As variáveis preditivas para o acometimento dos linfonodos foram: faixa etária, comprometimento de paramétrio, comprometimento vascular e profundidade de invasão. A expressão de podoplanina nas células neoplásicas não apresentou contribuição significativa para explicar o acometimento dos linfonodos quando em conjunto com as demais variáveis do modelo.

O resultado do ajuste do modelo saturado para previsão do acometimento dos linfonodos, incluindo também a expressão da podoplanina no estroma intratumoral, encontra-se na Tabela 51.

Tabela 51 - Modelo inicial para acometimento dos linfonodos incluindo expressão da podoplanina no estroma intratumoral

Variável	Qui-quadrado	gl	p
Podoplanina (+) em células neoplásicas	2,63	1	0,105
Podoplanina (+) em células fibroblásticas			
Faixa etária	13,84	1	0,000
Estádio	4,74	2	0,093
Tipo histológico	5,21	1	0,022
MDVL	1,20	1	0,274
Tamanho	1,48	2	0,476
Paramétrio comprometido	7,72	1	0,005
Vagina comprometida	2,99	1	0,084
Grau histológico	4,63	2	0,099
Comprometimento vascular	16,43	1	0,000
Infiltração da parede	1,94	1	0,163
Ki 67	0,51	1	0,477

Após a remoção das variáveis menos significativas, chegou-se ao modelo final (Tabela 52).

Tabela 52 - Modelo quase final para o acometimento dos linfonodos incluindo expressão da podoplanina no estroma intratumoral

Variável	Qui-quadrado	gl	p
Faixa etária	5,85	1	0,016
Parâmetro comprometido	9,22	1	0,002
Comprometimento vascular	20,60	1	0,000
Profundidade de invasão	3,83	1	0,050
Expressão de podoplanina no estroma	2,50	1	0,114

A Tabela 53 apresenta o resultado do ajuste do modelo saturado (com todas as variáveis preditivas) para previsão do desfecho das pacientes, usando a expressão da podoplanina nas células neoplásicas. As variáveis com contribuição não-significativa ($p > 0,05$) devem então ser removidas uma a uma (a partir da menos significante – maior p), até que somente variáveis com contribuição significativa permaneçam no modelo.

Tabela 53 - Modelo inicial para previsão do desfecho incluindo a expressão da podoplanina nas células neoplásicas

Variável	Qui-quadrado	gl	p
Expressão da podoplanina em células neoplásicas	0,66	1	0,416
Faixa etária	2,49	1	0,114
Estádio	3,01	2	0,222
Tipo histológico	8,51	1	0,004
MDVL	0,10	1	0,747
Tamanho	0,29	2	0,865
Parâmetro comprometido	0,17	1	0,679
Vagina comprometida	0,21	1	0,648
Grau histológico	10,21	2	0,006
Comprometimento vascular	1,77	1	0,183
Infiltração	0,06	1	0,805
Ki 67	2,40	1	0,121

Tamanho do tumor foi a menos significativa e precisou ser removida, assim como as demais, uma a uma, até o modelo final com todas significativas para explicar o desfecho.

Tabela 54 - Modelo final para o desfecho incluindo a expressão da podoplanina nas células neoplásicas

Variável	Qui-quadrado	gl	p
Estádio	7,82	2	0,020
Tipo histológico	6,84	1	0,009
Grau histológico	7,86	2	0,020
Comprometimento vascular	4,12	1	0,042

As variáveis preditivas para o desfecho foram: estágio, tipo histológico, grau histológico e comprometimento vascular. A expressão da podoplanina nas células neoplásicas não apresentou contribuição significativa com essas variáveis presentes no modelo.

O resultado do ajuste do modelo saturado (com todas as variáveis preditivas) para previsão do desfecho das pacientes, usando a expressão da podoplanina no estroma intratumoral, pode ser visto na Tabela 55.

As variáveis com contribuição não-significativa ($p > 0,05$) foram então ser removidas uma a uma (a partir da menos significante – maior p) até que somente aquelas com contribuição significativas permanecessem no modelo.

Tabela 55 - Modelo inicial para previsão do desfecho incluindo a expressão da podoplanina no estroma intratumoral

Variável	Qui-quadrado	gl	p
Expressão de podoplanina no estroma	3,03	1	0,082
Faixa etária	1,33	1	0,248
Estádio	2,29	2	0,318
Tipo histológico	7,66	1	0,006
MDVL	0,02	1	0,902
Tamanho	0,45	2	0,800
Parâmetro comprometido	0,38	1	0,539
Vagina comprometida	0,01	1	0,918
Grau histológico	9,68	2	0,008
Comprometimento vascular	2,65	1	0,103
Infiltração	0,15	1	0,696
Ki 67	2,15	1	0,142

Acometimento da vagina foi a menos significativa, seguida da MDVL. Elas foram retiradas, uma a uma, até que no modelo final constassem somente variáveis com contribuição significativa para explicar o desfecho (Tabela 56).

Tabela 56 - Modelo final para previsão de desfecho incluindo a expressão da podoplanina no estroma

Variável	Qui-quadrado	gl	p
Expressão de podoplanina no estroma	4,40	1	0,036
Estádio	7,39	2	0,025
Tipo histológico	6,09	1	0,014
Grau histológico	9,17	2	0,010
Comprometimento vascular	5,15	1	0,023

As variáveis preditivas para o desfecho foram: a expressão da podoplanina no estroma intratumoral, estágio clínico, tipo histológico, grau

histológico e comprometimento vascular. A expressão da podoplanina no estroma intratumoral agrega valor na previsão, mesmo com as demais variáveis já presentes no modelo.

6. DISCUSSÃO

O estudo dos vasos linfáticos dentro do tumor vem ganhando crescente interesse^{36,38,39,43-46}. Sabe-se que a mortalidade pelo câncer raramente é causada pelo tumor primário, sendo mais atribuída à disseminação metastática causada pelas células tumorais a órgãos distantes.

A compreensão da linfangiogênese pode ser considerada chave importante na elucidação de mecanismos usados pelas células tumorais ao se disseminarem¹⁰⁸.

Neste presente estudo, das 144 pacientes tratadas com histerectomia radical, 37 (25,7%) apresentavam linfonodos positivos. E quando os linfonodos estavam comprometidos, ocorreu a morte em 10 (52,60%).

Os linfonodos acometidos estavam associados a tamanho do tumor, profundidade de invasão, envolvimento de paramétrio ou vagina e embolização vascular-linfática(EVL). Mas não houve associação com tipo histológico, idade, grau histológico, expressão do Ki-67, acometimento de corpo de útero ou estadiamento clínico.

É sabido que o tumor induz linfangiogênese. Esse processo provoca a formação de novos vasos linfáticos a partir de vasos preexistentes e da circulação de células progenitoras endoteliais linfáticas¹⁰⁹. A célula tumoral promove a remodelação de vasos linfáticos locais, o desenvolvimento de rede linfática regional no nódulo linfático e também o aumento do número e diâmetro dos vasos linfáticos. Conseqüentemente, o escoamento de linfa do tumor aumenta, podendo produzir significativo aumento de metástase de células tumorais para nódulos linfáticos.

Em nosso estudo foi avaliada a microdensidade vascular linfática em carcinomas de colo do útero iniciais e relacionados esses achados

com as características clínico-patológicas clássicas do câncer precoce de colo de útero.

A linfangiogênese foi estimada pela quantificação das estruturas vasculares que expressam podoplanina, que é expressa especificamente em endotélio de vasos linfáticos, mas não em vasos sanguíneos¹⁴.

Pesquisas sobre a MLVD em câncer de colo de útero são raras e controversos^{110,111}. Em câncer invasivo já foram descritos 0-12,3 microvasos linfáticos (média de 6,15 vasos/x200hpf) e carcinoma microinvasor com aumento de 10,3-19,3 (média de 14,8 vasos/x200hpf)¹⁷.

Em 2007 detectou-se aumentada densidade vascular linfática (DVL) em lesões invasivas na comparação com as pré-invasivas, sem associação com lesões invasivas com linfonodos comprometidos ou metástases¹⁶. Quando associada displasia de alto grau a carcinoma *in situ*, constatou-se elevação na densidade dos vasos linfáticos, sugerindo o importante papel desse aumento para a progressão para tumor invasivo na carcinogênese cervical⁵⁸.

Em nosso estudo a MLVD foi maior nos tumores de menor tamanho (<2 cm) e estádios iniciais (IB1), provavelmente demonstrando que a indução da linfangiogênese pode ser evento inicial na progressão do câncer, quando ainda nem todos os novos vasos neoformados estão funcionando ou patentes. Isto explicaria o achado da MLVD estar elevada nos tumores iniciais, entretanto, os linfonodos estavam frequentemente negativos.

Outro ponto importante que merece ser estudado é a interação das células neoplásicas com o estroma adjacente. No estroma existem outras células (fibroblastos), proteínas da matriz extracelular e moléculas de adesão célula-célula como as caderinas.

As caderinas são moléculas de adesão dependentes de Ca^{2+} que medeiam a interação homotípica célula-célula, inicialmente identificadas nas junções aderentes (*adherens junctions*). As caderinas são uma superfamília de pelo menos 30 diferentes moléculas, cuja expressão é controlada têmporo-espacialmente.

A molécula de e-caderina, que é expressa por células epiteliais, é a que se encontra mais frequentemente alterada em tumores. Diferentes estudos revelam que a e-caderina é frequentemente inativada durante o desenvolvimento de carcinomas humanos, como mama, cólon, próstata, estômago, fígado, esôfago, pele, rim e pulmão, e está associada à invasão e à formação de metástase em linfonodos e à distância.

A inibição da expressão da e-caderina em células de carcinoma facilita a invasão tumoral, enquanto o restabelecimento da expressão de e-caderina resulta em diminuição de proliferação e inibição de invasão e metástase.

A e-caderina é, em parte, responsável pelo fenômeno de inibição por contato, uma característica de células epiteliais normais, associado ao bloqueio de proliferação quando células entram em contato umas com as outras. Essa característica é fundamental para a manutenção de arquitetura dos epitélios. Essa mudança no padrão da expressão de caderinas ocorre durante a progressão tumoral e já foi documentada *in vitro* e *in vivo*.

Ao mesmo tempo em que as células tumorais se soltam do tumor primário por diminuição da interação célula-célula, elas devem ter a capacidade de migrar e invadir o estroma adjacente. Células de carcinomas passam por um processo denominado transição epitélio-mesenquimal (EMT): a célula tumoral, de origem epitelial, passa a expressar um conjunto de genes tipicamente expressos em células do tecido conjuntivo. Do ponto de vista celular, a transição se dá entre um morfotipo epitelioide (menos migratório) para um morfotipo fibroblastoide (mais migratório)¹¹².

Baseados nestes dados, estão surgindo evidências na literatura de que mudanças no fenótipo molecular que ocorrem no microambiente do estroma tumoral, conhecido como EMT, poderiam estar envolvidas no mecanismo de metástase dos tumores¹¹³. Embora as bases moleculares do EMT ainda não tenham sido elucidadas, algumas sinalizações moleculares têm sido identificadas e todas elas, de alguma forma, estão relacionadas

à perda da função da adesão da proteína transmembrana e-caderina¹¹³. A EMT é importante, particularmente, em cânceres com migração celular única e na disseminação inicial das células tumorais¹¹⁴.

A podoplanina poderia utilizar mecanismos de sinalização da e-caderina para estimular a migração, de forma coletiva, das células tumorais e, assim, promover invasão; e por esta razão estar envolvida no processo de metástase das células tumorais^{22,115}.

Neste trabalho observou-se a expressão da podoplanina em fibroblastos do estroma intratumoral (ITS) em 27 (18,88%) dos 144 casos, associada à metástase para nódulo linfático e ao desfecho.

Por outro lado, não houve associação entre expressão da podoplanina e idade, estágio clínico, tamanho do tumor, tipo histológico, profundidade de infiltração ou envolvimento vascular.

Estudo de 138 casos de carcinoma invasivo de células escamosas no colo de útero evidenciou imunorreatividade à podoplanina de forma difusa em 17 (12%) e focal em 81 (59%), enquanto 40 (29%) não apresentaram imunorreatividade²¹.

Este trabalho registrou, ainda, que a invasão linfática e metástase para linfonodos foram significativamente mais comuns em tumores que expressaram baixa imunorreatividade à podoplanina ($p < 0,0001$ e $0,002$, respectivamente). Das características clínico-patológicas, a podoplanina não se correlacionou com estágio clínico, tamanho tumor e grau histológico. Já a baixa imunorreatividade esteve associada a curto período livre de doença, mas não à sobrevida.

De acordo com levantamento bibliográfico realizado até o momento, este é o primeiro estudo a investigar a importância da expressão da podoplanina no estroma intratumoral de carcinoma do colo do útero, relacionando-a com MLVD, comprometimento dos linfonodos e desfecho.

7. CONCLUSÕES

- Avaliação da linfangiogênese intratumoral a partir da análise quantitativa da microdensidade vascular linfática (MDVL) em carcinomas do colo do útero submetidos a tratamento cirúrgico revelou resultados equivalentes para os três métodos morfométricos de quantificação (DVV, DVT DVP).
- O estadiamento clínico e o estado dos linfonodos foram variáveis independentes associadas a óbito.
- As variáveis associadas a comprometimento linfonodal foram tamanho do tumor, profundidade de infiltração cervical, embolização vascular linfática, infiltração parametrial e extensão para a vagina. A idade da paciente, estadiamento clínico, tipo e grau histológico, extensão para o corpo uterino e atividade proliferativa determinada pela expressão do Ki-67 não se associaram significativamente ao comprometimento dos linfonodos.
- As variáveis associadas a óbito pela doença foram estadiamento clínico, tamanho do tumor, profundidade de invasão, embolização vascular linfática, extensão para os paramétrios e estado dos linfonodos. As demais variáveis (idade, tipo e grau histológico, extensão para vagina e atividade proliferativa) não mostraram associação significativa.
- A alta MDVL se associou a tumores de menor tamanho, com menos profundidade de infiltração, estágio clínico inicial, ausência de invasão linfovascular e linfonodos negativos. A MDVL não se associou a idade, tipo histológico, grau histológico, invasão de paramétrio ou vagina ou expressão de Ki-67.
- Na análise multivariada, a MDVL não foi variável preditiva de comprometimento linfonodal ou óbito. Não houve associação

entre a expressão de podoplanina pelas células neoplásicas e características clínico-patológicas, acometimento de linfonodos ou óbito. A expressão de podoplanina em células fibroblásticas do estroma intratumoral foi associada a bom prognóstico.

- Não houve associação da MDVL com idade, estágio clínico, tamanho do tumor, tipo histológico, profundidade de invasão ou embolização vascular linfática.

8. APÊNDICES e ANEXO

APÊNDICE A – BANCO DE DADOS

PACIENTE	IDADE	EC	TIPO HIST	CIRURGIA	TAMANHO TUMOR	GRAU HIST	COMP VASCUL+	INFILT cm	TTO ADJUV	Desfecho meses	Desfecho	Data Inicio TTO	Data óbito	Ki 67	Cels +	Estroma	DVP	DVT
1	59	IB 1	CEC	W. Meigs	1,0 x 0,3	1	Não	0,2 cm	Não	116 meses	Seguim	24/11/1999		0	35%	0	1,77	4,44
2	60	IB 2	CEC	W. Meigs	4,0 x 3,0	2	Não	1,1 cm	Tele+Braqui	114 meses	Seguim	18/01/2000		2	0	0	0,1	0,4
3	42	IB 1	CEC	W. Meigs	1,5 x 1,0	2	Não	0,2 cm	Não	146 meses	Seguim	21/05/1997		3	> 90%	0,5	4,1	9,4
4	59	IA A	CEC	W. Meigs	4,0 x 4,0	1	Sim	1,0 cm	Não	97 meses	Seguim	01/06/2001		3	> 90	0	0	0
5	30	II	CEC	W. Meigs	4,5 x 4,0	1	Não	1,5 cm	Tele+Braqui	101 meses	Seguim	01/02/2001		4	10%	0	0,5	0,8
6	75	IB 1	Adenoca	W. Meigs	5,0 x 2,0	2	Sim	0,7 cm	Tele+Braqui	48 meses	óbito	10/06/2002	29/06/2006	3	0	0	0,2	0,4
7	69	IB 1	CEC	W. Meigs	1,0 x 1,0	2	Não	0,5 cm	Tele+Braqui	71 meses	Seguim	26/08/2003		3	0	0,5	1	2,5
8	51	IB 1	CEC	W. Meigs	3,0 x 2,5	2	Não	0,2 cm	Braqui	72 meses	Seguim	25/07/2003		4	0	2	5,8	5
9	75	IB 1	CEC	W. Meigs	2,0 x 1,5	2	Não	0,7 cm	Não	78 meses	Seguim	13/01/2003		3	0	0	0,1	0,2
10	56	IB 2	CEC	W. Meigs	5,0 x 6,0	2	Não	0,8 cm	Tele+Braqui	69 meses	Seguim	07/10/2003		3	0	0	0	0
11	43	IB 2	Adenoca	W. Meigs	3,5 x 3,0	3	Sim	1,0 cm	Tele+Braqui	024 meses	óbito	04/09/2003	28/08/2005	4	0	0	0,1	0,3
12	33	IB 2	CEC	W. Meigs	4,0 x 4,0	2	Sim	0,8 cm	T+B+ QT	016 meses	óbito	03/05/2004	21/09/2005	3	0	0	2	4,8
13	51	IB 1	CEC	W. Meigs	2,0 x 1,0	2	Sim	0,8 cm	Não	64 meses	Seguim	15/03/2004		2	10%	0	1,3	2,5
14	38	IB 1	CEC	W. Meigs	1,5 x 1,0	2	Não	0,5 cm	Tele+Braqui	61 meses	Seguim	25/06/2004		4	0	0	2,3	4,1
15	57	IB 2	Adeno-Esc	W. Meigs	4,0 x 4,0	2	Sim	1,0 cm	T+B+ QT	016 meses	óbito	05/08/2004	12/12/2005	3	0	2	5,6	9
16	50	IB 2	CEC	W. Meigs	7,0 x 6,0	2	Não	0,9 cm	Tele+Braqui	014 meses	óbito	02/12/2004	27/02/2006	2	0	1	0,5	1,4
17	38	IB 1	CEC	W. Meigs	2,0 x 2,0	3	Sim	1,0 cm	Tele+Braqui	57 meses	Seguim	01/10/2004		3	0	1	0,4	0,9
18	30	IB 2	CEC	W. Meigs	4,0 x 4,0	2	Sim	0,8 cm	Tele+Braqui	26 meses	óbito	31/03/2005	12/05/2007	4	0	0	0	0
19	52	IB 1	CEC	W. Meigs	3,0 x 2,5	2	Não	0,4 cm	Não	65 meses	Seguim	02/02/2004		4	0	0	2,5	7,2
20	36	IB 2	CEC	W. Meigs	3,0 x 2,0	2	Sim	1,2 cm	Tele+Braqui	009 meses	óbito	02/05/2005	08/02/2006	2	0	0	1,1	3,8
21	43	IB 2	Adenoca	W. Meigs	4,0 x 2,0	2	Não	1,2 cm	Tele+Braqui	28 meses	óbito	31/05/2005	27/09/2007	4	0	0	0,3	0,7
22	53	IB 2	Adenoca	W. Meigs	3,0 x 3,0	1	Não	0,7 cm	Tele+Braqui	50 meses	Seguim	19/05/2005		1	0	0	0	0
23	62	IB 1	CEC	W. Meigs	2,5 x 1,5	1	Sim	1,1 cm	Tele+Braqui	52 meses	Seguim	11/03/2005		1	0	2	0	0
24	54	IB 1	CEC	W. Meigs	2,5 x 2,0	2	Sim	1,5 cm	Tele+Braqui	51 meses	Seguim	20/04/2005		3	raras	0	1,8	6
25	51	IB 1	Adenoca	W. Meigs	2,0 x 1,5	1	Não	1,0 cm	Braqui	50 meses	Seguim	28/03/2005		3	0	0	0	0
26	82	IB 1	CEC	W. Meigs	1,0 x 0,6	2	Sim	0,8 cm	Tele+Braqui	53 meses	Seguim	21/02/2005		0	0	2	2,2	5,6
27	43	IB 2	Adenoca	W. Meigs	3,5 x 2,5	2	sim	1,2 cm	Tele+Braqui	52 meses	Seguim	10/03/2005		2	0	0	0	0
28	78	IB 1	Adenoca	W. Meigs	1,5 x 0,8	2	Sim	1,0 cm	Tele+Braqui	019 meses	óbito	17/06/2005	25/01/2007	4	0	0	0,1	0,4
29	42	IB 2	CEC	W. Meigs	4,0 x 2,0	3	Não	1,0 cm	Tele+Braqui	52 meses	Seguim	02/03/2005		4	0	0	1,4	4
30	51	IB 1	CEC	W. Meigs	2,0 x 1,5	2	Não	1,3 cm	Tele+Braqui	57 meses	Seguim	15/10/2004		2	0	0	3,2	7,1
31	83	IB 1	Adenoca	W. Meigs	1,5 x 1,0	1	Não	0,3 cm	Braqui	51 meses	Seguim	28/04/2005		0	0	0	1,7	6,3
32	39	IB 2	CEC	W. Meigs	3,0 x 2,0	2	Não	1,0 cm	Não	50 meses	Seguim	25/05/2005		3	60%	2	0,6	1
33	64	IB 1	CEC	W. Meigs	6,5 x 6,0	2	Sim	1,1 cm	Tele+Braqui	53 meses	Seguim	18/02/2005		2	0	2	1	1,1
34	71	IB 1	CEC	W. Meigs	2,0 x 2,0	3	Sim	1,0 cm	Tele+Braqui	015 meses	óbito	14/07/2005	21/10/2006	3	0	0	0	0
35	40	IB 2	CEC	W. Meigs	4,0 x 3,5	3	Não	0,8 cm	Tele+Braqui	49 meses	Seguim	10/06/2005		4	0	0	2,7	5,4
36	38	IB 2	CEC	W. Meigs	4,0 x 4,0	2	Não	1,0 cm	Tele+Braqui	49 meses	Seguim	06/06/2005		3	40%	0	0	0
37	70	IB 1	CEC	W. Meigs	3,0 x 2,0	2	Não	0,5 cm	Não	83 meses	Seguim	19/08/2002		2	0	2	2,8	4,7
38	52	IB 2	CEC	W. Meigs	3,0 x 2,5	2	Sim	1,0 cm	Tele+Braqui	50 meses	Seguim	13/05/2005		2	0	0	0	0
39	32	IB 2	CEC	W. Meigs	5,5 x 5,0	3	Sim	1,2 cm	Tele+Braqui	49 meses	Seguim	30/06/2005		3	0	3	0	0
40	56	IB 1	CEC	W. Meigs	2,0 x 1,5	2	Não	0,8 cm	Tele+Braqui	113 meses	Seguim	03/02/2000		3	0	0	0,4	0,8
41	54	IB 1	CEC	W. Meigs	1,0 x 0,6	3	sim	0,3 cm	Não	49 meses	Seguim	22/06/2005		3	0	1	1,3	2,2
42	40	IB 2	adenoca	W. Meigs	4,0 x 3,0	2	Não	1,5 cm	Tele+Braqui	018 meses	óbito	20/04/2005	24/10/2006	2	0	0	0	0
43	68	IA A	CEC	W. Meigs	3,0 x 2,0	2	Sim	1,3 cm	Tele+Braqui	013 meses	óbito	02/09/2005	31/10/2006	2	0	0	0,5	0,5
44	66	IA A	CEC	W. Meigs	6,0 x 4,0	2	Sim	1,3 cm	Tele+Braqui	49 meses	Seguim	10/06/2005		3	0	0	2,3	5,7
45	31	IB 2	CEC	W. Meigs	6,0 x 4,0	2	Não	1,2 cm	Tele+Braqui	48 meses	Seguim	07/07/2005		3	30%	1	1,1	1,8
46	48	IB 2	adeno-esc	W. Meigs	3,5 x 3,0	3	Não	1,0 cm	Tele+Braqui	47 meses	Seguim	22/08/2005		4	10%	1	0	0
47	72	IB 1	Adenoca	W. Meigs	1,0 x 0,9	1	Não	0,7 cm	Braqui	43 meses	óbito	15/09/2005	06/04/2009	2	0	0	2,9	5,4
48	66	IB 1	CEC	W. Meigs	1,0 x 1,0	9	Não	0,15 cm	Tele+Braqui	48 meses	Seguim	26/07/2005		9	10%	0	2,6	4,7
49	32	IB 1	CEC	W. Meigs	1,0 x 1,0	2	Não	0,3 cm	Não	47 meses	Seguim	25/08/2005		0	10%	0	3	7,4
50	47	IB 2	CEC	W. Meigs	2,0 x 1,5	2	Sim	0,3 cm	Não	47 meses	Seguim	26/08/2005		3	10%	0	0	0
51	54	IB 2	CEC	W. Meigs	4,5 x 4,5	2	Sim	1,5 cm	Tele+Braqui	47 meses	Seguim	16/08/2005		3	0	2	0,7	1,4
52	57	IB 1	CEC	W. Meigs	2,5 x 2,5	2	Não	0,3	Não	46 meses	Seguim	14/09/2005		3	15%	1	4,1	10,5
53	51	IA A	CEC	W. Meigs	10,0 x 5,0	2	Sim	0,8 cm	Tele+Braqui	34 meses	óbito	08/12/2005	17/09/2008	2	0	0	0	0
54	63	IB 1	CEC	W. Meigs	1,5 x 1,2	3	Não	0,4 cm	Não	48 meses	Seguim	04/07/2005		3	0	0	1,6	2,6
55	30	IB 2	CEC	W. Meigs	1,5 x 1,5	2	Não	0,4 cm	Não	45 meses	Seguim	11/10/2005		3	30%	0	2,4	6,4
56	55	IB 1	CEC	W. Meigs	2,0 x 2,0	2	Sim	0,8 cm	Tele+Braqui	48 meses	Seguim	23/07/2004		3	0	0	0,2	0,4
57	47	IB 1	CEC	W. Meigs	2,0 x 2,0	2	Não	0,3 cm	Não	44 meses	Seguim	29/12/2005		4	20%	0	3,8	7,5
58	41	IB 2	Adenoca	W. Meigs	2,5 x 2,0	1	Sim	1,0 cm	Tele+Braqui	42 meses	Seguim	13/01/2006		3	0	0	0,1	0,2
59	40	IB 1	CEC	W. Meigs	2,0 x 1,5	2	Não	0,2 cm	Não	42 meses	Seguim	16/01/2006		3	0	1	7,2	9,1
60	53	IB 1	Adenoca	W. Meigs	4,0 x 3,5	12	Sim	1,0 cm	Tele+Braqui	42 meses	Seguim	16/01/2006		3	0	0	1,2	3,5
61	68	IB 1	CEC	W. Meigs	3,0 x 2,0	3	Sim	0,9 cm	Tele+Braqui	47 meses	Seguim	29/08/2005		3	0	2	0,9	1,3
62	47	IB 1	Adenoca	W. Meigs	1,0 x 0,6	1	Não	0,23 cm	Não	49 meses	Seguim	17/06/2005		3	0	0	2,4	6,8
63	54	IB 1	CEC	W. Meigs	2,0 x 2,0	2	Não	0,5 cm	Braqui	46 meses	Seguim	13/09/2004		3	0	0	3,8	6,9
64	46	IB 2	CEC	W. Meigs	5,0 x 4,0	2	Sim	1,0 cm	Tele+Braqui	46 meses	Seguim	30/09/2005		0	0	2	0	0
65	50	IB 1	adenoca	W. Meigs	1,0 x 1,0	1	Não	0,25 cm	Não	47 meses	Seguim	18/08/2005		4	0	0	4,1	7,6
66	49	IB 1	CEC	W. Meigs	2,0 x 1,5	2	Não	1,0 cm	Tele+Braqui	46 meses	Seguim	03/09/2004		2	0	2	0	0
67	47	IB 1	CEC	W. Meigs	2,0 x 2,0	2	Sim	0,7 cm	Tele+Braqui	49 meses	Seguim	15/06/2005		3	5%	0	2,7	5,4
68	53	IB 1	Adenoca	W. Meigs	1,0 x 1,0	1	Não	0,2 cm	Não	46 meses	Seguim	22/09/2005		3	0	2	2,1	4,9
69	59	IB 1	Adenoca	W. Meigs	1,5 x 1,5	1	Não	1,0 cm	Braqui	47 meses	Seguim	28/08/2005		2	0	0	0	0
70	59	IB 1	CEC	W. Meigs	1,5 x 1,0	2	Não	0,1 cm	Braqui	50 meses	Seguim	22/05/2002		4	75%	1	3	5,1
71	55	IB 2	CEC	W. Meigs	5,5 x 4,5	2	Sim	1,0 cm	Tele+Braqui	023 meses	óbito	15/05/2006		2	0	0	0	0
72	44	IB 1	Adenoca	W. Meigs	2,5 x 2,0	1	Não	1,0 cm	Tele+Braqui	55 meses	Seguim	17/12/2004		2	0	0	1,7	3,5
73	30	IB 1	CEC	W. Meigs	3,0 x 3,0	2	Não	0,9 cm	Tele+Braqui	38 meses	Seguim	10/05/2006		4	25%	0	1,7	3,1
74	61	IB 1	CEC	W. Meigs	2,5 x 2,0	2	Sim	0,9 cm	Tele+Braqui	51 meses	Seguim	25/04/2005		3	0	1	0	0
75	53	IB 1	CEC	Piver II	1,5 x 1,0	2	Não	0,4 cm	T+B+ QT	105 meses	Seguim	20/10/2000		0	2%	0	3,3	5,9
76	65	IB 1	CEC	W. Meigs	2,5 x 1,5	2	Sim	1,5 cm	Não	38 meses	Seguim	02/05/2006		2	2%	0	1,1	2,2
77	69	IB 1	Adenoca	W. Meigs	3,0 x 3,0	1	Sim	1,4 cm	T+B+ QT	37 meses	Seguim	02/06/2006		4	0	0	0	0
78	48	IB 1	CEC	W. Meigs	7,0 x 6,0	2	sim	1,2 cm	Tele+Braqui	36 meses	Seguim	25/						

PACIENTE	IDADE	EC	TIPO HIST	CIRURGIA	TAMANHO TUMOR	GRAU HIST	COMP VASCUL+	INFILT cm	TTO ADJUV	Desfecho meses	Desfecho	Data Inicio TTO	Data óbito	Ki 67	Cels +
81	42	IB 1	CEC	W. Meigs	2,0 x 2,0	2	Sim	0,7 cm	Tele+Braqui	35 meses	Sequim	28/08/2006		2	< 1 %
82	36	IB 1	CEC	W. Meigs	2,5 x 0,5	2	Não	0,3 cm	Braqui	76 meses	Sequim	10/03/2003		3	10%
83	38	IB 2	CEC	W. Meigs	2,0 x 1,5	3	Não	0,6 cm	Tele+Braqui	36 meses	Sequim	25/07/2006		4	0
84	43	II A	CEC	W. Meigs	4,0 x 3,5	2	Não	0,5 cm	Tele+Braqui	022 meses	óbito	11/12/2006	05/10/2008	3	15%
85	40	IB 1	CEC	W. Meigs	1,5 x 1,0	3	Não	0,7 cm	Braqui	70 meses	Sequim	01/09/2003		2	0
86	72	IB 1	CEC	W. Meigs	2,0 x 2,0	3	Sim	0,9 cm	Braqui	46 meses	Sequim	13/09/2005		2	30%
87	61	IB 2	Adenoca	W. Meigs	8,0 x 7,0	3	Sim	1,3 cm	Tele+Braqui	45 meses	Sequim	31/10/2006		3	0
88	37	IB 1	Adenoca	W. Meigs	1,0 x 0,6	1	Não	0,3 cm	Braqui	30 meses	Sequim	12/01/2007		4	0
89	56	IB 1	Adenoca	W. Meigs	2,0 x 2,0	2	Sim	1,1 cm	Tele+Braqui	32 meses	Sequim	07/11/2006		3	0
90	47	IB 1	CEC	W. Meigs	1,0 x 1,0	9	Não	0,17 cm	Não	30 meses	Sequim	22/01/2007		9	0
91	29	IB 1	Adenoca	W. Meigs	2,0 x 1,0	1	Não	0,15 cm	Braqui	31 meses	Sequim	15/12/2006		2	0
92	60	IB 1	CEC	W. Meigs	3,5 x 3,5	2	Sim	1,5 cm	Tele+Braqui	30 meses	Sequim	19/01/2007		3	0
93	66	IB 1	Adenoca	W. Meigs	1,5 x 1,5	2	Não	0,5 cm	Tele+Braqui	31 meses	Sequim	12/12/2006		0	0
94	63	IB 1	CEC	W. Meigs	3,0 x 2,5	2	sim	1,3 cm	Tele+Braqui	31 meses	Sequim	22/12/2006		4	0
95	33	IB 2	Adenoca	W. Meigs	6,5x 4,0	2	Sim	1,2 cm	T+B+ QT	012 meses	óbito	22/03/2007	08/03/2008	3	15%
96	62	IB 1	CEC	W. Meigs	3,5 x 3,0	2	Não	1,0 cm	Tele+Braqui	30 meses	Sequim	24/01/2007		3	0
97	60	IB 1	Adenoca	W. Meigs	4,0 x 3,5	1	Não	0,2 cm	Não	30 meses	Sequim	23/01/2007		4	0
98	57	IB 1	adenoca	LE	2,0 x 1,2	3	Sim	0,7 cm	T+B+ QT	30 meses	Sequim	31/01/2007		3	0
99	34	IB 2	CEC	W. Meigs	2,0 x 2,0	3	Sim	0,8 cm	Braqui	30 meses	Sequim	29/01/2007		2	0
100	57	IB 1	CEC	W. Meigs	1,5 x 1,0	2	Sim	0,8 cm	Tele+Braqui	29 meses	Sequim	06/02/2007		3	0
101	52	IB 1	CEC	W. Meigs	2,0 x 2,0	3	Não	1,0 cm	Braqui	30 meses	Sequim	19/01/2007		4	0
102	56	IB 1	CEC	W. Meigs	3,0 x 2,0	2	Sim	0,8 cm	Tele+Braqui	33 meses	Sequim	18/10/2006		2	0
103	32	IB 2	CEC	W. Meigs	2,5x2,0	2	Sim	0,8 cm	T+B+ QT	28 meses	Sequim	23/03/2007		4	0
104	40	IB 1	Adenoca	W. Meigs	3,0 x 2,0	1	Sim	0,7 cm	Tele+Braqui	29 meses	Sequim	16/02/2007		2	0
105	64	IB 1	CEC	W. Meigs	5,0 x 3,0	3	Sim	1,3 cm	Tele+Braqui	31 meses	Sequim	19/12/2006		3	0
106	34	IB 2	CEC	W. Meigs	6,5x5,0	3	Sim	1,2 cm	Tele+Braqui	008 meses	óbito	27/04/2007	13/01/2008	2	0
107	73	IB 2	Adenoca	W. Meigs	3,0 x 3,0	2	Não	1,0 cm	Tele+Braqui	29 meses	Sequim	02/02/2007		3	0
108	68	II A	CEC	W. Meigs	4,0 x 4,0	1	Não	1,0 cm	Tele+Braqui	27 meses	Sequim	23/04/2007		2	0
109	56	II A	CEC	W. Meigs	3,0 x 2,5	2	Não	1,5 cm	Tele+Braqui	28 meses	Sequim	09/03/2007		3	0
110	36	IA 2	CEC	W. Meigs	0,2 x 0,35	2	Não	0,3 cm	Não	28 meses	Sequim	21/03/2007		3	15%
111	63	IB 2	Adenoca	W. Meigs	3,5 x 3,0	2	Não	0,8 cm	Tele+Braqui	33 meses	Sequim	31/10/2006		3	0
112	40	IB 1	CEC	W. Meigs	6,0 x 6,0	2	Sim	1,2 cm	Tele+Braqui	27 meses	Sequim	27/04/2007		4	0
113	52	IB 1	Adenoca	W. Meigs	2,0 x 1,5	2	Não	0,6 cm	Braqui	025 meses	Sequim	15/06/2007		4	0
114	20	IB 2	CEC	W. Meigs	5,0 x 5,0	3	Não	1,0 cm	Tele+Braqui	025 meses	Sequim	01/06/2007		2	60%
115	55	IB 1	Adenoca	W. Meigs	2,5 x 1,5	9	Não	0,2 cm	Não	25 meses	Sequim	18/06/2007		9	0
116	36	IB 1	CEC	W. Meigs	2,5x0,5	1	Não	0,5 cm	Braqui	34 meses	Sequim	29/09/2006		4	10%
117	39	II A	Adeno-Esc	W. Meigs	6,0x5,0	3	Sim	0,8 cm	Tele+Braqui	025 meses	Sequim	25/06/2007		2	0
118	45	IB 2	CEC	W. Meigs	7,0 x 4,0	2	Sim	1,0 cm	T+B+ QT	25 meses	Sequim	18/06/2007		0	0
119	46	IB 1	CEC	W. Meigs	1,0 x 1,0	9	Não	0,35 cm	Não	27 meses	Sequim	13/04/2007		4	10%
120	56	II A	CEC	W. Meigs	4,0 x 4,0	3	Sim	1,0 cm	Tele+Braqui	26 meses	Sequim	30/05/2007		3	0
121	43	IB 1	Adenoca	W. Meigs	2,0 x 1,5	2	Não	0,4 cm	Não	26 meses	Sequim	11/05/2007		3	0
122	51	IB 1	CEC	W. Meigs	2,0 x 2,0	2	Sim	0,8 cm	Tele+Braqui	25 meses	Sequim	06/06/2007		3	0
123	33	IB 2	CEC	W. Meigs	4,0 x 3,0	3	Não	1,4 cm	Tele+Braqui	26 meses	Sequim	15/05/2007		3	0
124	62	IB 1	CEC	W. Meigs	5,0 x 3,0	2	Sim	1,4 cm	Tele+Braqui	26 meses	Sequim	14/05/2007		3	0
125	38	IB 1	CEC	W. Meigs	1,0 x 1,0	2	Não	0,2 cm	Não	53 meses	Sequim	23/02/2005		3	0
126	45	IB 1	CEC	W. Meigs	0,8 x 0,6	2	Não	0,5 cm	Não	27 meses	Sequim	11/04/2007		3	0
127	48	IB 1	CEC	W. Meigs	2,5 x 2,0	3	Não	1,0 cm	Tele+Braqui	024 meses	Sequim	27/07/2007		3	0
128	47	IB 2	CEC	W. Meigs	4,0 x 3,5	3	Sim	1,2 cm	Tele+Braqui	100 meses	Sequim	23/03/2001		4	0
129	34	IB 1	CEC	W. Meigs	4,0 x 2,5	2	Não	0,4 cm	T+B+ QT	024 meses	Sequim	23/07/2007		4	0
130	49	IB 2	Adenoca	W. Meigs	4,5x 4,0	2	Sim	0,6 cm	Tele+Braqui	023 meses	Sequim	13/08/2007		3	0
131	43	IB 2	CEC	W. Meigs	3,0 x 3,0	2	Não	1,0 cm	Tele+Braqui	022 meses	Sequim	01/08/2007		9	0
132	45	IB 2	Adenoca	W. Meigs	3,5 x 3,0	1	Não	0,3 cm	Não	024 meses	Sequim	18/07/2005		2	0
133	46	IB 1	CEC	W. Meigs	2,5 x 1,8	3	Não	0,7 cm	Não	021 meses	Sequim	15/10/2007		0	0
134	43	II A	CEC	W. Meigs	5,0 x 4,5	3	Sim	0,8 cm	Tele+Braqui	021 meses	Sequim	19/10/2007		3	0
135	31	IB 2	Adenoca	W. Meigs	3,0 x 3,0	1	Sim	0,8 cm	Não	022 meses	Sequim	21/09/2007		3	0
136	43	II A	Adenoca	W. Meigs	4,0 x 4,0	1	Sim	1,0 cm	Tele+Braqui	021 meses	Sequim	08/10/2007		4	0
137	52	II A	CEC	W. Meigs	4,0 x 3,0	2	Sim	1,5 cm	Tele+Braqui	024 meses	Sequim	30/07/2007		4	10%
138	41	IB 2	CEC	W. Meigs	2,0 x 1,5	2	Não	0,3 cm	Não	021 meses	Sequim	15/10/2007		4	0
139	52	II A	CEC	W. Meigs	4,5 x 2,1	2	Não	1,0 cm	Tele+Braqui	021 meses	Sequim	29/10/2007		4	0
140	41	IB 2	CEC	W. Meigs	7,0 x 6,0	2	Sim	1,0 cm	Tele+Braqui	021 meses	Sequim	19/10/2007		4	0
141	43	IB 1	Adenoca	W. Meigs	1,1x 0,5	3	Sim	0,5 cm	Braqui	021 meses	Sequim	30/10/2007		3	0
142	60	IB 1	Adenoca	W. Meigs	4,0 x 4,0	2	Sim	1,0 cm	Tele+Braqui	019 meses	Sequim	14/12/2007		4	0
143	66	II A	CEC	W. Meigs	3,0 x 3,0	3	Sim	1,0 cm	Não	147 meses	Sequim	28/04/1997		3	0
144	62	IB 1	CEC	W. Meigs	3,5 x 1,2	2	sim	0,2 cm	Braqui	91 meses	óbito	04/02/1999	02/09/2006	3	0

APÊNDICE B - PROTOCOLO DE PESQUISA CARCINOMA DE COLO DE ÚTERO

- 1- Nome da paciente _____
- 2- Idade _____
- 3- Número Prontuário _____
- 4- Estádio clínico I II
- 5- Tipo Histológico Bx colo células escamosas adenocarcinoma
 adeno-escamoso
- 6- Tipo de cirurgia _____
- 7- Tamanho tumor ___x___x___
- 8- Extensão paramétrio sim não
- 9- Extensão vagina sim não
- 10- Corpo útero sim não
- 11- Número linfonodos retirados e acometidos (___/___)
- 12- Grau histológico 1 2 3
- 13- Comprometimento vascular peritumoral sim não
- 14- Nível de infiltração parede cervical _____ mm

ANEXO A – PARECER ÉTICO**APROVAÇÃO**


A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 10/09/2008, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0729/08**, intitulado: "**AVALIAÇÃO DA LINFANGIOGÊNESE EM CARCINOMA DE COLO DE ÚTERO**" apresentado pelo Departamento de **OBSTETRÍCIA E GINECOLOGIA**.

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

Pesquisador (a) Responsável: **Jesus Paula Carvalho**

Pesquisador (a) Executante: **Fabírcia Leal Zaganelli**

CAPPesq, 11 de Setembro de 2008



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

9. REFERÊNCIAS

1. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int J Cancer* 1999; 80(6):827-41.
2. Instituto Nacional do Câncer - INCA. Incidência de câncer no Brasil. In: CdPeVE, editor. Rio de Janeiro: INCA; 2005.
3. INCA. Estimativa 2008. In: INCA, editor. [citado 22 dez 2009]. Disponível em:
<http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/tabelasestados.asp?UF=BR;>
2008.
4. INCA INdC. Estimativa 2010 - Incidência de Câncer no Brasil - INCA. [citado 22 dez. 2009]. Disponível em:
<http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/tabelaestados.asp?UF=BR;>
2010.
5. Derossi SA, Aquino E, Silva LM. Evolução da mortalidade e anos potenciais de vida perdidos por câncer cérvico-uterino em Salvador. *Rev Bras Cancerol* 2001; 47(2):163-70.
6. Trimble EL. Cervical cancer state-of-the-clinical-science meeting on pretreatment evaluation and prognostic factors, September 27-28, 2007: proceedings and recommendations. *Gynecol Oncol* 2009; 114(2):145-50.
7. Lanciano RM, Martz K, Coia LR, Hanks GE. Tumor and treatment factors improving outcome in stage III-B cervix cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1991; 20(1):95-100.
8. Tavares MB, Sousa RB, Oliveira e Silva T, Moreira LA, Silva LT, Tavares CB, *et al.* Prevalence of prognostic factors for cancer of the uterine cervix after radical hysterectomy. *Sao Paulo Med J* 2009; 127(3):145-9.
9. Achen MG, Stacker SA. Molecular control of lymphatic metastasis. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1131:225-34.
10. Yamanashi T, Nakanishi Y, Fujii G, Akishima-Fukasawa Y, Moriya Y, Kanai Y, *et al.* Podoplanin expression identified in stromal fibroblasts as a favorable prognostic marker in patients with colorectal carcinoma. *Oncology* 2009; 77(1):53-62.
11. Lim CS, Alexander-Sefre F, Allam M, Singh N, Aleong JC, Al-Rawi H, *et al.* Clinical value of immunohistochemically detected lymphovascular

- space invasion in early stage cervical carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2008; 15(9):2581-8.
12. Herr D, König J, Heilmann V, Koretz K, Kreienberg R, Kurzeder C. Prognostic impact of satellite-lymphovascular space involvement in early-stage cervical cancer. *Ann Surg Oncol* 2009; 16(1):128-32.
 13. Das S, Skobe M. Lymphatic vessel activation in cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1131:235-41.
 14. Stacker SA, Achen MG, Jussila L, Baldwin ME, Alitalo K. Lymphangiogenesis and cancer metastasis. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(8):573-83.
 15. Saharinen P, Petrova TV. Molecular regulation of lymphangiogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1014:76-87.
 16. Longatto-Filho A, Pinheiro C, Pereira SM, Etlinger D, Moreira MA, Jubé LF, *et al.* Lymphatic vessel density and epithelial D2-40 immunoreactivity in pre-invasive and invasive lesions of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 2007; 107(1):45-51.
 17. Saptefrati L, Cimpean AM, Ciornii A, Ceausu R, Esanu N, Raica M. Identification of lymphatic vessels and prognostic value of lymphatic microvessel density in lesions of the uterine cervix. *Rom J Morphol Embryol* 2009; 50(4):589-94.
 18. Van der Auwera I, Cao Y, Tille JC, Pepper MS, Jackson DG, Fox SB, *et al.* First international consensus on the methodology of lymphangiogenesis quantification in solid human tumours. *Br J Cancer* 2006; 95(12):1611-25.
 19. Raica M, Cimpean AM, Ribatti D. The role of podoplanin in tumor progression and metastasis. *Anticancer Res* 2008; 28(5B):2997-3006.
 20. Baluk P, McDonald DM. Markers for microscopic imaging of lymphangiogenesis and angiogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1131:1-12.
 21. Dumoff KL, Chu C, Xu X, Pasha T, Zhang PJ, Acs G. Low D2-40 immunoreactivity correlates with lymphatic invasion and nodal metastasis in early-stage squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Mod Pathol* 2005; 18(1):97-104.
 22. Wicki A, Christofori G. The potential role of podoplanin in tumour invasion. *Br J Cancer* 2007; 96(1):1-5.

23. Kawase A, Ishii G, Nagai K, Ito T, Nagano T, Murata Y, *et al.* Podoplanin expression by cancer associated fibroblasts predicts poor prognosis of lung adenocarcinoma. *Int J Cancer* 2008; 123(5):1053-9.
24. Yuan P, Temam S, El-Naggar A, Zhou X, Liu DD, Lee JJ, *et al.* Overexpression of podoplanin in oral cancer and its association with poor clinical outcome. *Cancer* 2006; 107(3):563-9.
25. Chuang WY, Yeh CJ, Wu YC, Chao YK, Liu YH, Tseng CK, *et al.* Tumor cell expression of podoplanin correlates with nodal metastasis in esophageal squamous cell carcinoma. *Histol Histopathol* 2009; 24(8):1021-7.
26. Michel G MP, Castaigne D, Leblanc M, Rey A, Duvillard P. Lymphatic spread in stage IB and II cervical carcinoma. *Obstet Gynecol* 1998; 91(3):360-3.
27. Piura B, Rabinovich A, Friger M. Number and distribution of pelvic lymph nodes and effect of surgical pathologic factors on pelvic lymph node *status* in patients with early-stage cervical carcinoma treated with radical hysterectomy and pelvic lymph node dissection. *Eur J Gynaecol Oncol* 2006; 27(5):463-6.
28. Achen MG, Mann GB, Stacker SA. Targeting lymphangiogenesis to prevent tumour metastasis. *Br J Cancer* 2006; 94(10):1355-60.
29. Singh N, Arif S. Histopathologic parameters of prognosis in cervical cancer- a review. *Int J Gynecol Cancer* 2004; 14(5):741-50.
30. Piura B, Rabinovich A, Friger M. Surgical pathologic factors in patients with early-stage cervical carcinoma treated with radical hysterectomy and pelvic lymph node dissection: association with administration of adjuvant radiotherapy and effect on survival. *Eur J Gynaecol Oncol* 2006; 27(6):573-8.
31. Witte MH, Bernas MJ, Martin CP, Witte CL. Lymphangiogenesis and lymphangiodysplasia: from molecular to clinical lymphology. *Microsc Res Tech* 2001; 55(2):122-45.
32. Tille JC, Pepper MS. Hereditary vascular anomalies: new insights into their pathogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24(9):1578-90.
33. Sabin FR. On the origin of the lymphatic system from the veins and the development of lymph hearts and thoracic duct in the pig. *Am J Anat* 1902; 1:367-91.

34. Huntington GS, McClure CFW. The anatomy and development of the jugular lymph sac in the dome(*Felis domestica*). *Am J Anat* 1910; 10:177-311.
35. Al-Rawi MA, Mansel RE, Jiang WG. Lymphangiogenesis and its role in cancer. *Histol Histopathol* Jan 2005; 20(1):283-98.
36. Folkman J. Tumor angiogenesis and tissue factor. *Nat Med* 1996; 2(2):167-8.
37. Fisher B, Fisher ER. Role of the lymphatic system in dissemination of tumour. *Lymph* 1966:324.
38. Leu AJ, Berk DA, Lymboussaki A, Alitalo K, Jain RK. Absence of functional lymphatics within a murine sarcoma: a molecular and functional evaluation. *Cancer Res* 2000; 60(16):4324-7.
39. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; 407(6801):249-57.
40. Jain RK. Transport of molecules in the tumor interstitium: a review. *Cancer Res* 1987; 47(12):3039-51.
41. Tanigawa N, Kanazawa T, Satomura K, Hikasa Y, Hashida M, Muranishi S, *et al.* Experimental study on lymphatic vascular changes in the development of cancer. *Lymphology* 1981; 14(4):149-54.
42. Hartveit E. Attenuated cells in breast stroma: the missing lymphatic system of the breast. *Histopathology* 1990; 16(6):533-43.
43. Baxter LT, Jain RK. Transport of fluid and macromolecules in tumors. II. Role of heterogeneous perfusion and lymphatics. *Microvasc Res* 1990; 40(2):246-63.
44. Jackson DG, Prevo R, Clasper S, Banerji S. LYVE-1, the lymphatic system and tumor lymphangiogenesis. *Trends Immunol* 2001; 22(6):317-21.
45. Pepper MS. Lymphangiogenesis and tumor metastasis: myth or reality? *Clin Cancer Res* 2001; 7(3):462-8.
46. Karkkainen MJ, Alitalo K. Lymphatic endothelial regulation, lymphoedema, and lymph node metastasis. *Semin Cell Dev Biol* 2002; 13(1):9-18.
47. Maula SM, Luukkaa M, Grenman R, Jackson D, Jalkanen S, Ristamaki R. Intratumoral lymphatics are essential for the metastatic spread and

- prognosis in squamous cell carcinomas of the head and neck region. *Cancer Res* 2003; 63(8):1920-6.
48. Franchi A, Gallo O, Massi D, Baroni G, Santucci M. Tumor lymphangiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma: a morphometric study with clinical correlations. *Cancer* 2004; 101(5):973-8.
 49. Kyzas PA, Geleff S, Batistatou A, Agnantis NJ, Stefanou D. Evidence for lymphangiogenesis and its prognostic implications in head and neck squamous cell carcinoma. *J Pathol* 2005; 206(2):170-7.
 50. Schoppmann SF, Birner P, Studer P, Breiteneder-Geleff S. Lymphatic microvessel density and lymphovascular invasion assessed by anti-podoplanin immunostaining in human breast cancer. *Anticancer Res* 2001; 21(4A):2351-5.
 51. Bono P, Wasenius VM, Heikkila P, Lundin J, Jackson DG, Joensuu H. High LYVE-1-positive lymphatic vessel numbers are associated with poor outcome in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10(21):7144-9.
 52. Nakamura Y, Yasuoka H, Tsujimoto M, Imabun S, Nakahara M, Nakao K, *et al.* Lymph vessel density correlates with nodal *status*, VEGF-C expression, and prognosis in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2005; 91(2):125-32.
 53. Straume O, Jackson DG, Akslen LA. Independent prognostic impact of lymphatic vessel density and presence of low-grade lymphangiogenesis in cutaneous melanoma. *Clin Cancer Res* 2003; 9(1):250-6.
 54. Dadras SS, Paul T, Bertoncini J, Brown LF, Muzikansky A, Jackson DG, *et al.* Tumor lymphangiogenesis: a novel prognostic indicator for cutaneous melanoma metastasis and survival. *Am J Pathol* 2003; 162(6):1951-60.
 55. Shields JD, Borsetti M, Rigby H, Harper SJ, Mortimer PS, Levick JR, *et al.* Lymphatic density and metastatic spread in human malignant melanoma. *Br J Cancer* 2004; 90(3):693-700.
 56. Massi D, Puig S, Franchi A, Malveyh J, Vidal-Sicart S, González-Cao M, *et al.* Tumour lymphangiogenesis is a possible predictor of sentinel lymph node *status* in cutaneous melanoma: a case-control study. *J Clin Pathol* 2006; 59(2):166-73.
 57. Birner P, Schindl M, Obermair A, Breiteneker G, Kowalski H, Oberhuber G. Lymphatic microvessel density as a novel prognostic factor in early-stage invasive cervical cancer. *Int J Cancer* 2001; 95(1):29-33.

58. Gombos Z, Xu X, Chu CS, Zhang PJ, Acs G. Peritumoral lymphatic vessel density and vascular endothelial growth factor C expression in early-stage squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Clin Cancer Res* 2005; 11(23):8364-71.
59. Birner P, Schindl M, Obermair A, Plank C, Breitenecker G, Kowalski H, *et al.* Lymphatic microvessel density in epithelial ovarian cancer: its impact on prognosis. *Anticancer Res* 2000; 20(5A):2981-5.
60. Sundar SS, Zhang H, Brown P, Manek S, Han C, Kaur K, *et al.* Role of lymphangiogenesis in epithelial ovarian cancer. *Br J Cancer* 2006; 94(11):1650-7.
61. Nakamura Y, Yasuoka H, Tsujimoto M, Kurozumi K, Nakahara M, Nakao K, *et al.* Importance of lymph vessels in gastric cancer: a prognostic indicator in general and a predictor for lymph node metastasis in early stage cancer. *J Clin Pathol* 2006; 59(1):77-82.
62. Miyata Y, Kanda S, Ohba K, Nomata K, Eguchi J, Hayashida Y, *et al.* Tumor lymphangiogenesis in transitional cell carcinoma of the upper urinary tract: association with clinicopathological features and prognosis. *J Urol* 2006; 176(1):348-53.
63. Renyi-Vamos F, Tovari J, Fillinger J, Timar J, Paku S, Kenessey I, *et al.* Lymphangiogenesis correlates with lymph node metastasis, prognosis, and angiogenic phenotype in human non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11(20):7344-53.
64. Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen T, van Hinsbergh VW, Fang GH, Dumont D, *et al.* Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92(8):3566-70.
65. Alitalo K. Vascular endothelial growth factors and receptors involved in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Eur J Cancer* 1997; 33:1017-.
66. Karkkainen MJ, Petrova TV. Vascular endothelial growth factor receptors in the regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Oncogene* 2000; 19(49):5598-605.
67. Karkkainen MJ, Jussila L, Ferrell RE, Finegold DN, Alitalo K. Molecular regulation of lymphangiogenesis and targets for tissue oedema. *Trends Mol Med* 2001; 7(1):18-22.
68. Karkkainen MJ, Ferrell RE, Lawrence EC, Kimak MA, Levinson KL, McTigue MA, *et al.* Missense mutations interfere with VEGFR-3 signalling in primary lymphoedema. *Nat Genet* 2000; 25(2):153-9.

69. Jussila L, Alitalo K. Vascular growth factors and lymphangiogenesis. *Physiol Rev* 2002; 82(3):673-700.
70. Breiteneder-Geleff S, Soleiman A, Kowalski H, Horvat R, Amann G, Kriehuber E, *et al.* Angiosarcomas express mixed endothelial phenotypes of blood and lymphatic capillaries: podoplanin as a specific marker for lymphatic endothelium. *Am J Pathol* 1999; 154(2):385-94.
71. Weninger W, Partanen TA, Breiteneder-Geleff S, Mayer C, Kowalski H, Mildner M, *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor receptor-3 and podoplanin suggests a lymphatic endothelial cell origin of Kaposi's sarcoma tumor cells. *Lab Invest* 1999; 79(2):243-51.
72. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 324(1):1-8.
73. Sleeman JP, Krishnan J, Kirkin V, Baumann P. Markers for the lymphatic endothelium: in search of the holy grail? *Microsc Res Tech* 2001; 55(2):61-9.
74. Kitadai Y, Amioka T, Haruma K, Tanaka S, Yoshihara M, Sumii K, *et al.* Clinicopathological significance of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C in human esophageal squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 2001; 93(5):662-6.
75. Kajita T, Ohta Y, Kimura K, Tamura M, Tanaka Y, Tsunozuka Y, *et al.* The expression of vascular endothelial growth factor C and its receptors in non-small cell lung cancer. *Br J Cancer* 2001; 85(2):255-60.
76. Clarijs R, Schalkwijk L, Ruiten DJ, de Waal RM. Lack of lymphangiogenesis despite coexpression of VEGF-C and its receptor Flt-4 in uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42(7):1422-8.
77. Nathanson SD, Zarbo RJ, Wachna DL, Spence CA, Andrzejewski TA, Abrams J. Microvessels that predict axillary lymph node metastases in patients with breast cancer. *Arch Surg* 2000; 135(5):586-93; discussion 93-4.
78. Partanen TA, Paavonen K. Lymphatic versus blood vascular endothelial growth factors and receptors in humans. *Microsc Res Tech* 2001; 55(2):108-21.
79. Birner P, Obermair A, Schindl M, Kowalski H, Breitenecker G, Oberhuber G. Selective immunohistochemical staining of blood and lymphatic vessels reveals independent prognostic influence of blood and

- lymphatic vessel invasion in early-stage cervical cancer. *Clin Cancer Res* 2001; 7(1):93-7.
80. Mouta Carreira C, Nasser SM, di Tomaso E, Padera TP, Boucher Y, Tomarev SI, *et al.* LYVE-1 is not restricted to the lymph vessels: expression in normal liver blood sinusoids and down-regulation in human liver cancer and cirrhosis. *Cancer Res* 2001; 61(22):8079-84.
 81. Nose K, Saito H, Kuroki T. Isolation of a gene sequence induced later by tumor-promoting 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in mouse osteoblastic cells (MC3T3-E1) and expressed constitutively in ras-transformed cells. *Cell Growth Differ* 1990; 1(11):511-8.
 82. Wetterwald A, Hoffstetter W, Cecchini MG, Lanske B, Wagner C, Fleisch H, *et al.* Characterization and cloning of the E11 antigen, a marker expressed by the rat osteoblasts and osteocytes. *Bone* 1996; 18:125-32.
 83. Kaneko MK, Kato Y, Kitano T, Osawa M. Conservation of a platelet activating domain of Aggrus/podoplanin as a platelet aggregation-inducing factor. *Gene* 2006; 378:52-7.
 84. Kato Y, Fujita N, Kunita A, Sato S, Kaneko M, Osawa M, *et al.* Molecular identification of Aggrus/T1alpha as a platelet aggregation-inducing factor expressed in colorectal tumors. *J Biol Chem* 2003; 278(51):51599-605.
 85. Kato Y, Kaneko MK, Kunita A, Ito H, Kameyama A, Ogasawara S, *et al.* Molecular analysis of the pathophysiological binding of the platelet aggregation-inducing factor podoplanin to the C-type lectin-like receptor CLEC-2. *Cancer Sci* 2008; 99(1):54-61.
 86. Suzuki-Inoue K, Kato Y, Inoue O, Kaneko MK, Mishima K, Yatomi Y, *et al.* Involvement of the snake toxin receptor CLEC-2, in podoplanin-mediated platelet activation, by cancer cells. *J Biol Chem* 2007; 282(36):25993-6001.
 87. Martín-Villar E, Scholl FG, Gamallo C, Yurrita MM, Muñoz-Guerra M, Cruces J, *et al.* Characterization of human PA2.26 antigen (T1alpha-2, podoplanin), a small membrane mucin induced in oral squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 2005; 113(6):899-910.
 88. Ordonez NG. Podoplanin: a novel diagnostic immunohistochemical marker. *Adv Anat Pathol* 2006; 13(2):83-8.
 89. Rishi AK, Joyce-Brady M, Fisher J, Dobbs LG, Floros J, VanderSpek J, *et al.* Cloning, characterization, and development expression of a rat lung alveolar type I cell gene in embryonic endodermal and neural derivatives. *Dev Biol* 1995; 167(1):294-306.

90. Schacht V, Dadras SS, Johnson LA, Jackson DG, Hong YK, Detmar M. Up-regulation of the lymphatic marker podoplanin, a mucin-type transmembrane glycoprotein, in human squamous cell carcinomas and germ cell tumors. *Am J Pathol* 2005; 166(3):913-21.
91. Breiteneder-Geleff S, Matsui K, Soleiman A, Meraner P, Poczewski H, Kalt R, *et al.* Podoplanin, novel 43-kd membrane protein of glomerular epithelial cells, is down-regulated in puromycin nephrosis. *Am J Pathol* 1997; 151(4):1141-52.
92. Schmid H, Henger A, Cohen CD, Frach K, Gröne HJ, Schlöndorff D, *et al.* Gene expression profiles of podocyte-associated molecules as diagnostic markers in acquired proteinuric diseases. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14(11):2958-66.
93. Levidiotis V, Power DA. New insights into the molecular biology of the glomerular filtration barrier and associated disease. *Nephrology (Carlton)* 2005; 10(2):157-66.
94. Schacht V, Ramirez MI, Hong YK, Hirakawa S, Feng D, Harvey N, *et al.* T1alpha/podoplanin deficiency disrupts normal lymphatic vasculature formation and causes lymphedema. *EMBO J* 2003; 22(14):3546-56.
95. Ramirez MI, Millien G, Hinds A, Cao Y, Seldin DC, Williams MC. T1alpha, a lung type I cell differentiation gene, is required for normal lung cell proliferation and alveolus formation at birth. *Dev Biol* 2003; 256(1):61-72.
96. Marks A, Bailey D, Iglesias J, Law J, Lei M, Yeger H, *et al.* Characterization and distribution of an oncofetal antigen (M2A antigen) expressed on testicular germ cell tumours. *Br J Cancer* 2000; 80:569-78.
97. Mäkinen T, Veikkola T, Mustjoki S, Karpanen T, Catimel B, Nice EC, *et al.* Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migratory signals via the VEGF-C/D receptor VEGFR-3. *EMBO J* 2001; 20(17):4762-73.
98. Ji RC, Eshita Y, Kato S. Investigation of intratumoural and peritumoural lymphatics expressed by podoplanin and LYVE-1 in the hybridoma-induced tumours. *Int J Exp Pathol* 2007; 88(4):257-70.
99. Vanderbilt JN, Dobbs LG. Characterization of the gene and promoter for RTI40, a differentiation marker of type I alveolar epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; 19(4):662-71.
100. Sipos B, Klapper W, Kruse ML, Kalthoff H, Kerjaschki D, Kloppel G. Expression of lymphangiogenic factors and evidence of intratumoral

- lymphangiogenesis in pancreatic endocrine tumors. *Am J Pathol* 2004; 165(4):1187-97.
101. Rubbia-Brandt L, Terris B, Giostra E, Dousset B, Morel P, Pepper MS. Lymphatic vessel density and vascular endothelial growth factor-C expression correlate with malignant behavior in human pancreatic endocrine tumors. *Clin Cancer Res* 2004; 10(20):6919-28.
 102. Dumoff KL, Chu CS, Harris EE, Holtz D, Xu X, Zhang PJ, *et al.* Low podoplanin expression in pretreatment biopsy material predicts poor prognosis in advanced-stage squamous cell carcinoma of the uterine cervix treated by primary radiation. *Mod Pathol* 2006; 19(5):708-16.
 103. Van Trappen PO, Pepper MS. Lymphangiogenesis in human gynaecological cancers. *Angiogenesis* 2005; 8(2):137-45.
 104. Shepherd JH. Revised FIGO staging for gynaecological cancer. *Br J Obstet Gynaecol* 1989; 96(8):889-92.
 105. Tavassoli FA. Pathology & genetics tumours of breast and female genital organs Lion. International Agency for Research on Cancer: IARC Press; 2003.
 106. Weibel ER. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. *Lab Invest* 1963; 12:131-55.
 107. Hall FT, Freeman JL, Asa SL, Jackson DG, Beasley NJ. Intratumoral lymphatics and lymph node metastases in papillary thyroid carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2003; 129(7):716-9.
 108. Pokkali S, Das RL. Expression of CXC and CC type of chemokines and its receptors in tuberculous and non-tuberculous effusions. *Cytokine* 2008; 41(3):307-14.
 109. Ran S, Volk L, Hall K, Flister MJ. Lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in breast cancer. *Pathophysiology*. In press 2009.
 110. Urabe A, Matsumoto T, Kimura M, Sonoue H, Kinoshita K. Grading system of lymphatic invasion according to D2-40 immunostaining is useful for the prediction of nodal metastasis in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Histopathology* 2006; 49(5):493-7.
 111. Miyakuni Y, Matsumoto T, Arakawa A, Sonoue H, Suzuki C, Takeda S. Lymphatic invasion according to D2-40 immunostaining is a predictor of nodal metastasis in endometrioid adenocarcinoma of the uterine corpus. *Pathol Int* 2008; 58(8):471-6.

112. Thierry J. Epithelial-mesenchymal transitions in tumor progression. *Nature Rev Cancer* 2002; 2:442-54.
113. Guarino M, Rubino B, Ballabio G. The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology. *Pathology* 2007; 39(3):305-18.
114. Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson EW. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol* 2006; 172(7):973-81.
115. Wicki A, Lehembre F, Wick N, Hantusch B, Kerjaschki D, Christofori G. Tumor invasion in the absence of epithelial-mesenchymal transition: podoplanin-mediated remodeling of the actin cytoskeleton. *Cancer Cell* 2006; 9(4):261-72.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)