

Relação entre Angiogênese e Estádio no Carcinoma do Endométrio

The Relationship between Endometrial Adenocarcinoma Staging and Angiogenesis

Neila Maria de Góis Speck, José Focchi, Antonio Correa Alves,
Cintia Aparecida Bueno Osório, Edmund Chada Baracat

RESUMO

Objetivo: *avaliar se o número de vasos neoformados é fator importante para o prognóstico do adenocarcinoma endometrial, comparando-o com o grau de diferenciação histológica e o estadiamento do tumor.*

Métodos: *foram estudadas 56 amostras de tecido endometrial, sendo 11 com o diagnóstico histológico de endométrio atrófico, 10 endométrios proliferativos (ambos caracterizados como grupos controle), 10 amostras de adenocarcinomas GI, 13 adenocarcinomas GII e 12 adenocarcinomas GIII, caracterizados como grupos de estudo. Dois cortes histológicos foram obtidos de cada caso: um foi corado pela hematoxilina-eosina e o outro, para estudo imunohistoquímico, foi tratado com anti-CD34, com a finalidade de corar vasos. A contagem vascular foi realizada na interface do crescimento tumoral com o estroma adjacente, em dez campos de 100 vezes de aumento, mediante estudo morfométrico pelo sistema computadorizado Kontron S300. No grupo controle, foi selecionada a interface entre glândulas endometriais e estroma adjacente.*

Resultados: *a média de vasos contados em 10 campos foi de 11,6 para o endométrio atrófico; 13,2 para o proliferativo; 15,3 para o adenocarcinoma GI; 19 para o adenocarcinoma GII e 22,7 para o adenocarcinoma GIII. A média de quantificação vascular para os tumores das pacientes incluídas no estadiamento clínico I foi 18,6, semelhante estatisticamente àquelas dos estadiamentos II, III e IV (20,9) computados em conjunto.*

Conclusão: *concluimos que o adenocarcinoma pouco diferenciado apresenta maior número de vasos por campo que o endométrio normal e que o carcinoma bem diferenciado. A quantificação vascular não foi influenciada pelo estadiamento como fator isolado.*

PALAVRAS-CHAVE: *Angiogênese. Endométrio: carcinoma. Prognóstico.*

Introdução

O adenocarcinoma endometrial é a neoplasia maligna mais comum do trato genital nos Estados Unidos da América, correspondendo a 45% destas neoplasias¹. No Brasil, 11% dos tumores do trato genital comprometem o corpo uterino². Em 1998, de acordo com os dados do Ministério da

Saúde, ocorreram no Brasil 7,6 casos para 100.000 mulheres³. Conforme a Fundação Oncocentro, em avaliação de 10 anos (1987-1998) no Estado de São Paulo, a taxa de mortalidade por tumores do corpo uterino oscilou de 3,9 a 4,3/100.000 mulheres⁴.

Para predição do comportamento do carcinoma endometrial, os fatores prognósticos usualmente descritos são: o tipo histológico, o grau de diferenciação histológica, a infiltração miometrial, a citologia peritoneal, as metástases linfonodais e anexiais e a invasão do espaço linfovascular. Este último é considerado como fator prognóstico independente para o adenocarcinoma endometrial, pois ocorre em 35,3% dos casos metastáticos e só é observado quando existe infiltração do miométrio. Nos tumores limitados ao endométrio e com grau de diferenciação I (EC IA GI) não ocorre comprometimento de espaço linfovascular⁵.

Departamento de Ginecologia e Anatomia Patológica da Universidade Federal de São Paulo/Escola Paulista de Medicina e Departamento de Anatomia Patológica do Instituto Brasileiro do Controle do Câncer, São Paulo.

Correspondência:

Neila Maria de Góis Speck
Rua Gabriele D'Annunzio, 1400 - ap 6V - Campo Belo
04619-005 - São Paulo - SP - Brasil
Fone: (11) 5543-7325 / Fax: (11) 5543-6682
e-mail: nezespeck@uol.com.br

A angiogênese, por ser fator independente e aplicável na prática para todos os tumores sólidos, é considerada como bom indicador de prognóstico. Assim, no carcinoma prostático, Wakui et al.⁶ mostram que a densidade de microvasos apresenta-se aumentada nos tumores de alto grau e nos casos metastáticos. No melanoma cutâneo e *nevus* displásico atípico grave, Barnhill et al.⁷ observaram que o número de microvasos era maior em relação ao *nevus* comum. Em carcinoma da mama, Horak et al.⁸ descrevem número mais elevado de vasos em carcinomas com linfonodos axilares positivos e pouco diferenciados, bem como nos tumores associados a menor sobrevida.

No trato genital, a angiogênese tumoral é bem estudada no colo uterino. Observou-se que a neoplasia intra-epitelial cervical grau III apresenta maior número de vasos quando comparada às lesões de baixo grau⁹. No carcinoma de colo nos estádios clínicos IB e IIA, operados, há maior número de vasos quando os linfonodos pélvicos são positivos, o que se relaciona à menor sobrevida¹⁰. Entre as neoplasias do ovário, Hollingsworth et al.¹¹ citam que os tumores com densidade vascular mais alta apresentam maior risco para recidivas.

No endométrio, a angiogênese é observada em condições fisiológicas, como na fase proliferativa inicial do ciclo menstrual e na implantação do ovo fecundado. Estas situações seriam mediadas pelos esteróides ovarianos^{12,13}. Já nas condições neoplásicas do endométrio, Sivridis¹⁴ descreveu maior concentração vascular no carcinoma quando comparada ao endométrio atrófico ou hiperplásico. Esta atividade angiogênica está diretamente relacionada a maior expressão do fator de crescimento vascular endotelial, bem como a tumores com invasão miometrial mais profunda. Abulafia et al.¹⁵ observaram que a hiperplasia complexa e o adenocarcinoma são eficientes indutores de angiogênese quando comparados ao endométrio normal e à hiperplasia simples, principalmente quando se estudam tumores com infiltração miometrial. Os carcinomas moderadamente diferenciados mostraram-se também com maior concentração de vasos quando comparados aos bem diferenciados. Salvesen et al.¹⁶ relacionaram a densidade de microvasos aumentada com o decréscimo da sobrevida nos tumores nos estádios III e IV. Não encontraram, porém, relação com grau ou tipo histológico. Wagatsuma et al.¹⁷ correlacionaram a maior angiogênese com carcinomas pouco diferenciados, nos estádios III e I e com linfonodos positivos e em pacientes com menor sobrevida.

O grau histológico é reconhecido como importante fator prognóstico. O estadiamento, que é na atualidade clínico-cirúrgico (FIGO, 1989)¹⁸, é

capaz de indicar claramente o grupo de pacientes sob maior risco para má evolução. A neovascularização, conforme os trabalhos citados, por sua vez, tem-se mostrado fator indicador de pior prognóstico. Assim, em face de poucos trabalhos de literatura que correlacionassem estes três importantes fatores, propusemo-nos a estudar quantitativamente a atividade angiogênica do adenocarcinoma endometrial do tipo endometrióide, relacionando com o estágio clínico e os graus de diferenciação histológica.

Pacientes e Métodos

O material de estudo foi coletado do Serviço de Anatomia Patológica do Instituto Brasileiro do Controle do Câncer, uma instituição pública. Selecionamos para o grupo de estudo blocos de parafina de peças cirúrgicas que contivessem adenocarcinoma endometrióide do endométrio. As pacientes haviam sido tratadas com histerectomia total abdominal, salpingooforectomia bilateral, linfadenectomia pélvica e paraórtica segmentar ou seletiva e omentectomia parcial. Para o grupo controle utilizamos blocos provenientes de histerectomia abdominal ou vaginal indicadas por doenças benignas e cujo endométrio fosse atrófico ou proliferativo.

Os espécimes histopatológicos foram submetidos a revisão histopatológica por três patologistas. Os critérios finais de inclusão foram: tumor do tipo endometrióide e concordância quanto ao grau histológico. Os critérios de exclusão foram: discordância quanto ao tipo e grau histológico, tratamento prévio por radioterapia, quimioterapia ou hormonioterapia. Os tumores GIII com irregularidade da interface tumor-estroma e necrose acentuada também foram excluídos devido ao fato de a contagem vascular apresentar-se prejudicada, em especial pela ocultação dos pequenos vasos.

Foram incluídos 56 blocos, dos quais 11 tinham diagnóstico histológico de endométrio atrófico; 10 de endométrio proliferativo, 10 de adenocarcinoma bem diferenciado (GI), 13 de adenocarcinoma moderadamente diferenciado (GII) e 12 com adenocarcinoma pouco diferenciado (GIII).

Os cortes histológicos foram corados pela hematoxilina-eosina para análise inicial. A avaliação do número de vasos foi feita por imunohistoquímica, com o uso do anticorpo anti-CD34, cujo antígeno está presente na membrana citoplasmática das células endoteliais. Estas células, assim tratadas, adquiriram coloração acastanhada com o anticorpo, o que nos permitiu fa-

cilmente identificar o vaso. Convencionou-se como unidade vascular, a presença de células coradas em castanho margeando o lúmen.

A quantificação de vasos foi feita com auxílio de sistema computadorizado de análise digital de imagem (Kontron Imaging System - KS300). O sistema consiste de um microscópio acoplado a uma videocâmera JVC colorida, que transmite a imagem a um computador 486 equipado com placa digitalizadora e *software* Kontron em ambiente Windows 95.

No grupo de estudo avaliamos os vasos da interface do crescimento tumoral com o estroma adjacente e no grupo controle, da interface entre as glândulas endometriais e o estroma. A contagem foi realizada por dois observadores, com identificação pontual interativa em campo constante; os observadores desconheciam o estágio e a evolução da paciente. Foram contados os vasos em 10 campos de 100 vezes de aumento. No total, obtivemos 560 campos analisados, com 8180 vasos.

Foram feitas, para cada caso, contagem de vasos em 10 campos, escolhidos na área de maior concentração vascular. Ao final obtinham-se médias para cada caso e grupo. Isto nos permitiu usar, para efeito de análise de possível diferença do número de vasos entre os grupos, a análise de variância para médias independentes, complementada pelo teste de Scheffé, quando necessário. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para avaliar possíveis diferenças entre os grupos com o estadiamento clínico diferente. O nível de rejeição para a hipótese de nulidade foi fixado sempre em um valor menor ou igual a 0,05¹⁹.

O projeto teve aprovação da Comissão de Ética da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina.

Resultados

A distribuição das médias de vasos por grupo nas 35 mulheres com adenocarcinoma do endométrio (GI, GII e GIII) nos diferentes estádios clínicos e o resultado da análise estatística são apresentados na Tabela 1. Observamos no grupo de pacientes incluídas no estágio I (20 casos) que a média do número de vasos (18,6) foi semelhante àquela observada nos 15 casos dos estádios II, III e IV (20,9) computados em conjunto (z calc = -0,467 NS).

A média do número de vasos em dez campos obtida em cada um dos grupos é apresentada na Tabela 2, sendo para endométrio atrófico: 11,6; proliferativo: 13,2; adenocarcinoma GI: 15,3; GII 19,0 e GIII: 22,7. Utilizando a análise de variância, complementada pelo teste de Scheffé, os carcino-

mas GIII mostram maior número de vasos por campo do que os grupos controle e que os carcinomas GI. Os carcinomas GII, por sua vez, mostram maior quantidade de vasos em comparação com o endométrio atrófico, porém, a medida não difere da do endométrio proliferativo. Os carcinomas GI não se mostram mais angiogênicos em relação aos grupos controle. Os carcinomas GI e GII não diferiram entre si, bem como o carcinoma GII do GIII.

Tabela 1 - Distribuição das médias de número de vasos do adenocarcinoma nos graus histológicos I, II e III, nos diferentes estádios clínicos (EC).

Estádio	EC I	ECII	ECIII	ECIV
Diferenciação				
GI	15,9 (8)	14,8 (1)	10,5 (1)	—
GII	19,6 (7)	12,9 (1)	19,4 (5)	—
GIII	21,6 (5)	24,9 (2)	21,8 (3)	24,2 (2)
Média	18,6	19,4	19,2	24,2

Teste de Mann-Whitney

z calc = -0,467 NS

() número de casos

Tabela 2 - Médias dos números de vasos em 10 campos com 100 vezes de aumento segundo os grupos: atrófico, proliferativo, adenocarcinoma do endométrio GI, GII, GIII.

	Atrófico	Proliferativo	Adeno GI	Adeno GII	Adeno GIII
	10,3	11,2	14,6	19,2	28,6
	12,2	7,9	17,9	13,9	24,5
	10,8	15,2	14,9	22,8	23,7
	14,9	14,8	26,2	23,0	23,8
	11,9	19,0	14,8	28,4	17,6
	15,7	10,4	11,8	21,5	19,9
	11,9	11,7	12,8	17,0	32,8
	7,8	15,1	16,0	9,7	19,9
	10,3	11,1	13,0	27,6	19,1
	7,5	15,7	10,5	25,9	17,0
	13,8			11,3	24,0
				14,3	20,9
				12,9	
Média para cada grupo	11,6	13,2	15,3	19,0	22,7

Para avaliarmos possíveis diferenças entre as duas variáveis (estadiamento e grau de diferenciação), analisamos as médias do número de vasos no adenocarcinoma GI, GII e GIII nos diferentes estádios. Aplicando o teste de Mann-Whitney, observamos que nos carcinomas GI a média de vasos por campo dos oito casos do estadiamento I (15,9) não diferiu significativamente dos dois casos de carcinoma estadiados como II

e III (12,6) (z calc. = -1,044 NS). Entre os tumores GII, os sete casos no EC I (19,6) não diferiram dos seis EC II e III (16,1) (z calc. = -0,429 NS). Entre os carcinomas GIII, os cinco casos de EC I (21,6) não diferiram dos sete EC II, III e IV (23,6) (z calc. = -0,325 NS).

Discussão

O processo regenerativo do endométrio durante o ciclo menstrual ocorre às custas de neovascularização. O fenômeno angiogênico assume importância vital no processo da nidação ovular. Todos estes fenômenos são mediados pelos esteróides ovarianos^{12,13}.

Grande parte dos estudos a respeito da angiogênese utilizam, como marcador vascular imuno-histoquímico, o fator VIII (fator de von Willebrand). Porém, Ramani et al.²⁰, com esse marcador, notaram que o fundo estromal era intensamente corado, impossibilitando a avaliação correta da formação vascular. Ramani et al.²⁰ e Sankey et al.²¹ valeram-se de um novo anticorpo monoclonal para endotélio, o anti-CD34, que pode ser usado em tecidos fixados em formalina e parafinados rotineiramente. O antígeno CD34 é encontrado nas células progenitoras hematopoéticas e na membrana citoplasmática de células endoteliais, sendo assim bom marcador vascular. As células endoteliais, quando tratadas pelo anti-CD34, são coradas na cor castanha. Em nossa análise, utilizamos o anticorpo anti-CD34 para avaliar a angiogênese e observamos que a sua caracterização é fácil, pela coloração do vaso sanguíneo, distinguindo-o facilmente de todos os demais elementos estromais.

No adenocarcinoma endometrial, a neoangiogênese foi bem demarcada por Palczak e Splawinski²² que, por meio de implantes de tumor em membrana corioalantóide de embrião de galinha, mostraram ter alta atividade angiogênica. Segundo Abulafia et al.¹⁵, a hiperplasia complexa e o adenocarcinoma são angiogênicos. Estes mesmos autores observaram que no adenocarcinoma endometrióide no estágio I a maior profundidade de invasão e o maior grau de diferenciação estiveram diretamente relacionados com a intensidade de angiogênese.

Salvesen et al.¹⁶, medindo a densidade de microvasos, apontaram decréscimo da sobrevida em cinco anos nos casos com densidade aumentada. Do mesmo modo observaram maior concentração vascular nos estádios III e IV. Não observaram, no entanto, diferenças quanto ao tipo e grau histológico. Em publicação mais recente, em es-

tudo de desenho semelhante, Mazurek et al.²³ encontraram densidade angiogênica aumentada nos estádios mais avançados, mas, também, sem correlação com o grau de diferenciação.

Wagatsuma et al.¹⁷ descreveram a existência de relação entre a angiogênese induzida por adenocarcinomas do endométrio pouco diferenciados nos estádios III e IV e a presença de linfonodos positivos e menor sobrevida. Esses autores estudaram também fatores angiogênicos, como o fator de crescimento hepático (HGF), e expressão do seu receptor na forma de proto-oncogene (C-Met). O C-Met esteve fortemente presente nos estádios III e IV, no grau histológico III e nos casos com menor sobrevida, ao passo que o HGF somente nos casos com estágio avançado.

Já, em nosso estudo, concluímos que a capacidade de indução de angiogênese não variou em função do estadiamento clínico, quando comparamos os casos no estágio I com os dos estádios II, III e IV computados em conjunto, nem mesmo quando individualizamos os diferentes graus histológicos. Comparamos o estágio clínico I contra portadores II, III e IV em conjunto, pois a literatura é enfática em descrever decréscimo importante da sobrevida em cinco anos para os casos com doença que se estende além do corpo uterino. De fato, a FIGO¹⁸ cita sobrevida de menos de 60% para os casos no estágio II.

O número de vasos no carcinoma de endométrio GIII foi significativamente superior ao observado nos endométrios atrófico e proliferativo e nos carcinomas GI. Isto nos leva a supor que a maior intensidade de angiogênese é de fato indicador de mau prognóstico.

O número de vasos no carcinoma de endométrio GII foi significativamente superior ao do endométrio atrófico, mas semelhante ao do endométrio proliferativo e ao carcinoma GI. Não houve também diferença em relação ao número de vasos observado nos carcinomas GIII. Vemos que os tumores GII só apresentam indução mais ativa da angiogênese quando comparados ao endométrio inativo. Diante de endométrio ativo, estrogênicamente estimulado, seu comportamento é variável. Podem ser semelhantes ao do tumor GI, de bom prognóstico, como observamos em alguns casos, ou então assemelhando-se ao tumor GIII, com grande número de vasos. Os comportamentos angiogênicos do carcinoma GI, do endométrio proliferativo e do endométrio atrófico foram semelhantes.

Estes resultados mostram que a angiogênese é marcador prognóstico importante no carcinoma de endométrio. É factível em nosso meio e poderia constar rotineiramente nos laudos de anatomia patológica.

ABSTRACT

Purpose: to evaluate the significance of neoangiogenesis for the prognosis of endometrial carcinoma, by quantifying and comparing the vessels with the grade of histologic differentiation and tumor staging.

Methods: the 56 studied cases consisted of 11 atrophic endometria, 10 proliferative endometria, 10 GI, 13 GII and 12 GIII adenocarcinomas. Two histologic sections were obtained for each case: one was stained with hematoxylin-eosin and the other was sent for a immunohistochemical study with anti-CD34. The utilized histometric method was vessel counting at the tumoral growth interface with the adjacent stroma, and in the control group, at the endometrial gland interface with the stroma. Counting was done by a KS300, evaluating 10 fields at 100X magnification.

Results: the counted vessel means were 11.6 for atrophic endometria, 13.2 for proliferative endometria, 15.3 for GI adenocarcinoma, 19 for GII adenocarcinoma, and 22.7 for GIII adenocarcinoma. In the group of stage I patients, it was observed that the mean number of vessels (18.6) was similar to that observed in stages II, III and IV (20.9) computed together. **Conclusion:** less differentiated adenocarcinomas were more angiogenic than well-differentiated carcinomas and normal endometrium. Vessel counting was not influenced by the disease stage as an isolated factor.

KEYWORDS: Angiogenesis. Adenocarcinoma. Endometrium.

Referências

- Homesley HD, Zaino R. Endometrial cancer: prognostic factors. *Semin Oncol* 1994; 21:71-8.
- Brumini R, Torloni H, Henson DE, Gutlieb SLD, Souza JMP. Câncer no Brasil: dados histopatológicos 1976-80. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde; 1982. p.482.
- INCA - Instituto Nacional do Câncer. Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil 1998. Rio de Janeiro: Pro-Onco/INCA; 1998. p.18.
- Fundação Oncocentro. Taxa de mortalidade: câncer do corpo uterino (1987-1998) no Estado de São Paulo [cited 2002 fev]. Available from: http://www.fosp.saude.sp.gov.br/html/epid_bas.html.
- Góis NM, Martins NV, Abrão FS, Lima GR, Alves AC. Peritumorous lymph-vascular invasion, grade of histologic differentiation, and myometrial infiltration as prognostic factors of endometrial carcinoma. *Rev Paul Med* 1993; 111:385-90.
- Wakui S, Furusato M, Itoh T, et al. Tumour angiogenesis in prostatic carcinoma with and without bone marrow metastasis: a morphometric study. *J Pathol* 1992; 168:257-62.
- Barnhill RL, Fandrey K, Levy MA, Mihm MC Jr, Hyman B. Angiogenesis and tumor progression of melanoma. quantification of vascularity in melanocytic nevi and cutaneous malignant melanoma. *Lab Invest* 1992; 67:331-7.
- Horak ER, Leek R, Klenk N, et al. Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer. *Lancet* 1992; 340:1120-4.
- Smith-McCune KK, Weidner N. Demonstration and characterization of the angiogenic properties of cervical dysplasia. *Cancer Res* 1994; 54:800-4.
- Bremer GL, Tiebosch AT, van der Putten HW, Schouten HJ, de Haan J, Arends JW. Tumor angiogenesis: an independent prognostic parameter in cervical cancer. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 174:126-31.
- Hollingsworth HC, Kohn EC, Steinberg SM, Rothenberg ML, Merino MJ. Tumor angiogenesis in advanced stage ovarian carcinoma. *Am J Pathol* 1995; 147:33-41.
- Presta M. Sex hormones modulate the synthesis of basic fibroblast growth factor in human endometrial adenocarcinoma cells: implications for the neovascularization of normal and neoplastic endometrium. *J Cell Physiol* 1988; 137:593-7.
- Smith SK. Regulation of angiogenesis in the endometrium. *Trends Endocrinol Metab* 2001; 12:147-51.
- Sivridis E. Angiogenesis and endometrial cancer. *Anticancer Res* 2001; 21:4383-8.
- Abulafia O, Triest WE, Sherer DM, Hansen CC, Ghezzi F. Angiogenesis in endometrial hyperplasia and stage I endometrial carcinoma. *Obstet Gynecol* 1995; 86:479-85.
- Salvesen HB, Iversen OE, Akslen LA. Independent prognostic importance of microvessel density in endometrial carcinoma. *Br J Cancer* 1998; 77:1140-4.
- Wagatsuma S, Konno R, Sato S, Yajima A. Tumor angiogenesis, hepatocyte growth factor, and c-Met expression in endometrial carcinoma. *Cancer* 1998; 82:520-30.
- FIGO - Federation International of Gynecology and Obstetrics. Annual report on the results of treatment in gynecological cancer. *Int J Gynaecol Obstet* 1989; 28:189-90.
- Snedecor GW. *Metodos de estadística: su aplicación a experimentos en agricultura y biología*. 1ª ed. Buenos Aires: Acme; 1948. p.577.
- Ramani P, Bradley NJ, Fletcher CD. QBEND/10, a new monoclonal antibody to endothelium: assessment of its diagnostic utility in paraffin sections. *Histopathology* 1990; 17:237-42.
- Sankey EA, More L, Dhillon AP. QBEnd/10: a new immunostain for the routine diagnosis of Kaposi's sarcoma. *J Pathol* 1990; 161:267-71.
- Palczak R, Splawinski J. Angiogenic activity and neovascularization in adenocarcinoma of endometrium. *Int J Gynaecol Obstet* 1989; 29:343-57.
- Mazurek A, Pierzynski P, Niklinska W, Chyczewski L, Laudanski T. Angiogenesis and Bcl-2 protein expression in patients with endometrial carcinoma. *Neoplasma* 2002; 49:149-54.

Recebido em: 26/9/2003

Aceito com modificações em: 17/7/2003