

**Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto**  
**Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

---

**LEANDRO FREITAS COLTURATO**

**Avaliação Imuno-Histoquímica de  
Micrometástases Linfonodais no Câncer  
de Colo do Útero em Estádios Iniciais e  
Correlação com Recidiva Tumoral**

**São José do Rio Preto**

**2016**

**Leandro Freitas Colturato**

**Avaliação imuno-histoquímica de  
micrometástases linfonodais no câncer de  
colo do útero em estádios iniciais e  
correlação com recidiva tumoral**

Tese apresentada à Faculdade de  
Medicina de São José do Rio Preto  
para obtenção do Título de Doutor  
no Curso de Pós-graduação em  
Ciências da Saúde, Eixo Temático:  
Medicina Interna

**Orientador: Prof. Dr. Antônio Hélio Oliani**

**Co-orientador: Prof. Dr. Roney C. Signorini Filho**

**São José do Rio Preto**

**2016**

Colturato, Leandro Freitas

Avaliação imuno-histoquímica de micrometástases linfonodais no câncer de colo do útero em estádios iniciais e correlação com recidiva tumoral / Leandro Freitas Colturato

São José do Rio Preto, 2016

112 p.

Dissertação (Doutorado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP

Eixo Temático: Medicina Interna

Orientador: Prof. Dr. Antônio Hélio Oliani

Co-orientador: Prof. Dr. Roney Cesar Signorini Filho

1. Colo do útero; 2. Neoplasias do colo do útero; 3. Imuno-Histoquímica; 4. Micrometástase de neoplasia; 5. Recidiva.

LEANDRO FREITAS COLTURATO

Avaliação Imuno-Histoquímica de Micrometástases  
Linfonodais no Câncer de Colo do Útero em Estádios  
Iniciais e Correlação com Recidiva Tumoral

BANCA EXAMINADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Antônio Hélio Oliani

Examinador: Prof. Dr. José Carlos Pascalicchio

Examinador: Prof. Dr. Altamiro Ribeiro Dias Junior

Examinador: Prof. Dr. Mário Abbud Filho

Examinador: Prof. Dr. Maurício Lacerda Nogueira

Suplente: Prof. Dr. Renato Moretti Marques

Suplente: Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos

São José do Rio Preto, 18 de Março de 2016.

## SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	i
AGRADECIMENTOS.....	ii
EPÍGRAFE.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE TABELAS.....	xiii
LISTA DE QUADROS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xi
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
1 INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Epidemiologia do câncer do colo do útero.....	02
1.2 Neoplasia intraepitelial e invasora do colo do útero.....	06
1.3 Tratamento do câncer do colo do útero.....	10
1.4 Fatores de risco associados à recorrência e sobrevida.....	14
1.5 Sistema linfático e micrometástases.....	18
OBJETIVOS.....	24
2 MATERIAL E MÉTODO.....	25
2.1 Casuística.....	27
2.2 Análise histológica.....	29
2.3 Análise imuno-histoquímica.....	29
2.4 Variáveis do estudo.....	31
2.5 Análise estatística.....	31

3	RESULTADOS .....	33
3.1	Variáveis associadas à presença de recidiva tumoral.....	35
3.1.1	Análise univariada.....	35
3.1.2	Regressão logística múltipla.....	43
3.2	Variáveis associadas à presença de micrometástase linfonodal nos linfonodos pélvicos .....	44
4	DISCUSSÃO.....	48
5	CONCLUSÕES.....	62
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
	APÊNDICES .....	84
	ANEXOS.....	96

**Dedico este trabalho**

À meu querido pai, Luiz Fernando; ídolo, melhor amigo e  
espelho de vida.

À minha querida mãe, Lucy; amada, caráter inigualável e  
verdadeira razão deste trabalho.

À minha esposa, Andressa; companheira de todo o  
sempre, escolhida por Deus para me guiar.

Meu eterno muito obrigado pelo carinho, amor e  
capacidade de trazerem a paz ao meu dia a dia.

Amo vocês acima de tudo e todos.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Antônio Hélio Oliani, Professor Livre-docente e Chefe do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP, um exemplo de humanidade e busca pelo conhecimento. Obrigado pela amizade desenvolvida nos últimos anos e, principalmente, pelas ocasiões em que precisei exclusivamente do senhor e fui pontualmente correspondido.

Ao Dr. Roney César Signorini Filho, chefe do Departamento de Ginecologia Oncológica do Centro de Referência da Saúde da Mulher do Estado de São Paulo – Hospital Pérola Byington, irmão de caráter inigualável que a medicina me deu sem qualquer custo. Sem dúvida alguma, o maior responsável pela elaboração completa deste trabalho.

À Dra. Raquel Civolani Marques Fernandes, chefe do Setor de Patologia do Centro de Referência da Saúde da Mulher do Estado de São Paulo – Hospital Pérola Byington, amizade que levarei como um dos maiores ganhos que este trabalho me proporcionou. Delicada com suas palavras e perfeita na análise patológica.

Ao Prof. Dr. Mário Abbud Filho, Coordenador do Programa de Pós-Graduação de Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP, pelo caprichoso e gentil gesto de ajuda na lapidação deste trabalho. Suas orientações jamais serão esquecidas.

Ao Prof. Dr. Maurício Lacerda Nogueira, Coordenador Geral dos Programas de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP, pelo grande apoio dispensado a mim.

Ao Prof. Dr. Alexandre Lins Werneck, Revisor/Tradutor – Revista Arquivos de Ciências da Saúde, Diretoria Adjunta de Pesquisa da Faculdade de Medicina

de São José do Rio Preto – FAMERP, pela brilhante revisão literária deste texto.

Aos Drs. Ademir Narciso de Oliveira Menezes, Altamiro Ribeiro Dias Jr., José Carlos Pascalicchio e Paulo César Feldner Jr., meus respeitados, amigos e queridos mentores, aos quais devo minha formação acadêmica e humana na medicina.

À Dra. Viviane Rigoni, irmã que Deus me presenteou aos 28 anos. Durante os dois anos de coleta de dados, me acolheu em sua casa de forma maternal e sem qualquer pedido de troca. Você estará comigo pra sempre.

À equipe técnica do Setor de Anatomia Patológica do Centro de Referência da Saúde da Mulher do Estado de São Paulo – Hospital Pérola Byington. Em nome da Sra. Marlene Barbosa Santos, agradeço profundamente as “meninas” do laboratório por todos os minutos gastos na busca incessante da perfeição deste trabalho. Sem vocês, este trabalho não teria sequer saído do imaginável.

Ao Centro de Referência da Saúde da Mulher do Estado de São Paulo – Hospital Pérola Byington, por permitir e aceitar a realização deste trabalho, disponibilizando o material técnico, humano e toda a estrutura necessária.

À Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP, em especial a Disciplina de Ginecologia e Obstetrícia, por ter me recebido como médico e pós-graduando sem qualquer manifesto de rejeição.

Às minhas adoráveis avós, Odete e Celina. A primeira tornava meus pensamentos mais fáceis em cada gesto de amor, com suas delicadas e tortuosas mãos na confecção de seus deliciosos e inigualáveis pratos de comida. A segunda, eu trocaria todo este projeto pela sua real presença aqui.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu,  
mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre  
aquilo que todo mundo vê.” (Arthur Schopenhauer)

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Comparação entre os grupos (Com recidiva tumoral vs Sem recidiva tumoral) em relação à variável Gestações.....38
- Figura 2** Comparação entre os grupos (Com recidiva tumoral vs Sem recidiva tumoral) em relação à variável Tamanho do maior eixo do tumor .....38
- Figura 3** Comparação entre os grupos (Com recidiva tumoral vs Sem recidiva tumoral) em relação à variável Micrometástase Linfonodal.....39
- Figura 4** Comparação entre os grupos (Com recidiva tumoral vs Sem recidiva tumoral) em relação à variável Estadiamento clínico .....39
- Figura 5** Comparação entre os grupos (Com recidiva tumoral vs Sem recidiva tumoral) em relação à variável Linfonodo negativo.....40
- Figura 6** Comparação entre os grupos (Com micrometástase linfonodal vs Sem micrometástase linfonodal) em relação à variável Profundidade de invasão estromal.....46
- Figura 7** Comparação entre Estadiamento (clínico e patológico) por grupo (Com recidiva tumoral vs Sem recidiva tumoral), excluindo-se a categoria IIA.....87

- Figura 8** Comparação entre Estadiamento (clínico e patológico) por grupo (Com recidiva tumoral vs Sem recidiva tumoral), agrupando-se os estadiamentos IB2 e IIA.....88
- Figura 9** Fotomicrografia de invasão angiolinfática em espécime de câncer de colo do útero. Avaliação pela técnica de hematoxilina-eosina, magnificação original = 100 vezes.....89
- Figura 10** Fotomicrografia de invasão angiolinfática em espécime de câncer de colo do útero. Avaliação pela técnica de imuno-histoquímica (D2-40), magnificação original = 400 vezes.....89
- Figura 11** Fotomicrografia de invasão angiolinfática em espécime de câncer de colo do útero. Avaliação pela técnica de imuno-histoquímica (D2-40), magnificação original = 400 vezes.....90
- Figura 12** Fotomicrografia de células tumorais isoladas em linfonodo pélvico em espécime de câncer de colo do útero. Avaliação pela técnica de imuno-histoquímica (AE1/AE3), magnificação original = 100 vezes.....  
.....90
- Figura 13** Fotomicrografia de micrometástase de dois milímetros em linfonodo pélvico em espécime de câncer de colo do útero. Avaliação pela técnica de imuno-histoquímica (AE1/AE3), magnificação original = 400 vezes.....91
- Figura 14** Fotomicrografia de micrometástase de 0,4 milímetros em linfonodo pélvico em espécime de câncer de colo do útero. Avaliação pela técnica de imuno-histoquímica (AE1/AE3),

magnificação original = 400 vezes.....

.....91

**Figura 15** Fotomicrografia de inclusão epitelial benigna em linfonodo pélvico em espécime de câncer de colo do útero. Avaliação pela técnica de imuno-histoquímica (AE1/AE3), magnificação original = 400 vezes.....

.....92

**Figura 16** Fotomicrografia de inclusão epitelial benigna em linfonodo pélvico em espécime de câncer de colo do útero. Avaliação pela técnica de imuno-histoquímica (AE1/AE3), magnificação original = 400 vezes.....

.....92

**Figura 17** Comparação entre Estadiamento (clínico e patológico) por grupo (Com micrometástase linfonodal vs Sem micrometástase linfonodal), excluindo-se a categoria IIA.....94

**Figura 18** Comparação entre Estadiamento (clínico e patológico) por grupo (Com micrometástase linfonodal vs Sem micrometástase linfonodal), agrupando-se os estadiamentos IB2 e IIA.....95

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Comparação entre os grupos (Com recidiva tumoral vs Sem recidiva tumoral) em relação às variáveis.....	35
<b>Tabela 2</b>	Comparação de invasão angio-linfática detectada pela técnica de imuno-histoquímica D2-40 e invasão angio-linfática detectada pela técnica de HE.....	42
<b>Tabela 3</b>	Resultado do modelo de regressão logística multivariado.....	43
<b>Tabela 4</b>	Comparação entre os grupos (Com micrometástase linfonodal vs Sem micrometástase linfonodal) em relação às variáveis.....	44
<b>Tabela 5</b>	Mortalidade por câncer de colo do útero entre os grupos (Com micrometástase linfonodal vs Sem micrometástase linfonodal).....	47
<b>Tabela 6</b>	Comparação dos estadiamentos (clínico e patológico) no geral.....	85
<b>Tabela 7</b>	Comparação dos estadiamentos (clínico e patológico) no geral.....	85
<b>Tabela 8</b>	Comparação dos estadiamentos (clínico e patológico) por grupo (Com recidiva tumoral vs Sem recidiva tumoral).....	86
<b>Tabela 9</b>	Comparação dos estadiamentos (clínico e patológico) por grupo (Com recidiva tumoral vs Sem recidiva tumoral).....	87

<b>Tabela 10</b>	Comparação dos estadiamentos (clínico e patológico) por grupo (Com micrometástase linfonodal vs Sem micrometástase linfonodal).....	93
<b>Tabela 11</b>	Comparação dos estadiamentos (clínico e patológico) por grupo (Com micrometástase linfonodal vs Sem micrometástase linfonodal).....	94

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b>	Classificação histológica dos tumores epiteliais de colo do útero.....	97
<b>Quadro 2</b>	Classificação de Piver e Rutledge para hysterectomias (1974).....	100
<b>Quadro 3</b>	Classificação de Querleu e Morrow para hysterectomias e linfadenectomias (2007).....	101
<b>Quadro 4</b>	Critérios histopatológicos de risco para indicação de tratamento adjuvante radioquimioterápico.....	103
<b>Quadro 5</b>	Taxas de sobrevida em cinco anos para câncer de colo do útero pelo estadiamento da FIGO.....	104
<b>Quadro 6</b>	Porcentagem de metástase linfonodal pélvica e para-aórtica pelo estadiamento clínico.....	105
<b>Quadro 7</b>	Critérios estabelecidos pela União Internacional Contra o Câncer para o diagnóstico diferencial entre micrometástases e células tumorais isoladas.....	106
<b>Quadro 8</b>	Critérios utilizados para diferenciação entre inclusões epiteliais e metástases nos linfonodos da pelve.....	111
<b>Quadro 9</b>	Variáveis utilizadas para avaliar a associação com a micrometástase linfonodal e com a recorrência da doença.....	112

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<b>CCU</b>	Câncer de Colo Uterino
<b>HPV</b>	Papilomavírus Humano
<b>ACU</b>	Adenocarcinoma do Colo Uterino
<b>CCE</b>	Carcinoma de Células Escamosas
<b>MS</b>	Ministério da Saúde
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>DES</b>	Dietilestilbestrol
<b>RR</b>	Risco Relativo
<b>%</b>	Porcentagem
<b>HIV</b>	Vírus da Imunodeficiência Humana
<b>SIDA</b>	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
<b>NIC</b>	Neoplasia Intraepitelial Cervical
<b>FIGO</b>	Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>UICC</b>	<i>International Union Against Cancer</i>
<b>mm</b>	Milímetro
<b>cm</b>	Centímetro
<b>AJCC</b>	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
<b>IAL</b>	Invasão Angiolinfática
<b>MI</b>	Micrometástase
<b>Gy</b>	Gray
<b>cGy</b>	Centigray

<b>GOG</b>	<i>Gynecologic Oncology Group</i>
<b>VEGF-C</b>	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
<b>HE</b>	Hematoxilina-eosina
<b>CTI</b>	Células Tumorais Isoladas
<b>IHQ</b>	Imuno-histoquímica
<b>CRSM</b>	Centro de Referência da Saúde da Mulher do Estado de São Paulo – Hospital Pérola Byington
<b>GCR</b>	Grupo Com Recidiva Tumoral
<b>GSR</b>	Grupo Sem Recidiva Tumoral

## RESUMO

**Introdução:** Dez a 15% das pacientes com câncer do colo do útero em estágio clínico inicial (FIGO IB1 – IIA), com linfonodos negativos à técnica de Hematoxilina-eosina (HE), apresentam recidiva tumoral. **Objetivos:** Em pacientes com câncer de colo do útero nos estádios IB1 – IIA (FIGO): 1) Avaliar a prevalência de micrometástase (MI) linfonodal pélvica por meio da imunexpressão do anticorpo anti-pan – citoqueratina AE1/AE3 no tecido linfonodal e sua correlação com recidiva tumoral e sobrevida global; 2) Descrever, no tumor primário de pacientes com recidiva tumoral e/ou MI linfonodal, a expressão imuno-histoquímica (IHQ) do marcador endotelial linfático D2-40 e sua concordância com achados histopatológicos convencionais, por meio da coloração HE. **Material e Método:** Estudaram-se 83 prontuários de pacientes admitidas no Centro de Referência da Saúde da Mulher do Estado de São Paulo – Hospital Pérola Byington nos estádios clínicos IB1, IB2 e IIA, submetidas ao tratamento cirúrgico primário com histerectomia Querleu C1 exclusivamente e que apresentavam ausência de metástases linfonodais à HE. A coleta de dados foi realizada nos prontuários e realizou-se levantamento das características sociodemográficas, reprodutivas, histopatológicas, terapêuticas e de seguimento dessas pacientes. Os cortes histológicos dos tumores foram revisados de forma sistemática e cada linfonodo analisado por IHQ com anticorpo AE1/AE3, com seis cortes histológicos de três micrometros de espessura. As pacientes foram divididas em grupos com recidiva (GCR) e sem recidiva do tumor (GSR). Foram também divididas de acordo com a variável presença ou ausência de MI linfonodal ou

células tumorais isoladas. Para comparar os grupos em relação às variáveis qualitativas e quantitativas foi utilizado o teste Qui-quadrado e o teste paramétrico *t* de Student, respectivamente. **Resultados:** Quinze pacientes (18,07%) apresentaram recidiva tumoral. Com significância de 5%, houve diferença significativa entre os GCR e GSR e as variáveis: gestações, tamanho do maior eixo do tumor (cm), MI linfonodal, estadiamento clínico IB2 ou IIA e número médio de linfonodos negativos. Na análise direta, com MI linfonodal ou CTI, houve diferença significativa com as variáveis estadiamento clínico IB2 ou IIA e profundidade de invasão estromal maior do que 2/3. **Conclusões:** A presença de MI linfonodal é fator de risco importante para recidiva tumoral. Essas pacientes devem ser consideradas elegíveis para tratamento radioquimioterápico adjuvante.

## ABSTRACT

**Introduction:** Ten to 15% of cervical cancer patients have had tumor recurrence in early stage (FIGO IB1 - IIA). They have presented negative lymph nodes to hematoxylin-eosin (HE) staining technique. **Objectives:** In patients with cervical cancer in stage IB1 - IIA (FIGO): 1) to assess the prevalence of pelvic lymph node micrometastasis (MI) through the immunoreactivity of antibody anti pan - cytokeratin AE1/AE3 in lymph node tissue and its correlation with tumor recurrence and overall survival; 2) to describe, in the primary tumor of patients with recurrence tumor and/or lymph node micrometastasis, the immunohistochemical expression (IHC) of the lymphatic endothelial marker D2-40 and their correlation with histopathologic findings by conventional hematoxylin-eosin staining. **Material and Method:** We studied 83 medical records of patients admitted at Centro de Referência da Saúde da Mulher do Estado de São Paulo (Hospital Pérola Byington) in clinical stages IB1, IB2, and IIA. They were submitted exclusively to primary surgical treatment with hysterectomy Querleu C1 and had no lymph node metastases in the presence of Hematoxylin-Eosin. We collected data from the patients' medical records. We studied variables, such as sociodemographic, reproductive, and histopathological characteristics, as well as the therapeutic follow-up of these patients. The histological sections of the tumors were reviewed systematically. Each lymph node was analyzed by IHC with AE1/AE3 antibody with six histological sections of three micrometers thick. The patients were divided into groups with recurrence (GCR) and without recurrence (GSR). The patients were also separated according to the presence or absence of lymph node

micrometastasis or isolated tumor cells. Qualitative and quantitative variables between groups were compared using chi-square test and parametric Student's t-test. **Results:** Fifteen patients (18.07%) have had recurrence. At a significance level of 5%, there was significant difference between the GCR and GSR and the variables: pregnancies, size of the major axis of the tumor (cm), lymph node micrometastasis, clinical stage IB2 or IIA, and the mean number of negative lymph nodes. The direct analysis with lymph node micrometastasis or isolated tumor cells showed a significant difference among the variables clinical stage IB2 or IIA, and a stromal invasion depth greater than 2/3. **Conclusions:** The presence of lymph node micrometastasis is an important risk factor to tumor recurrence. These patients should be considered eligible for radiochemotherapy adjuvant treatment.

## 1. INTRODUÇÃO

---

## 1.1 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE COLO DO ÚTERO

O câncer de colo do útero (CCU) é o terceiro câncer mais frequente no mundo e também o terceiro tumor mais frequente na população feminina, seguido dos tumores de pele do tipo não melanoma e de mama. No Brasil, é a quarta causa de morte por câncer em mulheres, vitimando 5.160 mulheres em 2011.<sup>1,2,3</sup>

Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o CCU é o mais frequente na região Norte (23,57/100 mil) e o segundo mais frequente nas regiões Centro-Oeste (22,19/100 mil) e Nordeste (18,79/100 mil). Nas regiões Sudeste (10,15/100 mil) e Sul (15,87/100 mil), ocupa respectivamente o quarto e quinto lugares.<sup>3,4</sup>

A maioria dos casos ocorre nos países em desenvolvimento, sendo as maiores taxas de incidência na África sub-saariana, América Latina, Caribe e sul e sudeste da Ásia. Segundo a última edição (volume 9) do *Cancer incidence in five continents* da *International Agency for Research on Cancer*, as incidências mais elevadas no mundo foram registradas em Harare, no Zimbábue (África), com coeficiente padronizado de 47,3/100 mil mulheres, seguida por Kyadondo, na Uganda (África), com 45,8/100 mil mulheres e, Brasília e Cuiabá, no Brasil, com 37,7/100 mil mulheres. Além de Brasília e Cuiabá, essa edição também trouxe o coeficiente padronizado de Goiânia (33,9/100 mil mulheres) e São Paulo (21,1/100 mil mulheres). Na China, parte da Ásia ocidental e maioria dos países desenvolvidos, os coeficientes padronizados são inferiores a 15/100 mil mulheres.<sup>5</sup>

Em virtude dos programas de rastreamento de lesões precursoras do CCU por meio do exame colpocitológico, a incidência e a mortalidade da doença sofreram redução nos últimos 40 anos nos países desenvolvidos. A despeito dessa observação, notou-se tendência de aumento da incidência do CCU em mulheres jovens (abaixo de 55 anos) em diversos países, como Inglaterra, Austrália, Nova Zelândia, Bélgica, Espanha, Eslováquia e diversos países da Europa oriental. Acredita-se que essa tendência esteja relacionada à mudança de hábitos sexuais e ao aumento da transmissão do papilomavírus humano (HPV, *human papillomavirus*) em mulheres mais novas.<sup>6</sup>

Estudos epidemiológicos indicam a infecção persistente pelo HPV como o precursor biológico mais importante na carcinogênese cervical. A caracterização dos tipos de HPV indica que existam mais de 100 tipos, sendo que 40 causam doença genital.<sup>4,7</sup>

Esses são divididos em HPV de alto risco, dos quais os tipos 16 e 18 são os mais comuns, e HPV de baixo risco, sendo os tipos 6 e 11 os mais frequentes.<sup>8</sup>

No CCU, os tipos 16 e 18 são os mais comumente isolados (70% dos casos) porém, a grande maioria das alterações cervicais causadas tem pouca probabilidade de progredir para doença invasiva, mesmo quando associadas a esses dois tipos virais. O HPV 18 é mais associado ao adenocarcinoma de colo do útero (ACU) e, o HPV 16, ao carcinoma de células escamosas (CCE).<sup>8</sup>

No ano de 2014, o MS incluiu a vacinação contra o HPV no calendário oficial de imunização. Existem duas vacinas profiláticas contra o HPV aprovadas e registradas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária

(ANVISA) e que estão comercialmente disponíveis: a vacina quadrivalente, que confere proteção contra HPV 6, 11, 16 e 18; e a vacina bivalente, que confere proteção contra HPV 16 e 18. Contudo, apenas a quadrivalente encontra-se no calendário oficial de imunização.<sup>9</sup>

Outros fatores de risco associados ao CCU são: número elevado de parceiros sexuais, início precoce da atividade sexual, uso de contraceptivos orais, multiparidade, idade da primeira gestação, tabagismo, história prévia de doenças sexualmente transmissíveis, baixo nível socioeconômico, imunossupressão crônica e exposição materna ao dietilestilbestrol (DES), este relacionado ao adenocarcinoma de células claras do colo de útero em adolescentes.<sup>8,10-12</sup>

*A International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer*, em metanálise de 21 estudos sobre CCU, demonstrou que o número elevado de parceiros sexuais é um importante fator de risco (risco relativo – RR de 2,27, comparando seis ou mais parceiros com apenas um) e que a incidência do CCU aumenta aproximadamente com o quadrado da idade da primeira relação sexual até 45 anos, se mantendo constante em idades mais avançadas.<sup>13,14</sup>

O RR de CCU é maior em usuárias de contraceptivos orais e declina após sua interrupção. Metanálise com 24 estudos demonstrou que dez anos de utilização de contraceptivos orais, dos 20 aos 30 anos, aumenta a incidência cumulativa de CCU aos 50 anos de 7,3 para 8,3 por 1.000 mulheres nos países em desenvolvimento e de 3,8 para 4,5 por 1.000 mulheres nos países desenvolvidos.<sup>15</sup>

Multiparidade e idade da primeira gestação completa são fatores de risco independentes para o CCU. Metanálise com 25 estudos epidemiológicos demonstrou RR de 1,76 para mulheres múltíparas, com sete ou mais gestações completas, quando comparadas a mulheres com apenas uma ou duas gestações completas. A idade da primeira paridade de 17 anos apresentou RR de 1,77 quando comparada a 25 anos ou mais.<sup>16</sup>

Outra metanálise com 23 estudos epidemiológicos mostrou que mulheres tabagistas tiveram aumento significativo no risco de desenvolver CCE, quando comparadas às não tabagistas (RR = 1,60). Fumantes pregressas também apresentaram aumento, porém, menos significativo (RR = 1,12). O ACU não teve associação com tabagismo (RR = 0,89).<sup>17</sup>

Estudo realizado no Espírito Santo com 964 mulheres com diagnóstico de CCU verificou que mulheres analfabetas e com ensino fundamental incompleto representaram 70,9% da amostra. A incidência do CCU é mais frequente em mulheres de classes sociais mais baixas e com menor nível de escolaridade. Mulheres com baixo grau de instrução têm maior risco de desenvolver CCU e, quanto menor o grau de instrução, maior o risco do diagnóstico avançado desses tumores.<sup>18</sup>

A imunossupressão crônica induzida pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) aumenta a suscetibilidade às doenças oportunistas. Mulheres infectadas pelo HIV apresentam maior vulnerabilidade para desenvolvimento do CCU. Esta neoplasia foi a primeira doença desse gênero a ser incluída na definição de síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) no mundo.<sup>19</sup>

Há associação, embora rara, da terapia materna com DES e o desenvolvimento tardio de adenocarcinoma de células claras do colo e vagina, além de outras anormalidades do trato genital inferior, nas filhas de mães usuárias. Apesar da íntima associação com o uso de DES, em aproximadamente 30% dos casos, não se registra o uso de medicação. Noventa por cento dos casos são diagnosticados em pacientes entre 15 e 22 anos de idade, sendo extremamente raros na fase pré-puberal.<sup>20</sup>

## 1.2 NEOPLASIA INTRAEPITELIAL E INVASIVA DO COLO DO ÚTERO

Enquanto na década de 1990, 70% dos casos diagnosticados eram de doença invasora, atualmente, 44% dos casos são de lesão precursora do câncer, denominada neoplasia intraepitelial cervical (NIC) ou carcinoma *in situ*. Mulheres diagnosticadas precocemente, se tratadas adequadamente, têm praticamente 100% de expectativa de cura.<sup>3</sup> A evolução para a forma invasiva é lenta e precedida da NIC. Isso ocorre a partir do momento em que as células neoplásicas ultrapassam a membrana basal, atingindo o estroma. A progressão da doença intraepitelial para a forma invasiva ocorre em período médio de 14 anos.<sup>8,10</sup>

A NIC foi categorizada em graus I, II e III, dependendo do comprometimento do epitélio, em terços, que apresentam células atípicas ou indiferenciadas. Enquanto a maioria das NIC I (60%) regride entre 12 e 24 meses, as NIC II e NIC III, se não tratadas adequadamente, apresentam

probabilidade de progressão para doença invasiva de 5% a 20%, respectivamente, e são consideradas reais lesões precursoras do câncer.<sup>4,8,11,21</sup>

Pacientes com investigação cervical positiva para lesão precursora de câncer ou com características suspeitas de invasão, na ausência de tumor macroscópico, devem se submeter à conização cervical uterina para complementação diagnóstica<sup>4</sup>, como será discorrido adiante.

O CCE e o ACU são responsáveis por aproximadamente 75-80% e 20-25%, respectivamente, dos casos de CCU. Um aumento na frequência do ACU vem sendo observado, em virtude da provável diminuição da incidência de lesões invasivas escamosas, e à maior dificuldade de detecção das lesões precursoras endocervicais. Carcinoma adenoescamoso, células vítreas, pequenas células, adenocístico, basoadenoide, carcinoide, indiferenciado, sarcoma e carcinoma metastático são neoplasias malignas raras (Quadro 1 – Anexo 1).<sup>2,8,12,22</sup>

O carcinoma adenoescamoso possui componentes malignos escamosos e glandulares e está associado a um maior risco de disseminação para linfonodos pélvicos, quando comparado ao CCE e ACU, mas sem diferença em relação à sobrevida.<sup>23-25</sup>

O carcinoma de células vítreas é uma forma pouco diferenciada do carcinoma adenoescamoso que não responde bem ao tratamento cirúrgico ou radioterápico. É diagnosticado em pacientes mais jovens e possui índices de recorrência local maiores do que o CCE.<sup>26,27</sup>

O carcinoma adenocístico do colo uterino é bastante agressivo. Tem propensão para infiltração local, invasão de vasos linfáticos e espaço perineural, disseminação hematogênica e altas taxas de recorrência local e metástases à distância. Não há tratamento padrão, em virtude da sua raridade, e as diretrizes estabelecidas são semelhantes às do CCE.<sup>28</sup>

O carcinoma basoadoenoide de colo do útero é um tumor raro. Menos de 100 casos foram documentados na literatura até o momento. Um importante diagnóstico diferencial é o carcinoma adenocístico, em função de sua morfologia, porém, com resultados clínicos absolutamente diferentes. O tratamento deve ser conservador uma vez que seu comportamento geralmente é indolente.<sup>29</sup>

O carcinoma de pequenas células possui prognóstico sombrio, sendo os mais agressivos aqueles com diferenciação neuroendócrina.<sup>30</sup> O tratamento deve ser multimodal, incluindo cirurgia, radioterapia e quimioterapia.<sup>31-33</sup> Deve ser distinguido do CCE pouco diferenciado com pequenas células e dos ACU com características carcinoides.<sup>34</sup>

O sistema de estadiamento mais utilizado para o CCU é o proposto pela Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO), em colaboração com a Organização Mundial de Saúde (OMS) e a *International Union Against Cancer* (UICC), e pode ser visto no Anexo 2.<sup>35</sup> O estadiamento é essencialmente clínico, empregando-se o estudo histopatológico somente nos casos nos quais os tumores são microscópicos.<sup>2</sup>

A forma mais precoce de invasão se enquadra no estágio IA, denominado carcinoma microinvasor. É uma lesão definida microscopicamente

em peças de conização cervical uterina e classificada em dois estádios: IA1 (profundidade de invasão menor ou igual a 3 mm, com extensão menor ou igual a 7 mm no epitélio) e IA2 (profundidade de invasão maior que 3 e menor ou igual a 5 mm, com extensão menor ou igual a sete mm no epitélio).<sup>4,11</sup>

Medidas superiores às definidas para carcinoma microinvasor são classificadas em estágio IB. Os tumores cervicais macroscópicos são classificados, segundo a FIGO, em: IB1) lesão menor ou igual a 4 cm no maior diâmetro; IB2) lesão superior a 4 cm de diâmetro; IIA1) tumor comprometendo a vagina até 2/3 craniais, sem comprometimento parametrial e menor ou igual a 4 cm; IIA2) tumor envolvendo vagina até 2/3 craniais, sem comprometimento parametrial e maior do que 4 cm; IIb) tumor com comprometimento parametrial, sem acometer parede óssea; IIIa) tumor que compromete o 1/3 inferior da vagina; IIIb) tumor que estende à parede óssea e/ou causa hidronefrose ou exclusão renal; IVa) tumor que se estende à mucosa vesical e/ou retal, confirmado histologicamente após cistoscopia ou retossigmoidoscopia com biópsia e IVb) metástase a distância.<sup>11,36</sup>

As metástases linfonodais pélvicas não são consideradas no sistema de estadiamento da FIGO. Portanto, o exame histopatológico dos linfonodos não modifica o estadiamento clínico inicial da paciente.<sup>37</sup>

O sistema de estadiamento TNM preconizado pela UICC e pela *American Joint Committee on Cancer (AJCC)*, é menos frequentemente utilizado para estadiar o CCU e assemelha-se muito ao proposto pela FIGO. Entretanto, além de permitir o estadiamento pós-operatório (estadiamento

anatomopatológico), o sistema TNM determina que as pacientes com metástases nos linfonodos pélvicos sejam consideradas como IIIb.<sup>38</sup>

Oitenta por cento das pacientes com CCU encontram-se em estádios clínicos iniciais (FIGO IA1 - IB2).<sup>22,39-41</sup>

### 1.3 TRATAMENTO DO CÂNCER DE COLO DO ÚTERO

O tratamento do CCU é definido pelo estadiamento clínico.<sup>11</sup> Na maioria dos centros de tratamento de câncer ginecológico, adota-se como padrão o estadiamento proposto pela FIGO.

Pacientes com neoplasias no estágio IA, o tratamento pode ser dividido em dois grupos: pacientes com prole constituída e aquelas com desejo reprodutivo. Estádio IA1 com prole constituída, a histerectomia extrafascial tipo I de Piver e Rutledge ou classe A de Querleu e Morrow (Quadros 2 e 3 – Anexos 3 e 4), é conduta suficiente para erradicação da doença.<sup>11</sup>

Nas pacientes com desejo de gestação, a melhor conduta é a amputação cônica do colo do útero, também denominada conização clássica.<sup>12,42-44</sup> Após encerrado o desejo reprodutivo, a histerectomia deve ser considerada, sobretudo nas pacientes com persistência de infecção pelo HPV ou alteração citológica.<sup>11</sup>

A incidência de metástases para linfonodos pélvicos nos estádios IA1 é 0,5 – 1% e, quando relacionada à presença de invasão angiolinfática (IAL), pode chegar a 4%.<sup>12</sup>

Pacientes no estágio IA2, a histerectomia com ressecção parametrial até o nível ureteral (tipo II de Piver e Rutlege ou classe B de Querleu e Morrow – Quadros 2 e 3 – Anexos 3 e 4) e linfadenectomia pélvica, é conduta de eleição para pacientes com prole constituída.<sup>8,12</sup>

Naqueles com desejo de gestação, é proposto cirurgia conservadora por meio da traquelectomia radical vaginal e linfadenectomia pélvica laparoscópica.<sup>12,42-44</sup> Contudo, essa modalidade terapêutica é indicada exclusivamente para pacientes com tumores de até 2 cm, sem comprometimento linfonodal e preferencialmente sem IAL. Apresenta taxa de recidiva semelhante à cirurgia radical convencional e taxa de gravidez a termo próxima de 47%. A incidência de metástases para linfonodos pélvicos nos estádios IA2 é de 3 – 8%.<sup>8,12</sup>

Pacientes no estágio IB1, em sua maioria, são tratadas pela cirurgia radical, por meio de histerectomia com ressecção parametrial até o nível de artéria ilíaca interna (tipo III de Piver e Rutlege ou classe C de Querleu e Morrow – Quadros 2 e 3 – Anexos 3 e 4) e linfadenectomia pélvica.<sup>12,42</sup>

Alguns autores indicam a pesquisa do linfonodo sentinela, justificando ser de fácil realização, com baixa incidência de falso-negativo e de complicações, além de diminuir morbidade.<sup>45,46</sup> Porém, outros questionam seu real valor, relatando a presença de micrometástases (MI) em linfonodos não sentinelas, mesmo quando esses são negativos.<sup>47</sup> A incidência de linfonodos pélvicos comprometidos nos estádios IB1 é de 15 – 20%.<sup>8,12</sup>

Outro tratamento, com índices de recidiva e taxas de sobrevida similares ao tratamento cirúrgico, é a radioterapia (teleterapia pélvica associada

á braquiterapia vaginal). A dose sugerida de braquiterapia é de 85 a 90 Grays (Gy) no ponto A e de 55 a 60 Gy no ponto B. Já a teleterapia recomendada é de 45 a 55 Gy, dividida em frações diárias de 180 a 200 Centigrays (cGy).<sup>2,22</sup>

Os avanços no tratamento do CCU incorporaram a quimioterapia como sensibilizador à radioterapia. Essa combinação mostrou aumento na sobrevida e diminuição na recorrência. O quimioterápico de escolha é a cisplatina, na dose de 40 mg/m<sup>2</sup>, semanalmente, administrada concomitantemente ao período de radioterapia externa (teleterapia), durante 6 semanas. Entre suas propriedades, o quimioterápico pode agir como radiosensibilizante e sensibilizador de células hipóxicas.<sup>2,22</sup>

Pacientes nos estádios IB2 e IIA, em sua maioria, são tratadas pela radioquimioterapia (nível de evidência A – Anexo 5), em função das altas taxas de radioterapia adjuvante (85% dos casos de IB2).<sup>2</sup>

A desvantagem do método de quimioirradiação está nas complicações de longo prazo, como cistite, enterite e retite actínicas, estenose vaginal e inativação ovariana. Por isso, pacientes nos estádios IB2 e IIA, jovens (menos de 60 anos), magras e sem afecções clínicas associadas são candidatas ao tratamento cirúrgico com histerectomia tipo III de Piver e Rutledge ou classe C de Querleu e Morrow (Quadros 2 e 3 – Anexos 3 e 4) e linfadenectomia pélvica.<sup>2,10,12,42</sup>

A radioquimioterapia tem importante papel no tratamento adjuvante das pacientes submetidas a tratamento cirúrgico primário e classificadas como de alto e médio risco, de acordo com as características histopatológicas das peças cirúrgicas, conforme Quadro 4 (Anexo 6).<sup>43,44,48,49</sup>

Para pacientes nos estádios IIB – IVA o tratamento padrão-ouro é radioquimioterapia. A exceção cabe para o estágio IVA, sobretudo nas pacientes com fístula vesicovaginal ou retovaginal, podendo-se indicar a exenteração pélvica (histerectomia radical associada à cistectomia e/ou retossigmoidectomia) (nível de evidência C – Anexo 5).<sup>2,8,11,22</sup>

O *Gynecologic Oncology Group* (GOG) realizou dois trabalhos nos quais foram randomizadas pacientes com CCU estádios clínicos IIB a IVA, para receber tratamento primário à base de radioterapia externa, associada à hidroxiuréia ou quimioterapia baseada em cisplatina. A cisplatina apresentou controle local e sobrevida livre de doença superior à hidroxiuréia em ambos os trabalhos.<sup>50,51</sup>

Outro estudo randomizou pacientes com CCU no estágio clínico IB2, para receber radioterapia exclusiva ou radioterapia concomitante à cisplatina semanal. A cisplatina teve maior probabilidade de apresentar resposta histológica completa e maior sobrevida livre de doença.<sup>52</sup>

Estudo do *Radiation Therapy Oncology Group* comparou radioterapia exclusiva com radioterapia pélvica associada à quimioterapia com cisplatina e 5-fluorouracil. O braço da quimioterapia teve diferença significativa em relação ao controle local, metástases à distância, sobrevida geral e sobrevida livre de doença.<sup>53</sup>

Esses quatro estudos demonstraram diminuição de 30 – 50% no risco de morte após o término do tratamento e fizeram com que a quimioterapia à base de cisplatina, concomitante à radioterapia pélvica, fosse o tratamento padrão-ouro para o CCU localmente avançado.<sup>50-53</sup>

A biblioteca da *Cochrane* publicou uma metanálise com 19 ensaios clínicos que comparavam o tratamento do CCU localmente avançado com quimioterapia e radioterapia concomitantes *versus* radioterapia apenas. A revisão demonstrou que o tratamento concomitante com quimioterapia e radioterapia aumenta a sobrevida global e a sobrevida livre de doença, com benefícios absolutos de 12% e 16%, respectivamente.<sup>54</sup>

Pacientes com metástase à distância, estágio IVB, são tratadas com quimioterapia. Estudos recentes demonstraram melhor resposta tumoral, quando a quimioterapia é combinada entre cisplatina/placlitaxel ou carboplatina/placlitaxel, sendo os dois esquemas mais utilizados para câncer recidivado ou metastático. Entretanto, para pacientes que não são candidatas ao uso dos taxanos, a cisplatina/topotecan ou cisplatina/gencitabina são alternativas aceitáveis. O tratamento radioterápico também pode ser utilizado nas metástases à distância, com finalidade antiálgica e controle local, como nas metástases ósseas.<sup>11</sup>

#### **1.4 FATORES DE RISCO ASSOCIADOS À RECORRÊNCIA E SOBREVIDA**

As taxas de sobrevida e controle de doença pélvica associam-se com o estágio da FIGO (Quadro 5 – Anexo 7).<sup>55</sup>

O prognóstico também é influenciado por outros fatores não incluídos no estadiamento. A sobrevida e a recorrência estão associadas com a presença da IAL, acometimento linfonodal, profundidade de invasão estromal,

tamanho tumoral, proximidade com margens, tipo histológico, grau de diferenciação, reação inflamatória peritumoral e anemia.<sup>39,41,56,57</sup>

Benedet et al. (2003) publicaram o estudo multicêntrico mundial *Annual Report on The Results of Treatment on Gynecological Cancers* (FIGO), contendo 13.982 casos de CCU em todos os estádios clínicos. Notou-se que a sobrevida livre de doença, foi tanto menor quanto mais avançado o estadiamento clínico. As pacientes no estágio IA1 tiveram 96,0% de sobrevida em cinco anos, sendo progressivamente menores com o aumento do estadiamento: 94,4% (IA2), 86,5% (IB1), 77,9% (IB2), 69,2% (IIA), 64,4% (IIB), 47,5% (IIIA), 47,1% (IIIB), 27,7% (IVA) e 24,8% (IVB).<sup>37</sup>

O comprometimento capilar linfático e sanguíneo, ou IAL, é a principal característica histológica para predizer o comprometimento linfonodal que, por sua vez, é o principal fator relacionado à sobrevida.<sup>58-60</sup> A IAL foi observada como fator de risco para recorrência do CCU, mesmo em casos sem metástase linfonodal.<sup>61</sup>

Estudo com 732 pacientes diagnosticadas com CCU, tipo histológico escamoso, sem tratamento prévio e com invasão estromal maior ou igual a 3 mm, demonstrou que a sobrevida livre de doença tem importante correlação com a IAL, profundidade de invasão estromal (mensurada tanto em mm quanto em terços de invasão), tamanho clínico do tumor, grau de diferenciação e comprometimento parametrial.<sup>62</sup>

A sobrevida livre de doença em três anos foi progressivamente menor com o aumento da invasão estromal: 94,6% (menor ou igual a 5 mm), 86% (6 e 10 mm), 75,2% (11 e 15 mm), 71,5% (16 e 20 mm) e 59,5% (maior ou igual a

21 mm). Quando mensurada em terços mostrou as seguintes taxas: 94,1% (terço superficial), 84,5% (terço médio) e 73,6% (terço profundo).<sup>62</sup>

O tamanho clínico do tumor também correlacionou uma menor sobrevida livre de doença quanto maior o tamanho: 94,8%, 88,1% e 67,6% para tumores microscópicos, menores ou iguais a 3 cm e maiores do que 3 cm, respectivamente.<sup>62</sup>

O diâmetro do tumor está associado à recorrência do CCU não apenas por sua dimensão, mas pela área, volume ou quociente entre o diâmetro do tumor e do colo do útero.<sup>63</sup> Gauthier et al. (1985) encontraram taxas de recorrência de 7,0%, 26,0% e 57,0% respectivamente para tumores com menos de 2 cm, entre 2 e 3 cm e maiores do que 3 cm de diâmetro.<sup>64</sup>

A recorrência, segundo o tipo histológico tumoral, é bastante debatida. Uma das maiores séries realizadas, 11.157 pacientes diagnosticadas e/ou tratadas com CCU, observou diferença nas taxas de recidiva em todos os estádios clínicos (I-IV) entre os tipos histológicos escamoso, adenocarcinoma e adenoescamoso, porém, essa diferença foi significativa apenas no estágio II. Concluiu-se que o tipo histológico não é um fator de recorrência importante.<sup>65</sup>

O prognóstico, segundo o grau histológico, é também motivo de controvérsia. Um dos motivos é que há grande diversidade de interpretação de leitura, pois alguns patologistas baseiam sua classificação no padrão histológico predominante, outros definem pela área de menor diferenciação.<sup>66</sup>

Estudo realizado com 445 pacientes com CCU avançado, tratadas com radioterapia não demonstrou diferença no prognóstico entre tumores de graus

histológicos diferentes.<sup>66</sup> Davidson et al. (1999) não tiveram correlação entre grau histológico e sobrevida em estudo com 75 pacientes com CCE.<sup>67</sup>

Horn et al. (2001) verificaram que estágio clínico avançado, metástase linfonodal, profundidade de invasão estromal, tumor pouco diferenciado (grau 3) e ausência de resposta inflamatória peritumoral estão associados a um pior prognóstico. O tipo histológico adenocarcinoma não apresentou pior prognóstico. A recorrência foi 27,5% e 15,1% nos tumores grau 3 e grau 1, respectivamente.<sup>68</sup>

Estudo com 172 pacientes com CCU estágio clínico inicial (FIGO I-II) demonstrou que grau histológico está altamente associado a metástases linfonodais pélvica e sobrevida livre de doença em CCE ( $p=0,0001$ ).<sup>57</sup>

A intensidade do processo inflamatório no colo do útero como fator prognóstico é discutível. Alguns autores relatam que a ausência ou discreta resposta inflamatória peritumoral é fator de mau prognóstico, levando a um maior índice de recorrência.<sup>57,68,69</sup> Outros, porém, não demonstraram qualquer relação entre risco de recorrência e reação inflamatória peritumoral.<sup>67</sup>

Alguns fatores hematológicos foram analisados em pacientes com CCU como possíveis fatores de risco para recorrência, sendo a taxa de hemoglobina o mais estudado.<sup>69</sup> Revisão com 605 pacientes com CCU, tratadas com radioterapia demonstrou que o nadir semanal dos níveis de hemoglobina foi fator prognóstico significativo para sobrevida. Sugere-se que o nível de hemoglobina seja mantido em 12 g/dl para que obtenha resposta satisfatória à radioterapia.<sup>70</sup>



## 1.5 SISTEMA LINFÁTICO E MICROMETÁSTASES

O sistema linfático é a principal via de disseminação da maioria dos carcinomas, normalmente precedendo à via vascular. No CCU, geralmente, segue um padrão ordenado, ocorrendo inicialmente para os linfonodos da pelve (pélvicos), e destes para os para-aórticos, mediastinais e supraclaviculares. O acometimento dos linfonodos regionais por tumores sólidos é um marcador de disseminação, estágio avançado e pior prognóstico.<sup>71-79</sup>

A importância da metástase linfática é bem conhecida no tratamento e estadiamento do câncer. Sua incidência, nos estadiamentos iniciais (IB1 – IIA), varia de 8,5% a 21,4%<sup>22</sup>, aumentando com a progressão do estadiamento clínico (Quadro 6 – Anexo 8).<sup>8,12</sup> Os sítios de maior acometimento são a região acima do nervo obturatório entre a bifurcação das ilíacas, ao redor da veia e artéria ilíaca externa, e acima dos vasos ilíacos comuns.<sup>8,80</sup>

No CCU, o estado dos linfonodos da pelve (pélvicos) e para-aórticos é o fator prognóstico mais importante, além do estadiamento clínico.<sup>71-73,81</sup> O comprometimento linfonodal é o principal critério para a realização de terapia adjuvante.<sup>1,82,83</sup>

O número de linfonodos, o grupo linfonodal comprometido e a bilateralidade também são fatores de risco para recorrência, notando-se sobrevida livre de doença progressivamente menor com o aumento do número de linfonodos metastáticos, o comprometimento de linfonodos periaórticos e a bilateralidade.<sup>41,84</sup>

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 interações moleculares entre células neoplásicas, microambiente e sistema vascular linfático.<sup>85,86</sup>

A invasão dos vasos linfáticos precede as metástases regionais, fazendo com que a identificação do comprometimento vascular em espécimes cirúrgicos seja de valor prognóstico e, em geral, associado a altas taxas de comprometimento linfonodal.<sup>83,87,88</sup>

Pouco se sabe dos mecanismos pelos quais as células tumorais invadem o sistema linfático. Ainda há controvérsias se os tumores podem induzir a formação de novos vasos linfáticos – a linfoangiogênese – ou se as células tumorais podem entrar nos vasos linfáticos previamente existentes. A linfoangiogênese está provavelmente relacionada à disseminação metastática.<sup>74,75,79,83,89-92</sup> Entretanto, sua avaliação em CCU foi pouco estudada e os resultados são controversos.<sup>81,93,94</sup>

Compreender os mecanismos pelos quais as células neoplásicas atingem os linfonodos é de fundamental importância para o desenvolvimento de intervenções terapêuticas.<sup>95-98</sup>

A primeira descrição do sistema linfático foi feita em 1627, quando foram identificados os vasos linfáticos, como sendo vaso leitoso (*milkvein*) no mesentério de um cachorro. Mesmo assim, passaram-se décadas para que se iniciasse a formulação de teorias sobre o desenvolvimento desses vasos.<sup>79</sup>

Duas teorias foram propostas para a linfoangiogênese: centrífuga e centrípeta. A teoria centrífuga é a mais aceita, descrita por Florence Sabin (1902). Sugere-se que, no desenvolvimento fetal precoce, os sacos linfáticos primitivos seriam originados de brotamento de células endoteliais, a partir de veias do embrião. Segundo essa teoria, os vasos linfáticos se espalhariam periféricamente pelos tecidos e órgãos e, a partir desses sacos linfáticos primitivos, se originariam os capilares linfáticos.<sup>99</sup>

Já a teoria centrípeta, proposta por Huntington e McClure (1908), preconizava que os vasos linfáticos primitivos surgiam no tecido mesenquimal, independente das veias, crescendo centripetamente e estabelecendo conexões com as veias mais tardiamente.<sup>100</sup>

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. Foram observados grupamentos de vasos linfáticos, contendo células tumorais na periferia, porém o mesmo não foi verificado no centro do tumor.<sup>101</sup>

É necessária a preexistência de vasos linfáticos peritumorais, para que as células tumorais se metastatizem para outros locais.<sup>102</sup> Estímulos específicos produzidos nos tumores induzem a proliferação do sistema linfático preexistente.<sup>103</sup>

Os vasos linfáticos neoformados podem ser peritumorais e intratumorais. Os peritumorais apresentam-se mais largos e irregulares. Os intratumorais são usualmente pequenos, aplainados, irregulares e, ocasionalmente, contêm células tumorais.<sup>104</sup>

O interesse pelo estudo dos vasos linfáticos dentro dos tumores é recente, pois para vários autores, até pouco tempo, os vasos linfáticos não eram considerados parte ativa e funcionante do estroma tumoral.<sup>105,106</sup>

Diversos marcadores específicos do sistema linfático têm sido desenvolvidos. Kahn e Marks desenvolveram o anticorpo monoclonal D2-40 que reage com o antígeno da membrana oncofetal M2A, identificado nos tumores de linhagem epitelial e células germinativas do ovário. D2-40 é um efetivo e seletivo marcador de vasos linfáticos normais e neoplásicos e, por isso, é valioso na pesquisa linfática. Estudos recentes demonstram que a positividade peritumoral do D2-40 é um preditor independente de metástase linfonodal.<sup>81,83,107-110</sup>

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 sobrevida.<sup>111</sup>

A densidade linfática intratumoral e também peritumoral associou-se à metástase de nódulo linfático. Alta densidade linfática intratumoral associou-se à baixa sobrevida total na pesquisa com 81 pacientes com carcinoma escamoso de cabeça e pescoço.<sup>112</sup>

Em 44 pacientes com melanoma, o D2-40 foi utilizado para quantificar a densidade linfática ao redor do melanoma e comparar com a derme normal, carcinoma basocelular e carcinoma de célula de Merkel. A densidade linfática permitiu diferenciar o melanoma que originou a metástase.<sup>113</sup>

Entretanto, outro estudo com 45 pacientes acometidas pelo câncer de mama não mostrou correlação entre a densidade e invasão de vasos linfáticos, com a sobrevida.<sup>114</sup>

Outros 113 pacientes também com câncer de mama, apresentaram significativo aumento na densidade de vasos linfáticos associado à metástase linfonodal, pior prognóstico, menor sobrevida livre de doença e presença do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF-C).<sup>115</sup>

### **Micrometástase Linfonodal**

Alguns autores demonstram que metástases “dormentes” no sistema linfonodal, as chamadas micrometástases, indetectável ao estudo histológico convencional, no qual o linfonodo é avaliado por meio de um único corte central e corado pela técnica de hematoxilina-eosina (HE), poderiam explicar parte das recorrências.<sup>1,116</sup>

A UICC, em 1999, divulgou comunicado oficial definindo o conceito de MI. Esse compreende o foco de células neoplásicas com até 2 mm de diâmetro e com sinais de atividade tumoral em um órgão. Conforme o comunicado é possível diagnosticar a MI apenas por exame histológico, uma vez que compreende a mensuração do foco metastático. A UICC também introduziu outra definição, o de célula tumoral isolada (CTI). Essa compreende a presença de célula neoplásica única, ou um pequeno conjunto delas, sem sinais de atividade tumoral em um órgão (Quadro 7 – Anexo 9).<sup>117</sup>

Não há consenso mundial na definição de MI em CCU, porém, propõe-se definição semelhante à que é dada para o câncer de mama.<sup>1,7,118</sup>

A análise imuno-histoquímica (IHQ) para MI em CCU utiliza como marcador as citoqueratinas, que são um grupo de proteínas monofilamentares que constituem parte do citoesqueleto celular da epiderme e da maioria dos outros epitélios. Aproximadamente 19 tipos moleculares diferentes de citoqueratinas têm sido identificados em células epiteliais normais e malignas, mas normalmente não encontradas em tecido linfonodal normal. São divididas em citoqueratinas ácidas (tipo 1) e básicas (tipo 2) e esses subtipos são expressos em ambos epitélios, endo e ectocervicais.<sup>7,116</sup>

As citoqueratinas AE1/AE3, 19 e CAM5.2 são os marcadores tumorais mais utilizados para detecção de MI linfonodal em CCU.<sup>116,119,120</sup>

Existe controvérsia na literatura com relação ao impacto da MI no prognóstico do CCU. Do ponto de vista clínico, não é possível avaliar se a presença da MI deve ser considerada nos protocolos terapêuticos.<sup>1</sup> A importante correlação da taxa de recorrência, em pacientes com linfonodos negativos, e a incidência de MI, talvez argumente em favor da inclusão, já que ambas estão entre 10 – 15%.<sup>1,121</sup> Outros autores demonstraram uma frequência de até 50%, porém, relatam que apenas uma parte dessas MI continuaria a crescer e se transformar em tumores.<sup>116</sup>

Outros autores, verificaram haver associação plena entre MI e vários fatores de risco, incluindo IAL e tamanho tumoral<sup>22,80,116</sup>, grau histológico III<sup>116</sup>, e profundidade de invasão estromal e intensidade do processo inflamatório.<sup>41</sup> Por outro lado, outra série demonstrou a ausência da correlação entre esses fatores.<sup>121</sup>

Face à escassez de trabalhos na literatura que confirmem a presença de MI como preditor de recidiva e sobrevida, assim como a ausência de consenso para indicação de tratamento adjuvante, o presente estudo foi proposto.

Também não há nenhum estudo prévio que relacione a presença dessas MI com a pesquisa de IAL no tumor original, por meio do marcador D2-40 e que compare a sobrevida global das pacientes com e sem MI linfonodal.

Pretende-se, ao término deste trabalho, agregar dados que aperfeiçoem o tratamento multimodal do CCU.

## **OBJETIVOS**

- a) Avaliar a prevalência de micrometástase linfonodal pélvica no câncer de colo do útero em estádios iniciais (IB1 – IIA), por meio da imunoexpressão do anticorpo anti-pan – citoqueratina AE1/AE3 no tecido linfonodal e sua correlação com recidiva tumoral e sobrevida global;
- b) Descrever, no tumor primário de pacientes com recidiva tumoral e/ou micrometástase linfonodal, a expressão imuno-histoquímica do marcador endotelial linfático D2-40 e avaliar sua correlação com achados histopatológicos convencionais pela coloração hematoxilina-eosina.

## **2. MATERIAL E MÉTODO**

---

Trata-se de estudo observacional e longitudinal retrospectivo de pacientes atendidas no Centro de Referência da Saúde da Mulher do Estado de São Paulo – Hospital Pérola Byington (CRSM), com diagnóstico de CCU em estádios iniciais. As informações foram obtidas de prontuários médicos que, embora sejam fontes confiáveis de dados, não possuem um critério uniforme de preenchimento pelos profissionais da área da saúde.

Os prontuários do CRSM são caracterizados por uma sequência cronológica de arquivamento de informações, desde a admissão no serviço até a informação mais recente da paciente ou a ocorrência do óbito. Os laudos dos exames laboratoriais, imagenológicos e anatomopatológicos também são arquivados de forma cronológica, sendo pequena a perda de informações.

Todas se submeteram ao tratamento cirúrgico primário com histerectomia radical classe III de Piver e Rutledge ou classe C1 de Querleu.<sup>2,12,42</sup> A totalidade da amostra (n=83) não apresentava critérios de alto risco para recidiva, como paramétrios e margens comprometidas, e ausência de metástases linfonodais à técnica de coloração por HE, não tendo sido indicado tratamento adjuvante com radioterapia ou quimioterapia.

Apesar das pacientes terem sido corretamente tratadas, seguindo recomendações da FIGO, 15 delas apresentaram recorrência local. Uma das possibilidades, e que idealizou este projeto de tese, seria a eventual presença de MI linfonodal subdiagnosticada.

A revisão dos dados anatomopatológicos por dois patologistas independentes aprimorou a qualidade das informações, sobretudo pela

padronização da leitura e classificação das diversas peças cirúrgicas. Houve análise de diversos critérios histopatológicos de risco, descritos nessa metodologia, e que não foram avaliados anteriormente nos laudos originais.

A pesquisa não interferiu no diagnóstico, conduta ou seguimento oncológico dessas pacientes. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do CRSM, parecer n° 16327 (Anexos 10 e 11). Os pesquisadores se comprometeram a manter sigilo sobre a identidade das pacientes.

## **2.1 CASUÍSTICA**

Foram selecionadas pacientes com diagnóstico de CCU, tratadas de 2001 a 2007 na instituição que foram classificadas segundo o estadiamento recomendado pela FIGO.

Utilizando-se a palavra-chave “câncer do colo do útero”, foram identificadas, por meio do banco de dados do Setor de Anatomia Patológica do CRSM, 628 pacientes diagnosticadas com CCU no período estipulado, com tipos histológicos epidermoide, adenocarcinoma, adenoescamoso e adenomucinoso.

Após análise dos prontuários e critérios de exclusão, 545 casos foram excluídos por: 1) terem sido submetidos a tratamento primário não cirúrgico (n=150); 2) seguimento clínico inferior a cinco anos (n=65); 3) diagnóstico de neoplasias associadas (n=22); 4) indisponibilidade ou inviabilidade do material emblocado em parafina (n=33); 5) terem realizado radioterapia adjuvante

(n=185); 6) não terem linfadenectomia (n=90).

As 83 pacientes remanescentes e objetos deste estudo encontravam-se nos estádios clínicos IB1 (n=75), IB2 (n=5) e IIA (n=3) e não haviam realizado qualquer tratamento prévio, exceto a conização diagnóstica do colo do útero (n=32).

Realizou-se levantamento retrospectivo das características sociodemográficas, reprodutivas, histopatológicas, terapêuticas e de seguimento dessas pacientes.

O seguimento clínico pós-operatório incluiu exame ginecológico trimestral nos primeiros dois anos e semestral nos três anos subsequentes. Exames complementares, como ultrassonografia transvaginal e abdome total, radiografia de tórax, tomografia de pelve, abdome total e tórax, ressonância magnética de pelve e abdome total, foram solicitados anualmente e de acordo com a sintomatologia das pacientes.

Considerou-se recorrência o retorno da doença, locorregionalmente (pelve) ou à distância, em pacientes submetidas ao tratamento cirúrgico primário há no mínimo seis meses e no máximo há cinco anos. O diagnóstico da recorrência foi realizado por meio de sinais clínicos indiscutíveis de doença em atividade, como metástase hepática e pulmonar, e detecção ao exame físico e imagenológico de massa pélvica não observada em exames prévios.

Após revisão de prontuários, os 83 casos foram divididos em grupos com recidiva (GCR) (n=15), e sem recidiva do tumor (GSR) (n=68). Foram também divididos de acordo com as variáveis; presença de micrometástase

linfonodal ou células tumorais isoladas e ausência de micrometástase

linfonodal ou células tumorais isoladas.

## **2.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA**

Na ocasião do diagnóstico, todas as peças cirúrgicas foram avaliadas pelo Setor de Anatomia Patológica do CRSM, também responsável pelo seu arquivamento e conservação.

Todas as lâminas foram revisadas por dois patologistas independentes e em caso de discordância diagnóstica, foi utilizado o diagnóstico de consenso.

Foram reavaliados o tipo e grau histológico e o estadiamento patológico da neoplasia, critérios histopatológicos de risco, como diâmetro do tumor, profundidade de invasão do tumor no estroma cervical e invasão angiolinfática, além da associação com neoplasia intraepitelial de alto grau e estado linfonodal, através da coloração convencional por HE.

Os blocos de parafina contendo os linfonodos das pacientes foram obtidos no arquivo do Departamento de Patologia do hospital.

## **2.3 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA**

Os blocos dos linfonodos foram submetidos a seis cortes com a espessura de três micrômetros para o estudo IHQ. Por conseguinte, a pesquisa de MI linfonodal foi realizada por meio do anticorpo anti-pan – citoqueratinas AE1/AE3, semelhante à metodologia do linfonodo sentinela no carcinoma mamário.<sup>1,7</sup>

A IHQ AE1/AE3 foi usada, neste estudo, para detectar células epiteliais nos linfonodos histologicamente negativos. Esse anticorpo possui citoqueratina de baixo e alto peso molecular, considerado padrão-ouro para identificação de células epiteliais em cortes histológicos.<sup>1,7</sup>

Casos com ausência de IAL à técnica convencional de HE, mas com risco presumível desse achado, como nas recidivas tumorais e/ou presença de MI linfonodal, foram pesquisados no bloco do tumor original quanto à presença do marcador endotelial linfático D2-40, sensível para marcação endotelial de vasos linfáticos. Tais achados, sugestivos de IAL por êmbolos tumorais, foram comparados aos dados de leitura convencional na técnica de HE.

O protocolo da técnica de IHQ para o anticorpo anti-pan – citoqueratina AE1/AE3 e para o marcador endotelial linfático D2-40, estão no Anexo 12.

Para leitura e avaliação da citoqueratina AE1/AE3 e do marcador endotelial linfático D2-40, foi usado um microscópio óptico Nykon E200, com aumento de 10x na ocular e 4x na objetiva.

As MI linfonodais foram medidas com “Régua Retículo Melanoma” (Holtermann), em escala de 0 a 10 mm e valor para cada divisão de 0,05 mm.

Cada linfonodo foi classificado da seguinte forma, distribuídos em três subgrupos: 1) linfonodo sem metástase, 2) linfonodo com células tumorais isoladas e 3) linfonodo micrometastático, com metástase de até 2 mm. Casos em que houve mais de uma MI no mesmo linfonodo, este foi classificado de acordo com o maior achado.

O diagnóstico diferencial entre CTI e MI linfonodal foi realizado de acordo com os critérios de Hermanek et al. (Quadro 7 – Anexo 9).<sup>117</sup> A

diferenciação entre inclusões epiteliais benignas e metástases foi feito utilizando-se os critérios morfológicos propostos por Reich et al. (Quadro 8 – Anexo 13).<sup>122</sup>

## **2.4 VARIÁVEIS DO ESTUDO**

As variáveis dependentes do estudo foram:

- a) Presença ou ausência de micrometástase linfonodal ou células tumorais isoladas no linfonodo da pelve.
- b) Recorrência tumoral: intervalo transcorrido, em meses, entre a data da cirurgia (conclusão do tratamento) e a data do diagnóstico da recorrência.

As variáveis independentes utilizadas na avaliação dos fatores de risco para a presença de MI linfonodal e a recidiva tumoral foram divididas em três grupos: sociodemográficas, reprodutivas e histopatológicas (Quadro 9 – Anexo 14).

## **2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

As variáveis qualitativas foram resumidas pela frequência simples e porcentagem e as variáveis quantitativas foram resumidas por meio de média, desvio padrão, mediana, mínimo, máximo e número de observações válidas.

Para comparar os grupos em relação às variáveis qualitativas, foi utilizado o teste Qui-quadrado ou, quando necessário, o teste Exato de Fisher ou da Razão de verossimilhança.<sup>123-125</sup>

Para comparar os grupos em relação às variáveis quantitativas, foi utilizado o teste paramétrico *t* de Student para grupos independentes.<sup>123-125</sup>

Para calcular a ODDS RATIO da Micrometástase Linfonodal para Recidiva Tumoral, foi utilizado o modelo de regressão logística univariado para verificar a relação da variável independente Micrometástase Linfonodal com a variável dependente Recidiva Tumoral.<sup>124-126</sup>

Para verificar a relação das variáveis independentes: Micrometástase linfonodal, Profundidade de invasão estromal (maior ou menor que 2/3), Tamanho tumoral (menor ou maior que 2 cm) e Invasão angiolinfática com a variável dependente Recidiva Tumoral, foi utilizado o modelo de regressão logística multivariado.<sup>124-126</sup>

Através do cálculo da sensibilidade e especificidade da MI linfonodal em relação a recidiva, foi calculado o Número Necessário para Diagnosticar (NND).<sup>124,125</sup>

Foi utilizado um nível de significância de 5% ( $P$ -valor  $\leq 0,05$ ). O software utilizado na análise estatística foi o SPSS para Windows, versão 15.0.



Após revisão de lâmina, os casos foram divididos em dois grandes grupos:

- **Grupo com recidiva – GCR (n=15)**
  - M0: subgrupo sem micrometástase linfonodal
  - M1: subgrupo com micrometástase linfonodal ou células tumorais isoladas
- **Grupo sem recidiva – GSR (n=68)**
  - M0: subgrupo sem micrometástase linfonodal
  - M1: subgrupo com micrometástase linfonodal ou células tumorais isoladas

As pacientes também foram agrupadas conforme a presença de micrometástase linfonodal ou células tumorais isoladas (n=6) e ausência de micrometástase linfonodal ou células tumorais isoladas (n=77)

Por fim, foi ainda realizada uma subdivisão de pacientes com ausência de invasão angiolinfática pela técnica de hematoxilina-eosina, mas com recidiva tumoral e/ou micrometástase linfonodal (n=15):

- D2-40 neg: subgrupo D2-40 negativo (n=14)
- D2-40 pos: subgrupo D2-40 positivo (n=1)

### 3.1 VARIÁVEIS ASSOCIADAS À PRESENÇA DE RECIDIVA TUMORAL

#### 3.1.1 Análise univariada

**Tabela 1.** Comparação entre os grupos (GCR vs GSR) em relação às variáveis.

Variáveis por Grupo (Recidiva)	Sem	Com	Total	P-valor
<i>Idade</i>				
Média (Desvio padrão)	46,7 (11,1)	42,5 (11,2)	45,9 (11,2)	0,195 <sup>#</sup>
Mediana (Mínimo - Máximo)	45 (23-70)	42 (24-69)	45 (23-70)	
Total	68	15	83	
<i>Tabagismo</i>				
<b>Sem informação</b>	<b>44</b>	<b>8</b>	<b>52</b>	
Não	12 (50)	3 (42,9)	15 (48,4)	1,000 <sup>**</sup>
Sim	12 (50)	4 (57,1)	16 (51,6)	
Total	24 (100)	7 (100)	31 (100)	
<i>Gestações</i>				
Média (Desvio padrão)	5,5 (3)	3,6 (2,4)	5,1 (3)	<b>0,041<sup>#</sup></b>
Mediana (Mínimo - Máximo)	5 (2-16)	3 (0-9)	5 (0-16)	
Total	57	13	70	
<i>Paridade</i>				
Média (Desvio padrão)	4,9 (2,9)	3,3 (2,4)	4,6 (2,9)	0,077 <sup>#</sup>
Mediana (Mínimo - Máximo)	4 (1-15)	2 (0-9)	4 (0-15)	
Total	57	13	70	
<i>Tamanho do maior eixo do tumor (cm)</i>				
Média (Desvio padrão)	1,8 (1,1)	2,5 (1,2)	1,9 (1,1)	<b>0,030<sup>#</sup></b>
Mediana (Mínimo - Máximo)	1,5 (0,8-5)	2,5 (0,6-5)	1,5 (0,6-5)	
Total	68	15	83	
<i>Diâmetro do Tumor</i>				
≤ 2 cm	47 (69,1)	7 (46,7)	54 (65,1)	0,159 <sup>***</sup>
> 2 cm e ≤ 4 cm	19 (27,9)	6 (40)	25 (30,1)	
> 4 cm	2 (2,9)	2 (13,3)	4 (4,8)	
Total	68 (100)	15 (100)	83 (100)	
<i>Tipo Histológico</i>				
<b>Adeno Mucinoso</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	
Adenocarcinoma	8 (11,9)	2 (13,3)	10 (12,2)	0,801 <sup>***</sup>
Adenoescamoso	2 (3)	1 (6,7)	3 (3,7)	
CA Epidermoide	57 (85,1)	12 (80)	69 (84,1)	
Total	67 (100)	15 (100)	82 (100)	
<i>GH</i>				
1	8 (11,8)	1 (6,7)	9 (10,8)	0,764 <sup>***</sup>
2	50 (73,5)	11 (73,3)	61 (73,5)	
3	10 (14,7)	3 (20)	13 (15,7)	
Total	68 (100)	15 (100)	83 (100)	

As categorias em amarelo foram excluídas das análises.

\*Teste Qui-quadrado;

\*\*Teste Exato de Fisher;

\*\*\*Teste da Razão de verossimilhança.

<sup>#</sup>Teste paramétrico *t* de Student;

Continua...

**Tabela 1. (Continuação).** Comparação entre os grupos (GCR vs GSR) em relação às variáveis.

Variáveis por Grupo (Recidiva)	Sem	Com	Total	P-valor
<i>NIC alto grau</i>				
Não	29 (42,6)	8 (53,3)	37 (44,6)	0,641*
Sim	39 (57,4)	7 (46,7)	46 (55,4)	
Total	68 (100)	15 (100)	83 (100)	
<i>IAL HE</i>				
Não	57 (83,8)	13 (86,7)	70 (84,3)	1,000**
Sim	11 (16,2)	2 (13,3)	13 (15,7)	
Total	68 (100)	15 (100)	83 (100)	
<i>Micrometástase Linfonodal AE1/AE3 ou Células Tumorais Isoladas AE1/AE3</i>				
Não	66 (97,1)	11 (73,3)	77 (92,8)	Não calculado
Sim - Células Tumorais Isoladas	0 (0)	1 (6,7)	1 (1,2)	
Sim - Micrometástase Linfonodal	2 (2,9)	3 (20)	5 (6)	
Total	68 (100)	15 (100)	83 (100)	
<i>Micrometástase</i>				
Não	66 (97,1)	11 (73,3)	77 (92,8)	<b>0,009**</b>
Sim	2 (2,9)	4 (26,7)	6 (7,2)	
Total	68 (100)	15 (100)	83 (100)	
<i>IAL D2 40</i>				
Sem informação	66	2	68	Não calculado
Não	2 (100)	12 (92,3)	14 (93,3)	
Sim	0 (0)	1 (7,7)	1 (6,7)	
Total	2 (100)	13 (100)	15 (100)	
<i>Estadiamento Clínico</i>				
IB1	65 (95,6)	10 (66,7)	75 (90,4)	<b>0,011***</b>
IB2	2 (2,9)	3 (20)	5 (6)	
IIA	1 (1,5)	2 (13,3)	3 (3,6)	
Total	68 (100)	15 (100)	83 (100)	
<i>Estadiamento Patológico</i>				
IB1	66 (97,1)	13 (86,7)	79 (95,2)	0,148**
IB2	2 (2,9)	2 (13,3)	4 (4,8)	
Total	68 (100)	15 (100)	83 (100)	
<i>Linfonodo Negativo</i>				
Média (Desvio padrão)	14,9 (8,9)	7,3 (5,7)	13,5 (8,9)	<b>&lt; 0,001#</b>
Mediana (Mínimo - Máximo)	12,5 (2 - 35)	7 (1 - 21)	11 (1 - 35)	
Total	68	15	83	

As categorias em amarelo foram excluídas das análises.

\*Teste Qui-quadrado;

\*\*Teste Exato de Fisher;

\*\*\*Teste da Razão de verossimilhança.

#Teste paramétrico t de Student;

Continua...

**Tabela 1. (Continuação).** Comparação entre os grupos (GCR vs GSR) em relação às variáveis.

Variáveis por Grupo (Recidiva)	Sem	Com	Total	p-valor
<i>Profundidade de Invasão estromal</i>				
< 1/3	40 (58,8)	6 (40)	46 (55,4)	0,236***
> 1/3 e < 2/3	15 (22,1)	3 (20)	18 (21,7)	
> 2/3	13 (19,1)	6 (40)	19 (22,9)	
Total	68 (100)	15 (100)	83 (100)	

As categorias em amarelo foram excluídas das análises.

\*Teste Qui-quadrado;

\*\*Teste Exato de Fisher;

\*\*\*Teste da Razão de verossimilhança.

#Teste paramétrico t-Student;

De acordo com os resultados da Tabela 1, há diferença significativa entre variáveis do GCR e GSR.

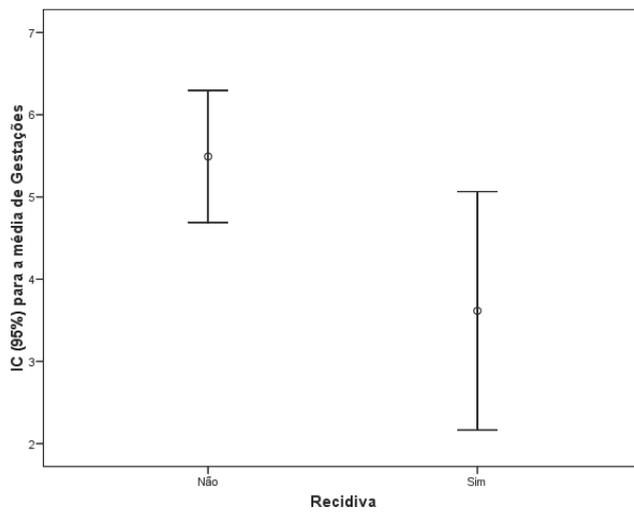
Os resultados mostraram que o número médio de gestações foi significativamente menor no grupo de pacientes com recidiva tumoral do que no grupo de pacientes sem recidiva tumoral (Figura 1).

Da mesma forma o tamanho médio do maior eixo do tumor (cm) foi significativamente maior no grupo de pacientes com recidiva tumoral do que no grupo de pacientes sem recidiva tumoral (Figura 2).

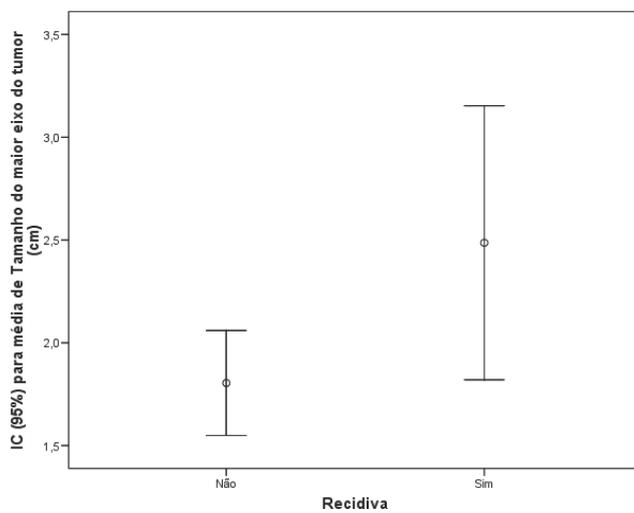
Ainda, como esperado, o percentual de MI linfonodal (Figura 3) e de estadiamento clínico IB2 e IIA (Figura 4) foram significativamente maiores no grupo de pacientes com recidiva tumoral do que no grupo de pacientes sem recidiva tumoral.

Por fim, o número médio de linfonodos negativos foi significativamente menor no grupo de pacientes com recidiva tumoral do que no grupo de pacientes sem recidiva tumoral (Figura 5).

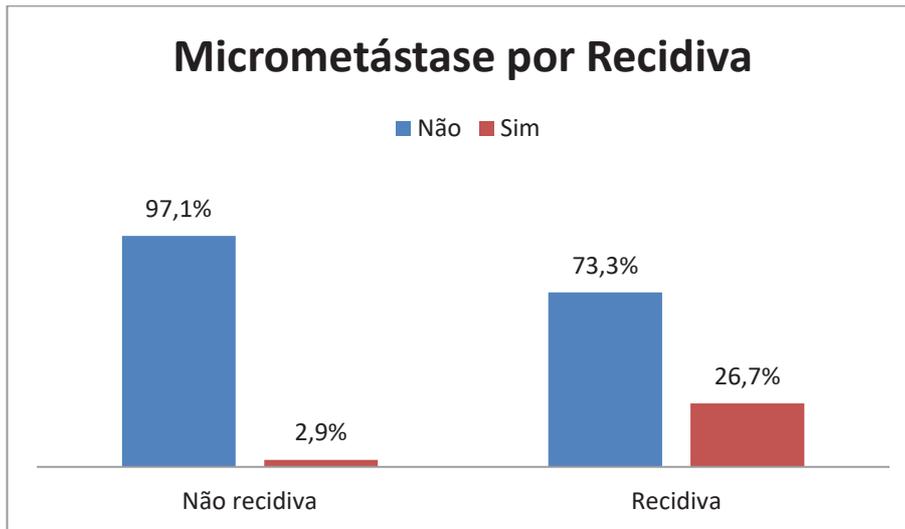
Os grupos (GCR vs GSR) não apresentaram relação significativa com as demais variáveis.



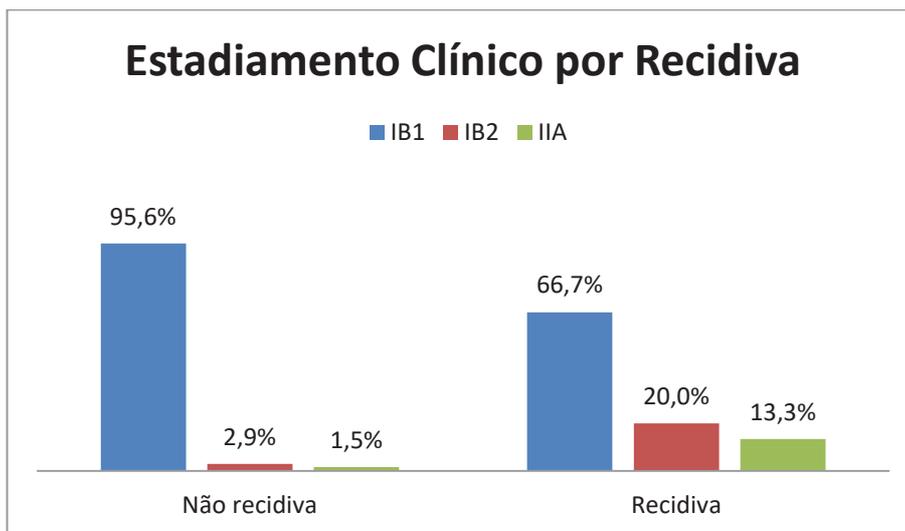
**Figura 1.** Comparação entre os grupos (Com recidiva tumoral vs Sem recidiva tumoral), em relação à variável Gestações.



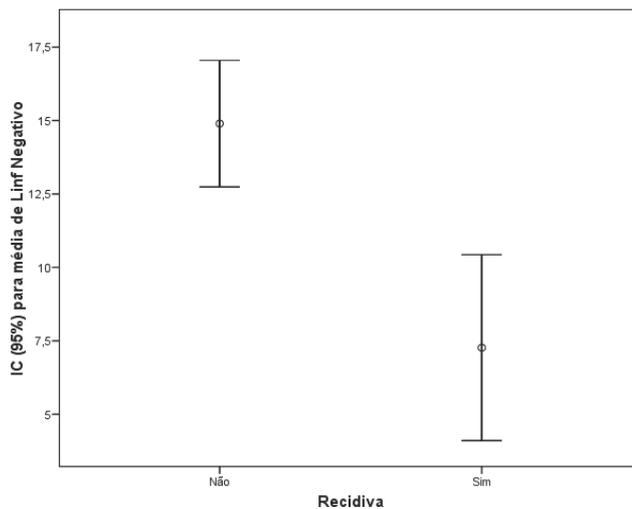
**Figura 2.** Comparação entre os grupos (Com recidiva tumoral vs Sem recidiva tumoral), em relação à variável Tamanho do maior eixo do tumor.



**Figura 3.** Comparação entre os grupos (Com recidiva tumoral vs Sem recidiva tumoral), em relação à variável Micrometástase linfonodal.



**Figura 4.** Comparação entre os grupos (Com recidiva tumoral vs Sem recidiva tumoral), em relação à variável Estadiamento clínico.



**Figura 5.** Comparação entre os grupos (Com recidiva tumoral vs Sem recidiva tumoral), em relação à variável Linfonodo negativo.

No GCR, a topografia das recidivas foi assim distribuída: 13 em topografia pélvica e duas à distância, sendo uma hepática e uma pulmonar. O tempo médio para recorrência foi de 20,6 meses, variando de 6 a 58 meses (dp=18,08, mediana=14 meses).

Ocorreram três óbitos no GCR, todos relacionados à recorrência da doença. O tempo médio transcorrido entre a cirurgia e o óbito foi de 19 meses (dp=3,21, mediana=9 meses). A taxa de sobrevida nesse grupo foi de 80% em cinco anos.

O número necessário para diagnosticar (NND) foi de 4,215 (2,703 – 28,633), considerando sensibilidade de 26,7% e especificidade de 97,1% da IHQ AE1/AE3 em relação a recidiva tumoral.

Os diferentes tipos de estadiamento possíveis na presente casuística, estadiamento clínico (FIGO) e patológico (UICC), foram comparados considerando-se todas as pacientes no geral e por grupos, com e sem recidiva tumoral e observamos que não houve diferença significativa entre os estadiamentos (clínico e patológico) no geral, excluindo o estadiamento IIA ou agregando-o ao estadiamento IB2 (Tabelas 6 e 7).

No entanto, houve diferença significativa entre os estadiamentos (clínico e patológico) por grupo, excluindo o estadiamento IIA ou agregando-o ao estadiamento IB2 (Tabelas 8 e 9).

Esses resultados, Tabelas e Figuras correspondentes (7 e 8), bem como detalhes estatísticos, encontram-se nos Apêndices.

**Tabela 2.** Comparação de invasão angiolinfática detectada pela técnica de imuno-histoquímica D2-40 e invasão angiolinfática detectada pela técnica de HE.

IAL HE	IAL D2-40			Total
	<i>Sem informação</i>	Não	Sim	
Não	55	14	1	15 (100)
Sim	13	0	0	0 (0)
Total	68	14 (93,3)	1 (6,7)	15 (100)
<b>p-valor</b>	Não calculado			

As categorias em amarelo foram excluídas da análise.

De acordo com os resultados da Tabela 2, dentre as pacientes com recidiva tumoral e/ou presença de MI linfonodal e ausência de IAL, uma apresentou positividade à IHQ D2-40. Não foi possível realizar teste estatístico em razão do pequeno número de pacientes detectados por ambas técnicas.

A Figura 9 mostrando fotomicrografia de IAL pela técnica de HE e as Figuras 10 e 11 mostrando fotomicrografias da paciente deste estudo com expressão positiva do marcador endotelial linfático D2-40, encontram-se nos Apêndices.

### 3.1.2 Regressão logística múltipla

**Tabela 3.** Resultado do modelo de regressão logística multivariado.

Variáveis independentes	OR [IC - 95%]	P-valor
Micrometástase Linfonodal (Sim x Não)	11,73 [1,57; 87,8]	<b>0,017</b>
Profundidade de invasão estromal		0,876
Profundidade de invasão estromal (< 1/3 x > 2/3)	1,16 [0,23; 5,87]	0,854
Profundidade de invasão estromal (> 1/3 e < 2/3 x > 2/3)	0,73 [0,12; 4,46]	0,738
Tamanho tumoral ( $\geq$ 2 cm x < 2 cm)	4,42 [1; 19,47]	<b>0,049</b>
Invasão angiolinfática - IAL HE (Sim x Não)	1,19 [0,2; 6,94]	0,846

A análise de regressão logística múltipla mostrou relação significativa entre micrometástase linfonodal e tamanho tumoral, e recidiva tumoral (Tabela 3). Observou-se que pacientes com micrometástase linfonodal apresentam chance 11,73 vezes maior de ter recidiva tumoral do que os pacientes sem micrometástase linfonodal. Da mesma forma pacientes com tamanho tumoral  $\geq$  2 cm tem 4,42 vezes mais possibilidade de ter recidiva tumoral do que os pacientes com tamanho tumoral < 2 cm.

### 3.2 VARIÁVEIS ASSOCIADAS À PRESENÇA DE MICROMETÁSTASE LINFONODAL NOS LINFONODOS PÉLVICOS

**Tabela 4.** Comparação entre os grupos (Com micrometástase linfonodal vs Sem micrometástase linfonodal), em relação às variáveis.

Variáveis por Grupo (Micrometástase)	Sem	Com	Total	p-valor
<i>Idade</i>				
Média (Desvio padrão)	46,1 (11,6)	43,7 (2,6)	45,9 (11,2)	0,158 <sup>#</sup>
Mediana (Mínimo - Máximo)	45 (23-70)	44,5 (40-46)	45 (23 - 70)	
Total	77	6	83	
<i>Tabagismo</i>				
<b>Sem informação</b>	<b>47</b>	<b>5</b>	<b>52</b>	
Não	14 (46,7)	1 (100)	15 (48,4)	Não calculado
Sim	16 (53,3)	0 (0)	16 (51,6)	
Total	30 (100)	1 (100)	31 (100)	
<i>Gestações</i>				
Média (Desvio padrão)	5,2 (3)	4,8 (2,9)	5,1 (3)	0,793 <sup>#</sup>
Mediana (Mínimo - Máximo)	4,5 (1 - 16)	5 (0 - 9)	5 (0 - 16)	
Total	64	6	70	
<i>Paridade</i>				
Média (Desvio padrão)	4,6 (2,9)	4,5 (2,9)	4,6 (2,9)	0,949 <sup>#</sup>
Mediana (Mínimo - Máximo)	4 (1 - 15)	4,5 (0 - 9)	4 (0 - 15)	
Total	64	6	70	
<i>Tamanho do maior eixo do tumor (cm)</i>				
Média (Desvio padrão)	1,9 (1)	2,8 (1,6)	1,9 (1,1)	0,053 <sup>#</sup>
Mediana (Mínimo - Máximo)	1,5 (0,8 - 5)	3 (0,6 - 5)	1,5 (0,6 - 5)	
Total	77	6	83	
<i>Diâmetro do Tumor</i>				
≤ 2 cm	52 (67,5)	2 (33,3)	54 (65,1)	0,209 <sup>***</sup>
> 2 cm e ≤ 4 cm	22 (28,6)	3 (50)	25 (30,1)	
> 4 cm	3 (3,9)	1 (16,7)	4 (4,8)	
Total	77 (100)	6 (100)	83 (100)	
<i>Tipo Histológico</i>				
<b>Adeno Mucinoso</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	
Adenocarcinoma	10 (13,2)	0 (0)	10 (12,2)	0,340 <sup>***</sup>
Adenoescamoso	3 (3,9)	0 (0)	3 (3,7)	
CA Epidermoide	63 (82,9)	6 (100)	69 (84,1)	
Total	76 (100)	6 (100)	82 (100)	
<i>GH</i>				
1	8 (10,4)	1 (16,7)	9 (10,8)	0,331 <sup>***</sup>
2	56 (72,7)	5 (83,3)	61 (73,5)	
3	13 (16,9)	0 (0)	13 (15,7)	
Total	77 (100)	6 (100)	83 (100)	

As categorias em amarelo foram excluídas das análises.

\*\*Teste Exato de Fisher;

\*\*\*Teste da Razão de verossimilhança.

<sup>#</sup>Teste paramétrico *t* de Student;

Continua...

**Tabela 4. (Continuação).** Comparação entre os grupos (Com micrometástase linfonodal vs Sem micrometástase linfonodal), em relação às variáveis.

Variáveis por Grupo (Micrometástase)	Sem	Com	Total	p-valor
<i>NIC alto grau</i>				
Não	33 (42,9)	4 (66,7)	37 (44,6)	0,400**
Sim	44 (57,1)	2 (33,3)	46 (55,4)	
Total	77 (100)	6 (100)	83 (100)	
<i>IAL HE</i>				
Não	64 (83,1)	6 (100)	70 (84,3)	0,583**
Sim	13 (16,9)	0 (0)	13 (15,7)	
Total	77 (100)	6 (100)	83 (100)	
<i>IAL d2 40</i>				
<b>Sem informação</b>	<b>68</b>	<b>0</b>	<b>68</b>	Não calculado
Não	8 (88,9)	6 (100)	14 (93,3)	
<b>Sim</b>	<b>1 (11,1)</b>	<b>0 (0)</b>	<b>1 (6,7)</b>	
Total	9 (100)	6 (100)	15 (100)	
<i>Estadiamento Clínico</i>				
IB1	71 (92,2)	4 (66,7)	75 (90,4)	0,077***
IB2	3 (3,9)	2 (33,3)	5 (6)	
IIA	3 (3,9)	0 (0)	3 (3,6)	
Total	77 (100)	6 (100)	83 (100)	
<i>Estadiamento AP</i>				
IB1	74 (96,1)	5 (83,3)	79 (95,2)	0,264**
IB2	3 (3,9)	1 (16,7)	4 (4,8)	
Total	77 (100)	6 (100)	83 (100)	
<i>Linf Negativo</i>				
Média (Desvio padrão)	13,5 (9)	13,2 (8,1)	13,5 (8,9)	0,921 <sup>#</sup>
Mediana (Mínimo - Máximo)	11 (1 - 35)	12,5 (4 - 27)	11 (1 - 35)	
Total	77	6	83	
<i>Profundidade de Invasão estromal</i>				
< 1/3	45 (58,4)	1 (16,7)	46 (55,4)	<b>0,046***</b>
> 1/3 e < 2/3	17 (22,1)	1 (16,7)	18 (21,7)	
> 2/3	15 (19,5)	4 (66,7)	19 (22,9)	
Total	77 (100)	6 (100)	83 (100)	

As categorias em amarelo foram excluídas das análises.

\*\*Teste Exato de Fisher;

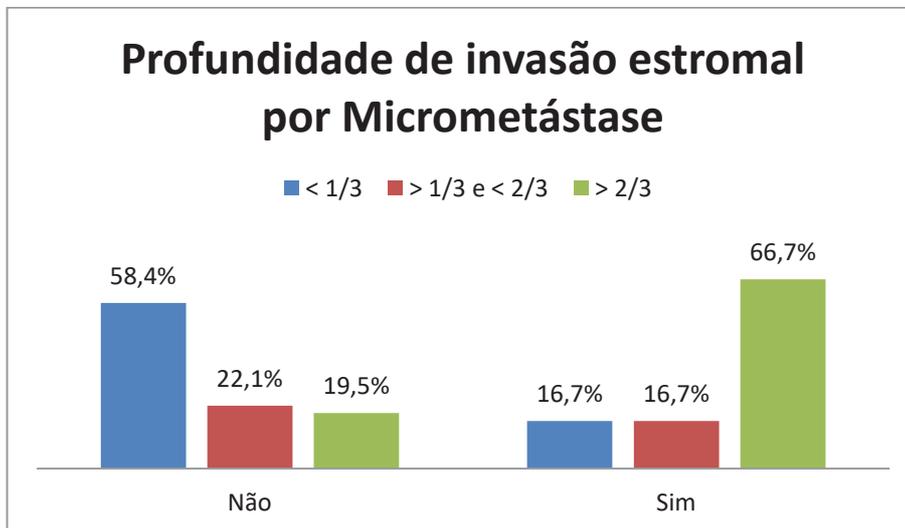
\*\*\*Teste da Razão de verossimilhança.

<sup>#</sup>Teste paramétrico *t* de Student;

Os resultados mostraram que apenas a profundidade de invasão estromal teve diferença significativa entre os dois grupos (Tabela 4).

O percentual de profundidade de invasão estromal > 2/3 foi significativamente maior no grupo de pacientes com MI linfonodal do que no grupo de pacientes sem MI linfonodal (Figura 6).

Os grupos (Com MI linfonodal vs Sem MI linfonodal) não apresentaram relação significativa com as demais variáveis.



**Figura 6.** Comparação entre os grupos (Com micrometástase linfonodal vs Sem micrometástase linfonodal), em relação à variável Profundidade de invasão estromal.

As Figuras de 12 a 14 mostrando fotomicrografias de CTI e MI linfonodal de pacientes deste estudo, encontram-se nos Apêndices.

A presença de MI linfonodal ou CTI não diagnosticada anteriormente pela técnica convencional de HE e que obtiveram mudança histopatológica com o emprego da IHQ com citoqueratina AE1/AE3, foi detectada em seis pacientes (7,23%)

Apenas uma paciente (1,20%) apresentou inclusão epitelial benigna associada à MI linfonodal. No total, cinco pacientes (6,02%) revelaram expressão da citoqueratina AE1/AE3 para inclusão epitelial benigna.

As Figuras 15 e 16 mostrando fotomicrografias de inclusão epitelial benigna de pacientes deste estudo, encontram-se nos Apêndices.

Novamente os diferentes tipos de estadiamento clínico (FIGO) e patológico (UICC) foram comparados entre si considerando-se os grupos com e sem micrometástase linfonodal. A comparação dos estadiamentos está apresentada nas Tabelas 6 e 7.

De acordo com os resultados da Tabela 10 e 11, houve diferença significativa entre os estadiamentos (clínico e patológico) por grupo, excluindo o estadiamento IIA ou agregando-o ao estadiamento IB2.

Esses resultados, Tabelas e Figuras correspondentes (17 e 18), bem como detalhes estatísticos, encontram-se nos Apêndices.

**Tabela 5.** Mortalidade por câncer de colo do útero entre os grupos (Com micrometástase linfonodal vs Sem micrometástase linfonodal)

Óbito	Micrometástase Linfonodal AE1/AE3		Total	P-valor
	Não	Sim		
Não	75	5	80	0,204
Sim	2	1	3	
<b>Total</b>	<b>77</b>	<b>6</b>	<b>83</b>	

**Teste Exato de Fisher**

Nossos resultados mostraram não haver diferença significativa entre presença de MI linfonodal e óbito (Tabela 5).

Todos os óbitos foram relacionados à recorrência da doença e a taxa de mortalidade foi de 16,67% e 2,60%, respectivamente, nos grupos com MI linfonodal e sem MI linfonodal.



O presente estudo identificou que a MI linfonodal, caracterizada pela IHQ, teve diferença significativa na comparação dos grupos com e sem recidiva tumoral. Nossos resultados corroboram os resultados de Van Trappen et al.<sup>116</sup>, Juretzka et al.<sup>22</sup>, Fregnani et al.<sup>41</sup>, Lentz et al.<sup>121</sup> e Marchiolé et al.<sup>80</sup>

A pesquisa da MI linfonodal no CCU, por meio da IHQ, não é realizada rotineiramente. Desconhecesse sua importância em termos de prognóstico ou se a eventual mudança de conduta adjuvante impactaria nas taxas de recidiva e sobrevida.

Os dados epidemiológicos analisados, diferentemente da maior parte da literatura, foram comparados entre grupos com e sem recidiva tumoral e à presença ou não de MI linfonodal.

Marchiolé et al.<sup>80</sup> comparou a variável idade entre grupos com e sem recidiva tumoral. Assim como neste estudo, não houve diferença significativa.

Lentz et al.<sup>121</sup> demonstrou significância estatística na associação de MI linfonodal com número de gestações igual ou superior a quatro. No presente estudo, o número médio de gestação global foi de 5,14, demonstrando ser uma condição importante no CCU. Contudo, não houve diferença significativa da presença de MI linfonodal, comparada às variáveis epidemiológicas.

Nesta casuística, o número médio de gestações foi o único dado demográfico com diferença significativa entre os grupos, sendo menor no GCR. Em relação à presença de MI linfonodal, nenhuma correlação epidemiológica positiva foi identificada.

#### *Micrometástases linfonodais*

Micrometástase linfonodal é descrita como fator prognóstico para câncer de mama, melanoma, câncer de esôfago e estômago. Entretanto, pouco se sabe a respeito da incidência ou do valor prognóstico no CCU.<sup>7,41</sup> Além disso, a pesquisa da MI linfonodal no CCU, por meio da IHQ, não é realizada rotineiramente. Também se desconhece a sua importância em termos de prognóstico ou se a mudança de conduta adjuvante impactaria nas taxas de recidiva e sobrevida.

Van Trappen et al.<sup>116</sup> determinaram a frequência de MI linfonodal em 156 linfonodos histologicamente negativos (média de 4,87 linfonodos), de 32 pacientes portadoras de CCU estágio clínico IA2 e IB (FIGO), usando como marcador a citoqueratina 19. Foram detectados 66 linfonodos positivos (44%) em 16 pacientes (50%). A MI foi associada à IAL, tumores pouco diferenciados e estágio clínico IB2. Recorrência tumoral ocorreu em três pacientes com linfonodos histologicamente negativos, mas que expressaram a citoqueratina 19.

Juretzka et al.<sup>22</sup> avaliaram a frequência de MI linfonodal em 49 pacientes com CCU estágio clínico IA2 e IB (FIGO). Os linfonodos foram seccionados na espessura de cinco micrômetros, e o terceiro e sétimo corte foram utilizados para IHQ com citoqueratina AE1 e AE1/CAM5.2. Metástase linfonodal foi demonstrada em quatro casos (8,2%). Notaram associação da doença com outros fatores de pior prognóstico, tais como IAL e tumor maior que 4 cm. Recorrência tumoral ocorreu em cinco pacientes, destas, duas apresentavam MI linfonodal.

Fregnani et al.<sup>41</sup> estudaram linfonodos de 289 pacientes com CCU estágio clínico IB – IIA (FIGO). Cada linfonodo foi seccionado uma vez e avaliado com IHQ AE1/AE3. Os depósitos de metástases foram estudados e divididos em três grupos: 1) sem doença metastática, 2) presença de CTI e MI linfonodal até 2 mm e 3) metástase maior que 2 mm. Onze pacientes (3,8%) foram identificadas com presença de CTI e/ou MI linfonodal e 37 pacientes (12,8%) com metástase maior que 2 mm. Houve significância estatística no intervalo livre de doença entre os grupos: 88,7%, 80,4% e 50%, respectivamente. Demonstraram que a MI linfonodal é uma variável independente associada à recorrência, aumentando 3,2 vezes o risco para recorrência tumoral, mesmo quando ajustada pela profundidade de invasão estromal, intensidade do processo inflamatório e doença metastática maior do que 2 mm.

Lentz et al.<sup>121</sup> avaliaram 132 pacientes com linfonodos histologicamente negativos, estágio clínico IA2 e IB de CCU. Os linfonodos foram seccionados e avaliados pela técnica HE e IHQ com citoqueratina AE1 e CAM5.2. Micrometástases foram encontradas em 19 casos (15%). Análise univariada mostrou que número elevado de linfonodos dissecados (acima de 20), número de gestações igual ou superior a 4 e o local da linfadenectomia (deve incluir pélvica e paraórtica), estão associados à presença de metástases. Não houve significância estatística na associação de linfonodos metastáticos com IAL, tamanho tumoral e tipo histológico. Análise multivariada mostrou que apenas o número de linfonodos ressecados mostrou-se independentemente associado ao diagnóstico de MI.

Marchiolé et al.<sup>80</sup>, em estudo de caso-controle, utilizando metodologia semelhante ao presente estudo, avaliaram o risco de recorrência em pacientes com CCU nos estádios IA1 a IIB e a presença MI linfonodal. O grupo caso consistia em 26 pacientes que apresentaram recorrência em período médio de 36,8 meses. O grupo controle consistia em 26 pacientes similares para idade, tipo histológico, estágio clínico e tamanho tumoral, os quais não recidivaram em seguimento médio de 122 meses. Cada linfonodo recebeu três cortes: um avaliado com HE e os outros dois com IHQ AE1/AE3. Linfonodos positivos foram encontrados em 42% dos casos e 4% dos controles. Por fim, demonstraram um risco de recorrência 2,4 vezes maior no grupo com presença de MI linfonodal. Em análise bivariada (invasão capilar vs MI linfonodal), o único fator de risco independente encontrado foi a MI linfonodal.

Na presente casuística, as variáveis associadas à recorrência tumoral foram a MI linfonodal, estadiamento clínico IB2 ou IIA, tamanho médio do tumor (cm) e número médio de linfonodos negativos por cirurgia. Já as variáveis associadas à presença MI linfonodal foram o estadiamento clínico IB2 e IIA e a profundidade de invasão estromal maior do que 2/3.

A presença de células neoplásicas nos linfonodos é o marcador histopatológico mais objetivo da disseminação linfática do tumor. Portanto, é lógico considerar que essa variável se associe à redução da sobrevida livre de doença.

Este resultado é concordante com os do estudo de Chao et al.<sup>127</sup> que, avaliando 83 pacientes com CCU (estádio IIB), submetidas à histerectomia

radical, verificaram que a recorrência foi significativamente mais frequente nos casos com metástases linfonodais (66,7% vs 31,3%).

O presente estudo excluiu pacientes com diagnóstico de metástases em linfonodos por ocasião do tratamento cirúrgico inicial. Isso permitiu classificar objetivamente a doença linfonodal em MI, uma vez que a avaliação prévia foi negativa à HE.

É importante ressaltar que, a presença de metástases linfonodais, detectadas apenas por IHQ não significa necessariamente que a doença seja micrometastática, ou seja, menor do que 2 mm. Não se pode confundir metástases ocultas ao método de HE com MI. O diagnóstico das MI é morfológico e conceitualmente compreende a mensuração do foco metastático.<sup>117</sup>

Nos trabalhos de Van Trappen et al.<sup>116</sup>, Juretzka et al.<sup>22</sup> e Lentz et al.<sup>121</sup>, a frequência de MI linfonodal foi maior do que neste estudo. Porém, a mensuração dos focos de MI não foi realizada, prejudicando a interpretação dos resultados e a comparação da frequência de MI nos linfonodos.

No trabalho de Lentz et al.<sup>121</sup>, a realização da linfadenectomia pélvica e paraórtica de forma sistemática pode ter influenciado o aumento da frequência de MI linfonodal. Ocasionalmente, esta prevalência poderia se alterar caso a dissecação linfonodal fosse exclusivamente pélvica.

Deve-se considerar também que o encontro de células epiteliais em linfonodos não implica necessariamente em diagnóstico de metástases, sendo de extrema importância sua avaliação morfológica. As inclusões epiteliais benignas representam focos ectópicos de epitélio embrionário dos ductos de

Muller que podem ser encontrados nos linfonodos, peritônio visceral (pélvico), omento maior, tubas, ovários e ligamentos uterinos. Em virtude de sua origem epitelial, as inclusões expressam citoqueratina e, portanto, podem ser identificadas por IHQ e facilmente confundidas com focos de metástases<sup>122</sup>.

Este estudo, assim como Fregnani et al.<sup>41</sup> e Marchiole et al.<sup>80</sup>, se propôs a diferenciar a metástase linfonodal da inclusão epitelial benigna. Van Trappen et al.<sup>116</sup>, Juretzka et al.<sup>22</sup> e Lentz et al.<sup>121</sup> não consideraram a possibilidade de intervenção nos resultados e isto pode ter aumentado a frequência das MI nos seus estudos.

No trabalho de Fregnani et al.<sup>41</sup>, a presença de MI linfonodal foi inferior à deste estudo, porém, cada linfonodo foi avaliado pela IHQ, somente, em um corte histológico. Caso fosse avaliado em cortes seriados, a frequência de MI linfonodal poderia ter sido maior.

Estima-se que a avaliação dos linfonodos por HE em cortes seriados, aumente a detecção de metástases em 8,0 a 30,0% e o uso de IHQ em 5,0 a 20,0% adicionais.<sup>128</sup> Pesquisadores do *International Ludwig Breast Cancer Study Group* avaliaram os linfonodos axilares, que preliminarmente foram considerados sem metástases, em 1.203 pacientes com câncer de mama. Os linfonodos foram avaliados por meio de cortes seriados em seis níveis e corados com HE. Em 83 casos (6,9%) foram encontradas metástases nos linfonodos.<sup>129</sup>

O trabalho de Marchiole et al.<sup>80</sup>, foi o único dos citados a separar as pacientes em grupos com recidiva tumoral e sem recidiva tumoral. A frequência de MI linfonodal, no grupo sem recidiva tumoral, foi similar à deste estudo.

Entretanto, o grupo com recidiva tumoral teve frequência de MI linfonodal superior. Porém, em sua análise não foram excluídas pacientes diagnosticadas com CCU estágio IIB, o que justifica maior número de pacientes com MI linfonodal em função do estadiamento clínico mais avançado.

Neste estudo, a presença de MI linfonodal, não diagnosticada pela técnica convencional de HE, foi de 7,23%. Houve diferença significativa na comparação entre os grupos, sendo 26,67% no GCR (n=4 de 15 casos) e 2,29% no GSR (n=2 de 68 casos). Em análise multivariada, considerando-se a presença de MI linfonodal, o risco de recidiva tumoral foi 11,73 vezes maior do que em pacientes sem Micrometástase Linfonodal.

Van Trappen et al.<sup>116</sup>, Juretzka et al.<sup>22</sup> e Lentz et al.<sup>121</sup> não determinaram o risco de recorrência segundo a presença de MI linfonodal. Marchiole et al.<sup>80</sup> estimou o risco de recorrência consequente às MI linfonodais, porém, o fez exclusivamente por análise bivariada.

Fregnani et al.<sup>41</sup> demonstrou por análise multivariada que a MI linfonodal representa fator de risco independente para a recorrência. Porém, não excluiu pacientes que fizeram tratamento adjuvante, o que já reduziria por si só o risco de recidiva. Também não realizou seguimento clínico de cinco anos, não sendo possível avaliar a taxa de sobrevida global dessas pacientes com MI linfonodal.

No presente estudo, o principal objetivo foi correlacionar a MI linfonodal com a taxa de recidiva tumoral. A sobrevida global dessas pacientes, que não realizaram tratamento adjuvante, também foi possível em virtude do seguimento clínico de cinco anos, como determinado pela FIGO.

Os dados deste estudo sugerem que as pacientes portadoras de CCU, submetidas à cirurgia radical nos estádios iniciais deveriam receber tratamento adjuvante quando houvesse: presença de MI linfonodal, estadiamento clínico IB2 ou IIA e profundidade de invasão estromal maior do que 2/3, este último não isoladamente, como será discorrido posteriormente.

O comprometimento das margens cirúrgicas, paramétrios e linfonodos pélvicos é indicação absoluta da radioterapia adjuvante. Outros fatores de risco comumente considerados para indicar radioterapia são tumores pouco diferenciados e invasão dos capilares sanguíneos e/ou linfáticos.<sup>12</sup> Contudo, os dados aqui apresentados não confirmaram que estas variáveis sejam fatores de risco para recorrência do CCU e presença de MI linfonodal. Portanto, questiona-se o real benefício da radioterapia adjuvante nos casos de neoplasias pouco diferenciadas (G2 e G3) ou com IAL isoladamente.

Até o presente momento, não há estudos sobre o valor do tratamento adjuvante nas pacientes diagnosticadas com MI linfonodal, em relação à sobrevida livre de doença e sobrevida global. O reduzido número de pacientes com MI linfonodal, o difícil diagnóstico e o alto custo para realizar a IHQ são fatores que desestimulam a realização desses trabalhos. Analisando a população deste trabalho, segundo o cálculo do NND, seria necessário realizar 4,2 exames de IHQ AE1/AE3 para diagnóstico de apenas um caso de MI linfonodal. Apesar da positividade do método não significar necessariamente a ocorrência da recidiva tumoral, o que implicaria em eventual radioterapia desnecessária, a MI linfonodal mostrou-se fator de risco marcante a ser considerado.

A interpretação de qualquer teste, e sua qualidade, não pode ser feita sem olhar quais as consequências que um teste positivo ou negativo pode ter. Onde as consequências são significativas precisamos dos melhores testes, mas onde as consequências são mínimas, podemos usar testes com NND mais altos.

Diversos marcadores específicos do sistema linfático têm sido desenvolvidos. Estudos recentes demonstram que a positividade peritumoral do D2-40 é um preditor independente de metástase linfonodal.<sup>81,83,107-110</sup>

Neste estudo, a interpretação dos resultados obtidos pela IHQ usando o D2-40 é difícil considerando o número limitado de pacientes nos quais a técnica foi realizada. É possível que outros estudos com um número maior de pacientes permita melhor avaliar a utilidade e o custo/benefício desse marcador.

#### *Outros fatores de risco para recidiva e MI linfonodal*

As taxas de sobrevida e controle de doença pélvica associam-se com o estágio da FIGO. Benedet et al. (2003) publicaram o estudo multicêntrico mundial *Annual Report on The Results of Treatment on Gynecological Cancers* (FIGO), contendo 13.982 casos de CCU em todos os estádios clínicos. Notou-se que a sobrevida livre de doença, foi tanto menor quanto mais avançado o estadiamento.<sup>37</sup> Condizente com este estudo, na avaliação da variável estadiamento clínico, os grupos GCR e pacientes com MI linfonodal apresentaram maior prevalência dos estádios IB2 e IIA, quando comparados aos grupos GSR e pacientes sem MI linfonodal, com diferença significativa.

Menor tamanho clínico do tumor também se correlaciona com menor sobrevida livre de doença: tumores microscópicos, menores ou iguais a 3 cm e maiores do que 3 cm, têm 94,8%, 88,1% e 67,6% respectivamente.<sup>62</sup> O diâmetro do tumor está associado à recorrência do CCU, não apenas por sua dimensão, mas pela área, volume ou quociente entre o diâmetro do tumor e do colo do útero.<sup>63</sup>

Gauthier et al. (1985) encontraram taxas de recorrência de 7,0%, 26,0% e 57,0%, respectivamente, para tumores com menos de 2 cm, entre 2 e 3 cm e maiores do que 3 cm de diâmetro.<sup>64</sup>

Neste estudo, o tamanho médio do tumor também apresentou diferença significativa na comparação dos grupos GCR e GSR, sendo maior o tamanho médio do tumor no GCR.

Em análise multivariada as pacientes deste estudo, com tamanho tumoral  $\geq 2$  cm, apresentaram chance 4,42 vezes maior de ter recidiva tumoral do que as pacientes com tamanho tumoral  $< 2$  cm.

Em estudo com 732 pacientes diagnosticadas com CCU, a sobrevida livre de doença em três anos foi progressivamente menor com o aumento da invasão estromal.<sup>62</sup>

Neste estudo, identificou-se que a profundidade de invasão estromal maior do que 2/3 está significativamente associada à MI linfonodal que, por sua vez, apresenta correlação positiva com recidiva tumoral. Contudo, a invasão estromal profunda não se correlacionou diretamente com a recidiva tumoral.

Ao invadir o estroma cervical, a neoplasia induz a expressão de fatores que irão promover a angiogênese e a linfangiogênese. Com a formação de

novos vasos sanguíneos e linfáticos, a disseminação pode ocorrer por qualquer uma dessas vias. Tendo em vista a não associação da invasão estromal profunda com a recidiva tumoral, seria imprescindível um evento intermediário, como a presença da MI linfonodal.

O número médio de linfonodos ressecados por cirurgia é também fator preditor para recidiva tumoral e presença de MI linfonodal. Lentz et al.<sup>121</sup> demonstrou significância estatística na associação do número elevado de linfonodos dissecados por cirurgia (acima de 20) com a presença de metástases.

Este estudo condiz com o achado acima. O GCR teve número médio de linfonodos dissecados por cirurgia estatisticamente menor, quando comparado ao GSR. O que faz supor que a linfadenectomia sistemática e não apenas uma amostragem linfonodal, é importante na predição da recidiva tumoral e da MI linfonodal.

Cerca de 20 a 25% das pacientes portadoras de CCU em estádios iniciais (IB e IIA), tratadas adequadamente por cirurgia radical desenvolvem recorrência da doença, com 90% nos primeiros dois anos de seguimento oncológico.<sup>8</sup> A razão para essa recorrência seria a persistência microscópica da doença em topografia locorregional ou à distância.

Na presente casuística, a taxa de recidiva foi 18,07% (n=15), discretamente menor do que na literatura. Porém, neste estudo, foram selecionadas apenas pacientes com baixo risco de recidiva tumoral e que não foram submetidas a nenhuma modalidade de tratamento adjuvante. Pacientes em estádios iniciais, mas com alto risco de desenvolverem recidiva, em virtude

de critérios histopatológicos, foram excluídas da amostra por receberem tratamento adjuvante.

Da mesma forma, a sobrevida global das pacientes relatadas, foi de 96,39% maior, em comparação à média de 91,5% nas diversas séries.<sup>8</sup>

Neste estudo, não houve diferença significativa entre presença de MI linfonodal e óbito. Todas as pacientes sem recidiva tumoral tiveram seguimento clínico e alta oncológica após cinco anos. Portanto, apenas 15 pacientes poderiam ter morrido, tornando nossa amostra pequena para avaliar tal variável. Provavelmente, em uma amostra maior de pacientes com recidiva tumoral e MI linfonodal, ou mesmo maior tempo de seguimento a partir da data da recidiva, o número de óbitos teria sido maior.

O presente estudo retrospectivo possui o maior tempo de seguimento oncológico, 60 meses. Nenhuma outra série associou a variável de comprometimento angiolinfático, por meio do marcador endotelial linfático D2-40, à presença da MI linfonodal. Também não há estudo na literatura que tenha realizado comparação da sobrevida global de pacientes com e sem MI linfonodal.

No presente estudo, fatores de risco histopatológicos, muito valorizados na literatura, como IAL e invasão estromal profunda, não obtiveram correlação direta com a presença de recidiva tumoral, quando avaliados isoladamente.

Em resumo, considera-se que a presença de MI linfonodal seja fator de risco importante para recidiva tumoral e, que por isso, essas pacientes poderiam se beneficiar de tratamento radioquimioterápico adjuvante.

As diretrizes atuais direcionam cada vez mais para a pesquisa de MI linfonodal apenas no linfonodo sentinela, sobretudo devido a limitações de custo em estudos de grande porte. Recentemente, Cibula et al. estudaram 645 pacientes diagnosticadas com CCU estágio clínico inicial submetidas a cirurgia oncológica com biópsia de linfonodo sentinela seguido de linfadenectomia pélvica e *ultrastaging* patológico do linfonodo sentinela. Macrometástase linfonodal, MI linfonodal e CTI foram identificadas pelo *upstaging*, respectivamente em: 14,7%, 10,1% e 4,5%. Falso negativo alcançou 2,8%. A presença de CTI não diminuiu significativamente a sobrevida livre de doença e sobrevida global. A MI linfonodal reduziu significativamente a sobrevida global de forma equivalente a macrometástase, demonstrando a importância do linfonodo sentinela e do *ultrastaging* patológico no tratamento do CCU.<sup>130</sup>

São necessários novos estudos que relacionem a presença de MI linfonodal e radioterapia adjuvante, com objetivo de avaliar a sobrevida livre de doença e sobrevida global nesta situação.

## **5. CONCLUSÕES**

---

- a1)** A incidência de micrometástase linfonodal nos estádios iniciais (IB1 - IIA) do câncer de colo do útero foi de 7,23%;
- a2)** Em pacientes com recidiva tumoral, essa incidência foi de 26,67%, havendo diferença significativa quando comparada às pacientes sem recidiva;
- a3)** Pacientes com Micrometástase Linfonodal apresentaram chance 11,73 vezes maior de ter recidiva tumoral do que pacientes sem Micrometástase Linfonodal;
- a4)** Considerando-se exclusivamente a presença de micrometástase linfonodal, não houve diferença significativa na mortalidade em 60 meses;
- b)** O marcador endotelial linfático D2-40 foi positivo apenas em um caso, o que impossibilitou sua comparação com achados histopatológicos convencionais por meio da coloração hematoxilina-eosina.

## **6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA**

---

1. Darai E, Rouzier R, Ballester M, Barranger E, Coutant C. Sentinel lymph node biopsy in gynaecological cancers: The importance of micrometastases in cervical cancer. *Surgical Oncology* 2008; 17:227-235.
2. Ricci MD, Piato S, Pinotti JA. Câncer do Colo Uterino. In: Ricci MD, Piato JRM, Piato S, Pinotti JÁ. *Oncologia ginecológica: aspectos atuais do diagnóstico e do tratamento*. São Paulo: Manole; 2008. p. 133-167.
3. Estimativa 2014: Incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA, 2014.
4. Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero / Instituto Nacional de Câncer. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Divisão de Apoio à Rede de Atenção Oncológica – Rio de Janeiro: INCA, 2011.
5. Curado MP, Edwards B, Shin HR, Storm H, Ferlay J, Heanue M, Boyle P. *Cancer incidence in five continents*. Lyon: IARC; 2007. (IARC Scientific Publication nº 160, vol IX).
6. Parkin DM, Bray FI, Devesa SS. Cancer burden in the year 2000: the global picture. *Eur J Cancer* 2001; 37 Suppl 8:S4-66.
7. Coutant C, Barranger E, Cortez A, Dabit D, Uzan S, Bernaudin JF, et al. Frequency and prognostic significance of HPV DNA in sentinel lymph nodes of patients with cervical cancer. *Annals of Oncology* 2007; 18:1513-1517.
8. DiSaia PJ, Creasman WT. *Clinical gynecologic oncology*. Ed. Mosby Elsevier, 7<sup>th</sup> edition – 2007; p. 1-36, 55-124.

9. HPV e câncer – Perguntas mais frequentes. Instituto Nacional de Câncer – INCA. INCA, 2014. Disponível em: [http://www1.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=2687](http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=2687).
10. Pinotti JA, Fonsceca AM, Bagnoli VR. Tratado de ginecologia. Ed. Revinter, 1ª Ed. RJ, 2005; p. 755-759.
11. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines) – Cervical Cancer. Version 3.2013, 16/04/13. National Comprehensive Cancer Network, Inc. 2013.
12. Manual de condutas em ginecologia oncológica / Hospital A.C.Camargo, Departamento de Ginecologia. 1 ed. – São Paulo: FAP;2010.68p.
13. Plummer M, Peto J, Franceschi S, on behalf of the International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer. Time since first sexual intercourse and the risk of cervical cancer. Int J Cancer 2012 Jun 1; 130(11):2638-2644.
14. International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer. Cervical carcinoma and sexual behavior: collaborative reanalysis of individual data on 15,461 women with cervical carcinoma and 29,164 women without cervical carcinoma from 21 epidemiological studies. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2009 Apr; 18(4):1060-9.

15. International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer, Appleby P, Beral V, González AB, Colin D, Franceschi S, et al. Cervical cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data for 16,573 women with cervical cancer and 35,509 women without cervical cancer from 24 epidemiological studies. *Lancet* 2007 Nov 10; 370(9599):1609-21.
16. International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer. Cervical carcinoma and reproductive factors: collaborative reanalysis of individual data on 16,563 women with cervical carcinoma and 33,542 women without cervical carcinoma from 25 epidemiological studies. *Int J Cancer* 2006 Sep 1; 119(5):1108-24.
17. International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer, Appleby P, Beral V, González AB, Colin D, Franceschi S, et al. Carcinoma of the cervix and tobacco smoking: collaborative reanalysis of individual data on 13,541 women with carcinoma of the cervix and 23,017 women without carcinoma of the cervix from 23 epidemiological studies. *Int J Cancer* 2006 Mar 15; 118(6):1481-95.
18. Mascarello KC, Silva NF, Piske MT, Viana KCG, Zandonade E, Amorim MHC. Perfil sociodemográfico e clínico de mulheres com câncer do colo do útero associado ao estadiamento inicial. *Revista Brasileira de Cancerologia* 2012; 58(3):417-423.
19. Brito DMS, Galvão MTG, Pereira MLD. Marcadores de vulnerabilidade ao câncer de colo do útero em mulheres infectadas pelo HIV. *Rev Latino-Am Enfermagem* 2011 Maio-Jun; 19(3):(08 telas).

20. Rehme MFB, Ihlenfeld MFK, Chuery ACS. Adenocarcinoma de células claras de endocérvice em menina de 7 anos. Rev Bras Ginecol Obstet vol.20 n.7 Rio de Janeiro Aug. 1998.
21. FEBRASGO – Manual de orientação trato genital inferior. Primeira reunião de consenso da FEBRASGO sobre prevenção do câncer do colo uterino. São Paulo, 21 de Agosto de 2010; p 167-74.
22. Juretzka MM, Jesen KC, Longracre TA, Teng NN, Husain A. Detection of pelvic lymph node micrometastasis in stage IA2-IB2 cervical cancer by immunohistochemical analysis. Gynecologic Oncology 2004; 93:107-111.
23. Hale RJ, Wilcox FL, Buckley CH. Prognostic factors in uterine cervical carcinoma: A clinicopathological analysis. Int J Gynecol Cancer 1991; 1:19-23.
24. Shingleton HM, Gor H, Bradley DH. Adenocarcinoma of the cervix: I. Clinical evaluation and pathologic features. Am J Obstet Gynecol 1981; 139:799-814.
25. Yazigi R, Sandstad J, Munoz AK. Adenosquamous carcinoma of the cervix: Prognosis in stage IB. Obstet Gynecol 1990; 75:1012-1015.
26. Kosiniska-Kaczynska K, Mazanowska N, Bomba-Opon D, Horosz E, Marczevska M, Wielgos M. Glassy cell carcinoma of the cervix – a case report with review of the literature. Ginekol Pol 2011 Dec; 82(12):936-9.
27. Guitarte C, Alagkiozidis I, Mize B, Stevens E, Salame G, Yi-Chun L. Glassy cell carcinoma of the cervix: A systematic review and meta-analysis. Gynecol Oncol 2014 Feb 4.

28. Kaur P, Khurana A, Chauhan AK, Singh G, Kataria SP, Singh S. Adenoid cystic carcinoma of cervix: treatment strategy. *J Clin Diagn Res* 2013 Nov 7; 7(11):2596-7.
29. Chen TD, Chuang HC, Lee LY. Adenoid basal carcinoma of the uterine cervix: clinicopathologic features of 12 cases with reference to CD117 expression. *Int J Gynecol Pathol* 2012 Jan; 31(1):25-32.
30. Van Nagell JR, Powell DE, Gallion HH. Small cell carcinoma of the uterine cervix. *Cancer* 1988; 62:1586-1593.
31. Trinh XB, Borgers JJ, Van Marck EA, Tjalma WA. Treatment policy of neuroendocrine small cell cancer of the cervix. *Eur J Gynaecol Oncol* 2004; 25:40-44.
32. Hoskins PJ, Swenerton KD, Pike JA, Pike JA, Aquino-Parsons C, Wong F, et al. Small-cell carcinoma of the cervix: fourteen years of experience at a single institution using a combined-modality regimen of involved-field irradiation and platinum-based combination chemotherapy. *J Clin Oncol* 2003; 21(18):3495-3501.
33. Kim JH, Lee SH, Park J, et al. Extrapulmonary small-cell carcinoma: a single-institution experience. *Jpn J Clin Oncol* 2004; 34(5):250-254..
34. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW. World Health Organization Classification of Tumours Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. Lyon, France: 2001.
35. Pecorelli S. Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, and endometrium. *Int J Gynaecol Obstet* 2010 Feb; 108(2):176.

36. Andrade JM, Yamaguchi NH, Oliveira AB, Perdicaris M, Pereira ST, Petitto JV, Alves MJ. Rastreamento, diagnóstico e tratamento do carcinoma do colo do útero. Projeto Diretrizes. Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina. Elaboração final: 16 de maio de 2001
37. Benedet JL, Odicino F, Maisonneuve P, Beller U, Creasman WT, Heintz AP, Ngan HY, Pecorelli S. Carcinoma of the cervix uteri. *Int J gynaecol Obstet* 2003 Oct; 83 Suppl 1:41-78
38. Greene FL, Page DL, Fleming, et al. *AJCC Cancer staging handbook*. 6 th ed. New York: Springer-verlag; 2002. Gynecology sites: cervix uteri; p.293-8
39. Sartori E, Tisi G, Chiudinelli F, La Face B, Franzini R, Pecorelli S. Early stage cervical cancer: Adjuvant treatment in negative lymph node cases. *Gynecologic Oncology* 2007; 107:170-174.
40. Cândido EB, Silva-Filho AL, Triginelli SA, Pedrosa MS, Macarengo R, Porto L, Traiman P. Histopathological and immunohistochemical (cytokeratins AE1/AE3) study of the parametrium of patients with early stage cervical cancer. *Eur J Obstet Gynecol ReprodBiol* 2008 Nov; 141(1):58-63.
41. Fregnani JH, Latorre MR, Vovik PR, Lopes A, Soares FA. Assessment of pelvic lymph node micrometastatic disease in stages IB and IIA of carcinoma of the uterine cervix. *Int J Gynecol Cancer* 2006 May-Jun; 16(3):1188-94.
42. Maluf FC, Souza CE, Azevedo FC, Saraigiotto DF. Câncer ginecológico: tratamento multidisciplinar. São Paulo. Dendrix Edição e Design Ltda., 2010; p. 354-86.

43. Rotman M, Sedlis A, Piedmonte MR, Bundy B, Lentz SS, Muderspach LI, Zaino RJ. A phase III randomized trial of postoperative pelvic irradiation in stage IB cervical carcinoma with poor prognostic features: follow-up of a gynecologic oncology group study. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys* 2006; 65(1):169-76.
44. Sedlis A, Bundy BN, Rotman MZ, Lentz SS, Muderspach LI, Zaino RJ. A randomized trial of pelvic radiation therapy versus no further therapy in selected patients with stage IB carcinoma of the cervix after radical hysterectomy and pelvic lymphadenectomy: a gynecologic oncology group study. *Gynecologic Oncology* 1999; 73:177-183.
45. Benedet JL, Anderson GH. Stage IA carcinoma of the cervix revisited. *Obstet Gynecol* 1996; 87:1052-9.
46. Ostor AG. Pandora's Box or Ariadne's thread? Definition and prognostic significance of microinvasion in the uterine cervix squamous lesions. *Pathol Annu* 1995; 30(2):103-36.
47. Hauspy J, Beiner M, Harley I, Ehrlich L, Rasty G, Covens A. Sentinel lymph nodes in early stage cervical cancer. *Gynecologic Oncology* 2007; 105:285-290.
48. Bats AS, Clément D, Larousserie F, Lefrère-Belda MA, Faraggi M, Froissart M, et al. Sentinel lymph node biopsy improves staging in early cervical cancer. *Gynecologic Oncology* 2007; 105:189-193.

49. Marchiolé P, Buénerd A, Scoazec JY, Dargent D, Mathevet P. Sentinel lymph node biopsy is not accurate in predicting lymph node status for patients with cervical carcinoma. *American Cancer Society* 2004; 100:2154-2159.
50. Rose PG, Bundy BN, Watkins J. Concurrent cisplatin-based chemotherapy and radiotherapy for locally advanced cervical cancer. *N Engl J Med* 1999; 340:1144-53.
51. Whitney CW, Sause W, Bundy BN. A randomized comparison of fluorouracil plus cisplatin versus hydroxyurea as an adjunct to radiation therapy in stages IIB-IVA carcinoma of the cervix with negative para-aortic lymph nodes: a Gynecologic Oncology Group and Southwest Oncology Group study. *J Clin Oncol* 1999; 17:1339.
52. Keys HM, Bundy BN, Stehman FB. Cisplatin, radiation, and adjuvant hysterectomy for bulky stage IB cervical carcinoma. *N Engl J Med* 1999; 340:1154-61.
53. Morris M, Eifel PJ, Lu J. Pelvic radiation with concurrent chemotherapy compared with pelvic and paraaortic for high-risk cervical cancer. *N Engl J Med* 1999; 340:1137-1143.
54. Green J, Kirwan J, Tierney J, et al. Concomitant chemotherapy and radiation therapy for cancer of the uterine cervix (Cochrane Review) (<http://cochrane.bireme.br/cochrane/main.php?lang=>).
55. Thoms WW, Unger ER, Johnson PR, Spann CO, Hunter SH, et al. Cervical cancer survival in a high risk urban population. *Cancer* 1995 Dec 15; 76(12):2518-23.

56. Zhang Y, Yan M, He J, Sun J, Sun X. Significant effects of lymph and blood vascular invasion on the prognosis of early-stage cervical squamous cell carcinoma. *J Obstet Gynecol Res* 2010 Oct; 36(5):1015-22.
57. Graflund M, Sorbe B, Hussein A, Bryne M, Karlsson M. The prognostic value of histopathologic grading parameters and microvessel density in patients with early squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Int J Gynecol Cancer* 2002 Jan-Feb; 12(1):32-41.
58. Piura B, Rabinovich A, Friger M. Number and distribution of pelvic lymph nodes and effects 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 Gynecol Oncol* 2006; 27(5):463-6.
59. 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 Gynecol Oncol* 2006; 27(6):573-8.
60. Wilting J, Hawighorst T, Hecht M, Christ B, Papoutsi M. Development of lymphatic vessels: tumour lymphangiogenesis and lymphatic invasion. *Curr Med Chem* 2005; 12(26):3043-53.
61. Ayhan A, Al RA, Baykal C, Demirtas E, Ayhan A, Yuce K. Prognostic factors in FIGO stage IB cervical cancer without lymph node metastasis and the role of adjuvant radiotherapy after radical hysterectomy. *Int J Gynecol Cancer* 2004 Mar-Apr; 14(2):286-92.

62. Delgado G, Bundy B, Zaino R, Sevin BU, Creasman WT, Major F. Prospective surgical-pathological study of disease-free interval in patients with IB squamous cell carcinoma of the cervix: a gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol* 1990 Sep; 38(3):352-7.
63. Martin-Loeches M, Orti RM, Cazorla E, Asins E, Llixiona J. Multivariate analysis of the morphometric characteristics of tumours prognostic factors in the survival of patients with uterine cervix cancer treated with radical csugery. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2002; 105:170-6.
64. Gauthier P, Gore I, Shingleton HM, Soong SJ, Orr JW Jr, Hatch KD. Identification of histopathologic risk groups in stage IB squamous cells carcinoma of the cervix. *Obstet Gynecol* 1985; 66:569-75.
65. Shingleton HM, Bell MC, Fremgen A, Chmiel JS, Russell AH, Jones WB, et al. Is there really a difference in survival of women with squamous cell carcinoma, adenocarcinoma, and adenosquamous cell carcinoma of the cervix?. *Cancer* 1995 Nov 15; 76(10 Suppl):1948-55.
66. Stock RJ, Zaino R, Bundy BN, Askin FB, Woodward J. Evaluation and comparison of histopathologic grading systems of epithelial carcinoma of the uterine cervix: Gynecologic Oncology Group studies. *Int J Gynecol Pathol* 1994 Apr; 13(2):99-108.
67. Davidson B, Goldberg I, Gotlieb WH, Lerner-Geva L, Ben-Baruch G, et al. Macrophage infiltration and angiogenesis in cervical squamous cell carcinoma – clinicopathologic correlation. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1999 Mar; 78(3):240-4.

68. Horn LC, Fischer U, Bilek K. [Histopathological prognostic factors in primary surgically treated cervix carcinoma]. *Zentralbl Gynakol* 2001 May; 123(5):266-74.
69. Fregnani JH, Soares FA, Novik PR, Lopes A, Iatorre Mdo R. Unusual risk factors for lymph node metastasis in cancer of the uterine cervix. *Rev Assoc Med Bras* 2007 Jul-Aug; 53(4):338-43.
70. Chi DS, Lanciano RM, Kudelka AP. Cervical Cancer. In: Pazdur R, Hoskins WJ, Coia LR, Wagman LD, editors. *Cancer management – a multidisciplinary approach*. 2004:419-448.
71. 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.
72. Tavares MB, Souza 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.
73. Xiong Y, Cao LP, Rao HL, Cai MY, Liang LZ, Liu JH. Clinical significance of peritumoral lymphatic vessel density and lymphatic vessel invasion detected by D2-40 immunostaining in FIGO IB1-IIa squamous cell cervical cancer. *Cell and Tissue Research* 2012 Jun; 348(3):515-22.
74. Gombos Z, Xu X, Chu CS, et al. 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; 11:8364-8371.

75. Cai L, Yang S, Ding H, Cai J, Wang Z. Tumor-associated lymphatic endothelial cell promotes invasion of cervical cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 2013 Apr 18.
76. Gao P, Zhou Gy, Yin G, Liu Y, Liu ZY, Zhang J, Hao CY. Lymphatic vessel density as a prognostic indicator for patients with stage I cervical carcinoma. *Hum Pathol* 2006 Jun; 37(6):719-25.
77. Zhang SQ, Yu H, Zhang LL. Clinical implications of increased lymph vessel density in the lymphatic metastasis of early-stage invasive cervical carcinoma: a clinical immunohistochemical method study. *BMC Cancer*. 2009 Feb 21; 9:64.
78. Stacker SA, Achen MG, Jussila L, Baldwin ME, Alitalo K. Lymphangiogenesis and cancer metastasis. *Nat Rev Cancer* 2002 Aug; 2:573-83.
79. Benedetti-Panici P, Maneschi F, Scambia G, Greggi S, Cutillo G, D'Andrea G, et al. Lymphatic spread of cervical cancer: Na anatomical and pathological study based on 225 radical hysterectomies with systematic pelvic and aortic lymphadenectomy. *Gynecologic Oncology* 1996; 62:19-24.
80. Marchiolé P, Buénerd A, Benchaib M, Nezhat K, Dargent D, Mathevet P. Clinical significance of lympho vascular space involvement and lymph node micrometastases in early-stage cervical cancer: A retrospective case-control surgico-pathological study. *Gynecologic Oncology* 2005; 97:727-32.

81. Inoue M, Roan CH, Abe T, Buery RR, Nagatsuka H, Katase N, Nagai N, Setsu K. Localization and characterization of lymphatic vessels in oral and cervical squamous cell carcinoma. *Experimental and Therapeutic Medicine* 2011; 2:793-97.
82. Saad RS, Isiil N, Ghorab Z, Nofech-Mozes S, Dubé V, Couvens A, Khalifa MA. Lymphatic vessel density as a prognostic marker in clinical stage I endocervical adenocarcinoma. *J Gynecol pathol* 2010 Jul; 29(4):386-93.
83. 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.
84. Morice P, Castaigne D, Pautier P, et al. Interest of pelvic and paraaortic lymphadenectomy in patients with stage IB and II cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 1999; 13:106-10.
85. Achen MG, Stacker SA. Molecular control of lymphatic metastasis. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1131:225-34.
86. 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.
87. 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.

88. 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.
89. Das S, Skobe M. Lymphatic vessel activation in cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1131:235-41.
90. Stacker SA, Achen MG, Jussila L, Baldwin ME, Alitalo K. Lymphangiogenesis and cancer metastasis. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(8):573-83.
91. Saharinen P, Petrova TV. Molecular regulation of lymphangiogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1014:76-87.
92. Sotiropoulou N, Bravou V, Kounelis S, Damaskou V, Papaspirou E, Papadaki H. Tumor expression of lymphangiogenic growth factors but not lymphatic vessel density is implicated in human cervical cancer progression. *Pathology* 2010 Dec; 42(7):629-36.
93. 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.
94. Saptefrati L, Cimpean AM, Ciorni 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.
95. Wicki A, Christofori G. The potential role of podoplanin in tumour invasion. *Br J Cancer* 2007; 96(1):1-5.

96. 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.
97. Witte MH, Bernas MJ, Martin CP, Witte CL. Lymphangiogenesis and lymphangiodysplasia: from molecular to clinical lymphology. *Microsc Res Tech* 2001; 55(2):122-45.
98. Tillw JC, Pepper MS. Hereditary vascular anomalies: new insights into their pathogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24(9):1578-90.
99. 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.
100. 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.
101. Folkman J. Tumor angiogenesis and tissue factor. *Nat Med* 1996; 2(2):167-68.
102. Fisher B, Fisher ER. Role of the lymphatic system in dissemination of tumour. *Lymph* 1966; 324.
103. 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.
104. 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 Expo Pathol* 2007; 88(4):257-70.

105. 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.
106. Karkkainen MJ, Alitalo K. Lymphatic endothelial regulation, lymphoedema, and lymph node metastasis. *Semin Cell Dev Biol* 2002; 13(1):9-18.
107. Han H, Yang Y, Lu Z, He Q, Lin Z. Decreased D2-40 and increased p16INK4A immunoreactivities correlate with higher grade of cervical intraepithelial neoplasia. *Diagn pathol* 2011 Jul 5; 6:59.
108. 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.
109. Urabe A, Matsumoto T, Kimura M, Sonoue H, Kinoshita K. Grading system of the lymphatic invasion according to D2-40 immunostaining is useful for the prediction of nodal. *Histopathology* 2006 Nov; 49(5):493-7.
110. Dumoff KL, Chu C, Xu X, Pasha T, Zhang PJ, Acs G. Low D2-40 immunoreactivity correlates with lymphatic invasion and nodal metastasis in early-stage squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Mod pathol* 2005 Jan; 18(1):97-104.
111. 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.

112. Schoppmann SF, Birner P, Studer P, Breiteneder-Geleff S. Lymphatic microvessel density and lymphovascular invasion assessed by anti-podoplaninimmunostaining in human breast cancer. *Anticancer Res* 2001; 21(4A):2351-5.
113. 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.
114. Schoppmann SF, Birner P, Studer P, Breiteneder-Geleff S. Lymphatic microvessel density and lymphovascular invasion assessed by anti-podoplaninimmunostaining in human breast cancer. *Anticancer Res* 2001; 21(4A):2351-5.
115. Nakamura Y, Yasuoka H, Tsujimoto M, Imabun S, Nakahara M, Nakao K, et al. Lymph vessels density correlates with nodal status, VEGF-C expression, and prognosis in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2005; 91(2):125-32.
116. Van Trappen PO, Gyselman VG, Lowe DG, Ryan A, Oram DH, Bosze P, et al. Molecular quantification and mapping of lymph-node micrometastases in cervical cancer. *The Lancet* 2001; 357:15-20.
117. Hermanek P, Hutter RV, Sobin LH, Wittekind C. International Union Against Cancer: Classification of isolated tumors cells and micrometastasis. *Cancer* 1999; 86:2668-73.

118. Horn LC, Hentschel B, Fischer U, Peter D, Bilek K. Detection of micrometástases in pelvic lymph nodes in patients with carcinoma of the cervix uteri using step sectioning: Frequency, topographic distribution and prognostic impact. *Gynecol Oncol* 2008 Nov; 111(2):276-81.
119. Wang HY, Sun JM, Lu HF, Shi DR, Ou ZL, Ren YL, et al. Micrometastases detected by cytokeratin 19 expression in sentinel lymph nodes of patients with early-stage cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2006; 16:643-648.
120. Hafner N, Gajda M, Altgassen C, Hertel H, Greinke C, Hillemanns P, et al. HPV16-E6 mRNA is superior to Cytokeratin 19 mRNA as a molecular marker for the detection of disseminated tumour cells in sentinel lymph nodes of patients with cervical cancer by quantitative reverse-transcription PCR. *Int. J. Cancer* 2007; 120:1842-1846.
121. Lentz SE, Muderspach LI, Felix JC, Ye W, Groshen S, Amezcuca CA. Identification of micrometastases in histologically negative lymph nodes of early-stage cervical cancer patients. *The American College of Obstetricians and Gynecologists* 2004; 103:1204-10.
122. Reich O, Tamussino K, Hass J, Winter R. Benign mullerian inclusions in pelvic and paraaortic lymph nodes. *Gynecol Oncol* 2000; 78:242-4.
123. Bussab WO, Morettin PA. *Estatística Básica*. 5a. ed. Ed. Saraiva, São Paulo, 2003.
124. Fonseca JS, Martins GA. *Curso de Estatística*. 3a. ed. Ed. Atlas, São Paulo, 1982.

125. Pagano M, Gauvreau K. Princípios de Bioestatística. São Paulo: Pioneira Thomson Learning, 2004
126. Lipsitz SH, Kim K, Zhao L. Analysis of Repeated Categorical Data Using Generalized Estimating Equations. *Statistics in Medicine* 1994;13:1149-63.
127. Chao HT, Wang PH, Tseng JY, Lai CR, Chiang SC, Yuan CC. Lymphocyte-infiltrated FIGO Stage IIB squamous cell carcinoma of the cervix is a prominent factor for disease-free survival. *Eur J Gynaecol Oncol* 1999; 20(2):136-40.
128. Passlick B, Pantel K. Detection and relevance of immunohistochemically identifiable tumor cells in lymph nodes. *Recent Res Cancer Res* 2000; 157:29-37.
129. No authors listed. Prognostic importance of occult axillary lymph node micrometastases from breast cancers. International (Ludwig) Breast Cancer Study Group. *Lancet* 1990 Jun 30;335(8705):1565-8.
130. Cibula D, Abu-Rustum NR, Dusek L, Zikán M, Zaal A, Sevcik L, et al. Prognostic significance of low volume sentinel lymph node disease in early-stage cervical cancer. *Gynecol Oncol*. 2012;124(3):496-501.

**APÊNDICES**

---

**Tabela 6.** Comparação dos estadiamentos (clínico e patológico) no geral.

Estadiamento Clínico	Estadiamento AP		Total
	IB1	IB2	
IB1	74	1	75 (93,8)
IB2	2	3	5 (6,3)
<b>IIA</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>3</b>
Total	76 (95)	4 (5)	80 (100)
<b>p-valor (Teste de McNemar)</b>	1,000		

A categoria em amarelo foi excluída da análise.

De acordo com os resultados da Tabela 6, não há diferença significativa entre os estadiamentos (clínico e patológico) no geral, excluindo o estadiamento IIA. Em ambos os estadiamentos o percentual de IB1 é significativamente maior do que o percentual de IB2.

**Tabela 7.** Comparação dos estadiamentos (clínico e patológico) no geral.

Estadiamento Clínico	Estadiamento AP		Total
	IB1	IB2 ou IIA	
IB1	74	1	75 (90,4)
IB2 ou IIA	5	3	8 (9,6)
Total	79 (95,2)	4 (4,8)	83 (100)
<b>P-valor (Teste de McNemar)</b>	1,000		

De acordo com os resultados da Tabela 7, não há diferença significativa entre os estadiamentos (clínico e patológico) no geral, agrupando os estadiamentos IB2 e IIA. Em ambos os estadiamentos, o percentual de IB1 é significativamente maior do que o percentual de IB2 ou IIA.

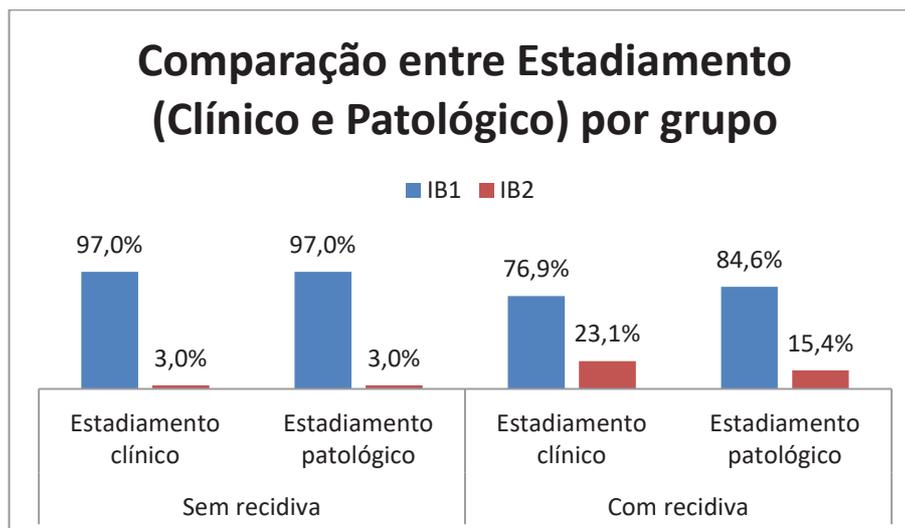
**Tabela 8.** Comparação dos estadiamentos (clínico e patológico) por grupo (Com recidiva tumoral vs Sem recidiva tumoral).

Sem Recidiva			Com Recidiva				
Estadiamento Clínico	Estadiamento AP		Total	Estadiamento Clínico	Estadiamento AP		Total
	IB1	IB2			IB1	IB2	
IB1	65	0	65 (97)	IB1	9	1	10 (76,9)
IB2	0	2	2 (3)	IB2	2	1	3 (23,1)
IIA	1	0	1	IIA	2	0	2
Total	65 (97)	2 (3)	67 (100)	Total	11 (84,6)	2 (15,4)	13 (100)
<b>p-valor</b>	<b>0,007 (Teste de homogeneidade de Odds Ratios de Breslow-Day)</b>						
<b>p-valor</b>	<b>0,001 (Teste de Cochran-Mantel-Haenszel)</b>						

A categoria em amarelo foi excluída da análise.

De acordo com os resultados da Tabela 8, excluindo-se o estadiamento IIA, pelo teste de homogeneidade de Odds Ratio de Breslow-Day ( $p < 0,05$ ), os grupos (com recidiva e sem recidiva) diferem em relação à comparação dos estadiamentos (clínico e patológico). No GSR, os estadiamentos (clínico e patológico) apresentam o mesmo percentual de IB1 (97%) e IB2 (3%). Por outro lado, no GCR, o percentual de pacientes com estadiamento clínico IB2 é maior do que o percentual de pacientes com estadiamento patológico IB2.

Pelo teste de Cochran-Mantel-Haenszel ( $P < 0,05$ ), há diferença significativa entre os estadiamentos (clínico e patológico) por grupo, excluindo-se o estadiamento IIA. No GCR o percentual de pacientes com estadiamento (clínico e patológico) IB2 é significativamente maior do que no GSR.



**Figura 7.** Comparação entre Estadiamento (clínico e patológico) por grupo (Com recidiva tumoral vs Sem recidiva tumoral), excluindo-se a categoria IIA

**Tabela 9.** Comparação dos estadiamentos (clínico e patológico) por grupo (Com recidiva tumoral vs Sem recidiva tumoral).

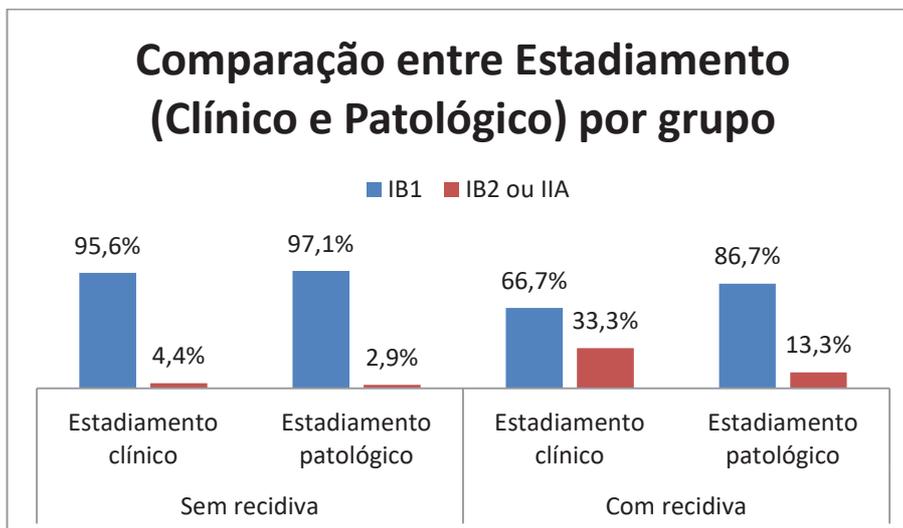
Estadiamento Clínico	Sem Recidiva			Estadiamento Clínico	Com Recidiva		
	Estadiamento AP		Total		Estadiamento AP		Total
	IB1	IB2 ou IIA			IB1	IB2 ou IIA	
IB1	65	0	65 (95,6)	IB1	9	1	10 (66,7)
IB2 ou IIA	1	2	3 (4,4)	IB2 ou IIA	4	1	5 (33,3)
Total	66 (97,1)	2 (2,9)	68 (100)	Total	13 (86,7)	2 (13,3)	15 (100)
p-valor	<b>0,007 (Teste de homogeneidade de Odds Ratios de Breslow-Day)</b>						
p-valor	<b>0,013 (Teste de Cochran-Mantel-Haenszel)</b>						

De acordo com os resultados da Tabela 9, há diferença significativa entre os estadiamentos (clínico e patológico) por grupo, agrupando-se os estadiamentos IB2 e IIA.

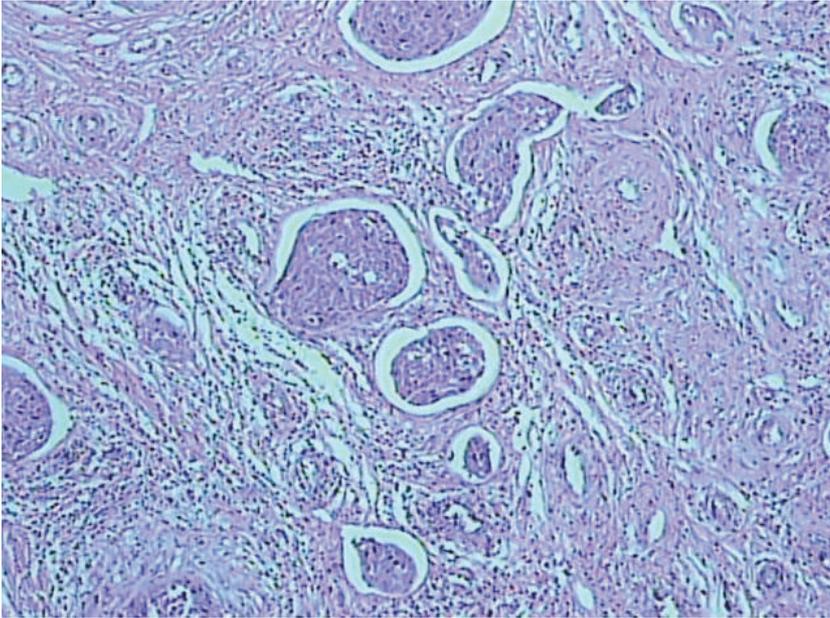
Agrupando-se os estadiamentos IB2 e IIA, pelo teste de homogeneidade de Odds Ratio de Breslow-Day ( $P < 0,05$ ), os grupos (com recidiva e sem recidiva) diferem em relação à comparação dos estadiamentos (clínico e patológico). No grupo sem recidiva, os estadiamentos (clínico e patológico) apresentam praticamente o mesmo percentual de IB1 (próximo de

97%) e IB2 ou IIA (Próximo de 3%). Por outro lado, no grupo com recidiva, o percentual de pacientes com estadiamento clínico IB2 ou IIA é maior do que o percentual de pacientes com estadiamento patológico IB2 ou IIA.

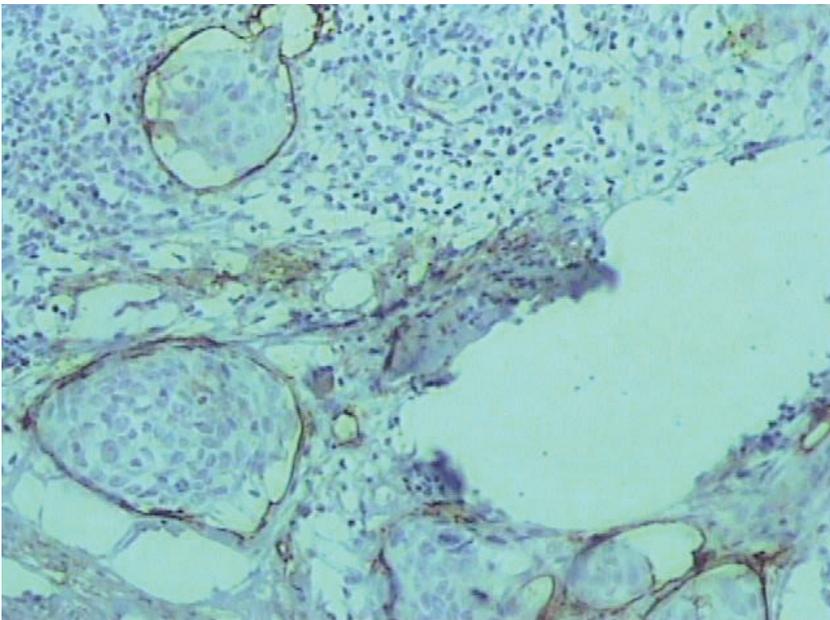
Pelo teste de Cochran-Mantel-Haenszel ( $P < 0,05$ ), há diferença significativa entre os estadiamentos (clínico e patológico) por grupo, agrupando-se os estadiamentos IB2 e IIA. No grupo com recidiva, o percentual de pacientes com estadiamento (clínico e patológico) IB2 ou IIA é significativamente maior do que no grupo sem recidiva.



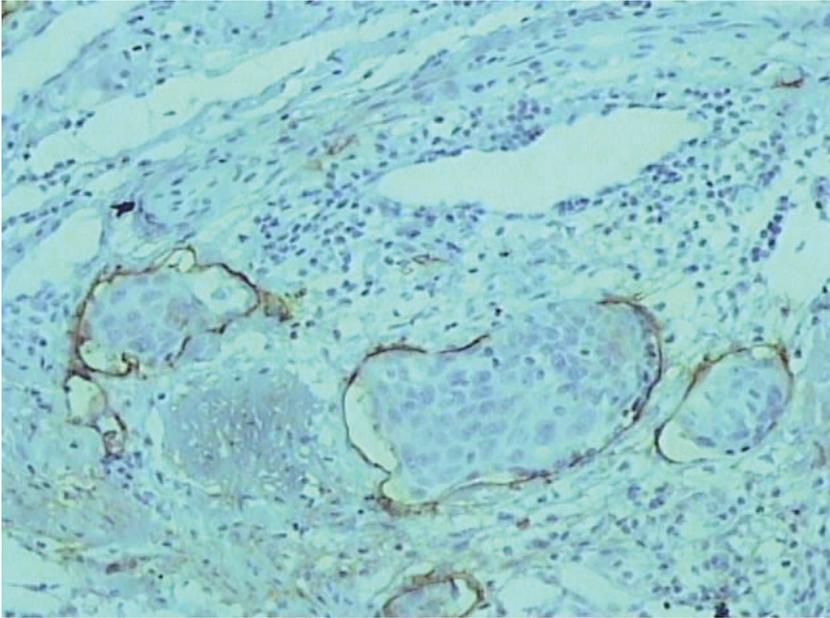
**Figura 8.** Comparação entre Estadiamento (clínico e patológico) por grupo (Com recidiva tumoral vs Sem recidiva tumoral), agrupando-se os estadiamentos IB2 e IIA.



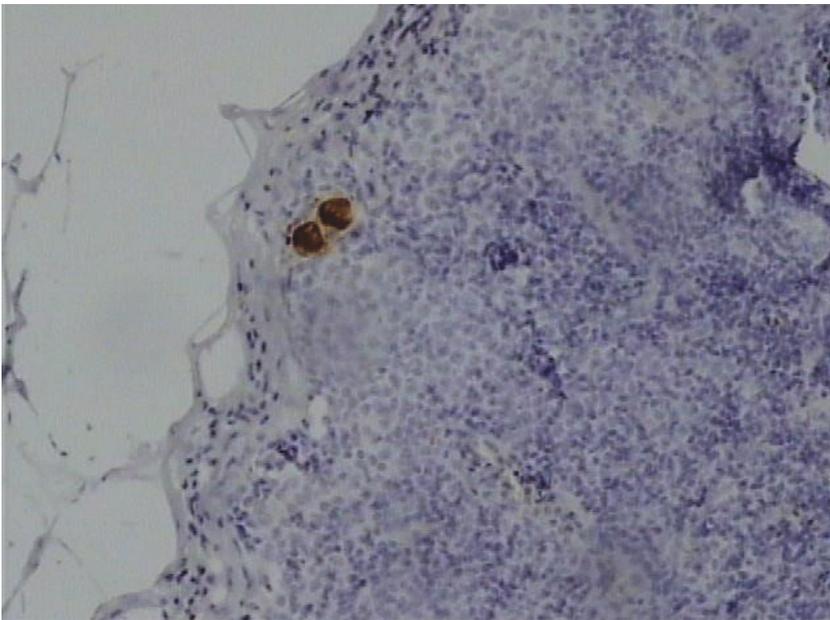
**Figura 9.** Fotomicrografia de invasão angiolinfática em espécime de câncer de colo do útero. Avaliação pela técnica de hematoxilina-eosina, magnificação original = 100 vezes.



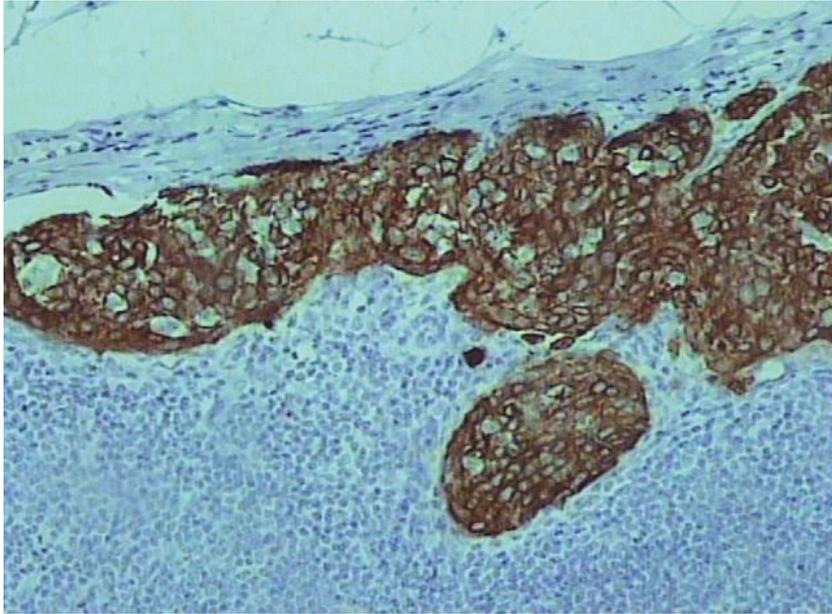
**Figura 10.** Fotomicrografia de invasão angiolinfática em espécime de câncer de colo do útero. Avaliação pela técnica de imuno-histoquímica (D2-40), magnificação original = 400 vezes.



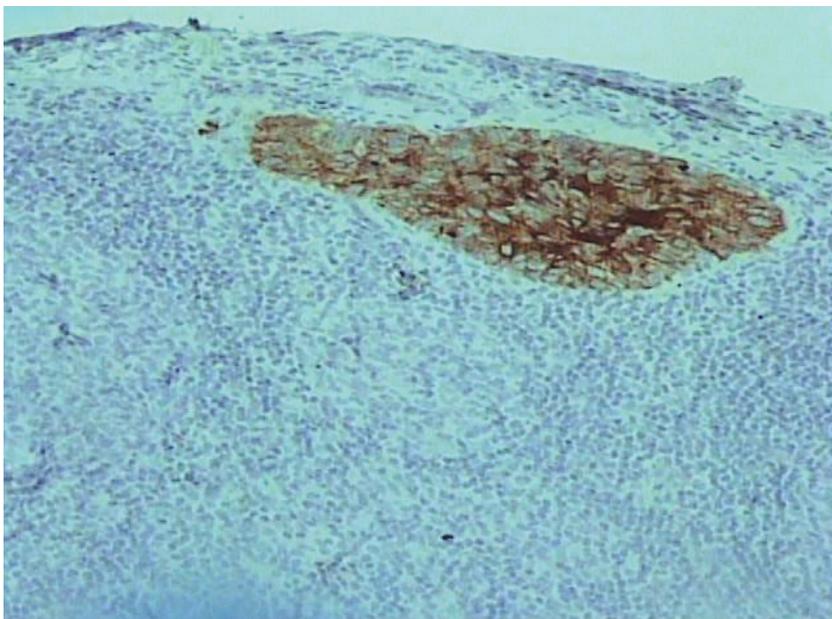
**Figura 11.** Fotomicrografia de invasão angiolinfática em espécime de câncer de colo do útero. Avaliação pela técnica de imuno-histoquímica (D2-40), magnificação original = 400 vezes.



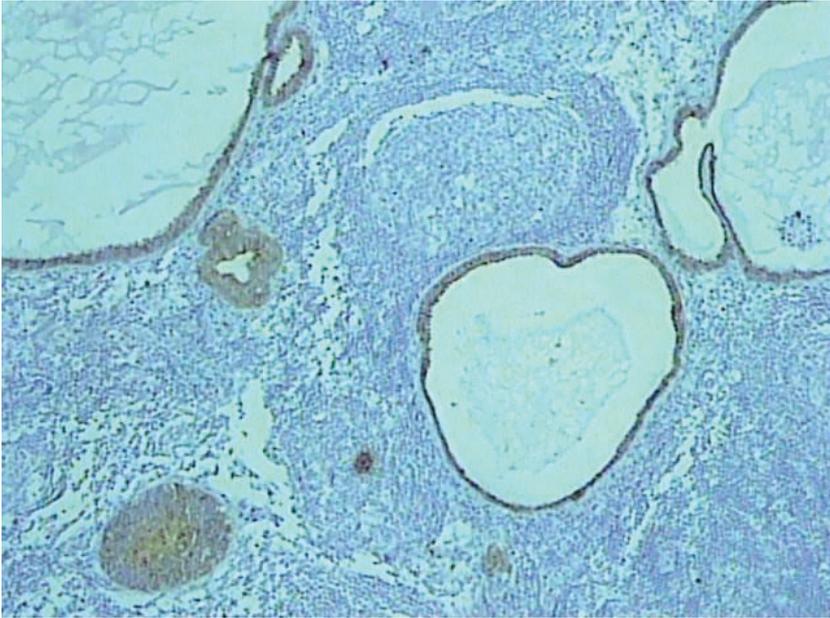
**Figura 12.** Fotomicrografia de células tumorais isoladas no linfonodo da pelve, em espécime de câncer de colo do útero. Avaliação pela técnica de imuno-histoquímica (AE1/AE3), magnificação original = 100 vezes.



**Figura 13.** Fotomicrografia de micrometástase de 2 mm no linfonodo da pelve, em espécime de câncer de colo do útero. Avaliação pela técnica de imuno-histoquímica (AE1/AE3), magnificação original = 400 vezes.



**Figura 14.** Fotomicrografia de micrometástase de 0,4 mm no linfonodo da pelve, em espécime de câncer de colo do útero. Avaliação pela técnica de imuno-histoquímica (AE1/AE3), magnificação original = 400 vezes.



**Figura 15.** Fotomicrografia de inclusão epitelial benigna no linfonodo da pelve, em espécime de câncer de colo do útero. Avaliação pela técnica de imunohistoquímica (AE1/AE3), magnificação original = 400 vezes.



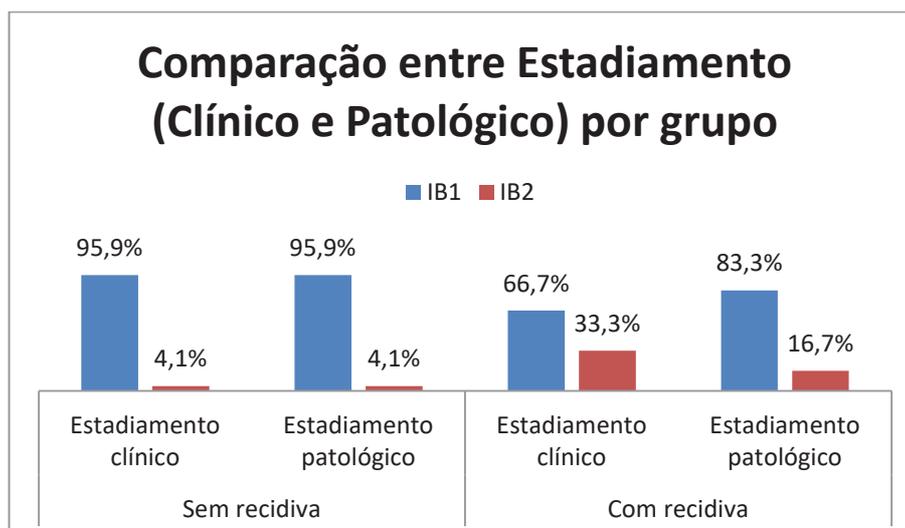
**Figura 16.** Fotomicrografia de inclusão epitelial benigna no linfonodo da pelve, em espécime de câncer de colo do útero. Avaliação pela técnica de imunohistoquímica (AE1/AE3), magnificação original = 400 vezes.

**Tabela 10.** Comparação dos estadiamentos (clínico e patológico) por grupo (Com micrometástase linfonodal vs Sem micrometástase linfonodal).

Sem micrometástase linfonodal				Com micrometástase linfonodal			
Estadiamento Clínico	Estadiamento AP		Total	Estadiamento Clínico	Estadiamento AP		Total
	IB1	IB2			IB1	IB2	
IB1	70	1	71 (95,9)	IB1	4	0	4 (66,7)
IB2	1	2	3 (4,1)	IB2	1	1	2 (33,3)
<b>IIA</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>IIA</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
Total	71 (95,9)	3 (4,1)	74 (100)	Total	5 (83,3)	1 (16,7)	6 (100)
<b>p-valor</b>	0,811 (Teste de homogeneidade de Odds Ratios de Breslow-Day)						
<b>p-valor</b>	<b>&lt; 0,001 (Teste de Cochran-Mantel-Haenszel)</b>						

De acordo com os resultados da Tabela 10, excluindo-se o estadiamento IIA, pelo teste de homogeneidade de Odds Ratio de Breslow-Day ( $P > 0,05$ ), os grupos (com MI linfonodal e sem MI linfonodal) não diferem em relação à comparação dos estadiamentos (clínico e patológico).

Porém, pelo teste de Cochran-Mantel-Haenszel ( $p < 0,05$ ), há diferença significativa entre os estadiamentos (clínico e patológico) por grupo, excluindo-se o estadiamento IIA. No grupo com MI linfonodal, o percentual de pacientes com estadiamento (clínico e patológico) IB2 é significativamente maior do que no grupo sem MI linfonodal.



**Figura 17.** Comparação entre Estadiamento (clínico e patológico) por grupo (Com micrometástase linfonodal vs Sem micrometástase linfonodal), excluindo-se a categoria IIA.

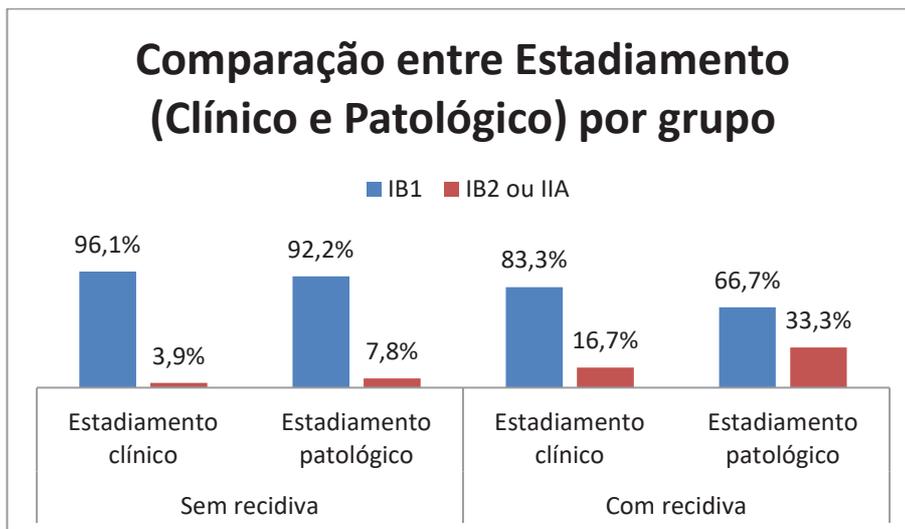
**Tabela 11.** Comparação dos estadiamentos (clínico e patológico) por grupo (Com micrometástase linfonodal vs Sem micrometástase linfonodal).

Sem micrometástase linfonodal				Com micrometástase linfonodal			
Estadiamento Clínico	Estadiamento AP		Total	Estadiamento Clínico	Estadiamento AP		Total
	IB1	IB2			IB1	IB2	
IB1	70	4	74 (96,1)	IB1	4	1	5 (83,3)
IB2 ou IIA	1	2	3 (3,9)	IB2 ou IIA	0	1	1 (16,7)
Total	71 (92,2)	6 (7,8)	77 (100)	Total	4 (66,7)	2 (33,3)	6 (100)
<b>p-valor</b>	0,710 (Teste de homogeneidade de Odds Ratios de Breslow-Day)						
<b>p-valor</b>	<b>0,003 (Teste de Cochran-Mantel-Haenszel)</b>						

De acordo com os resultados da Tabela 11, há diferença significativa entre os estadiamentos (clínico e patológico) por grupo, agrupando-se os estadiamentos IB2 e IIA.

Agrupando-se os estadiamentos IB2 e IIA, pelo teste de homogeneidade de Odds Ratio de Breslow-Day ( $P > 0,05$ ), os grupos (com MI linfonodal e sem MI linfonodal) não diferem em relação à comparação dos estadiamentos (clínico e patológico).

Porém, pelo teste de Cochran-Mantel-Haenszel ( $P < 0,05$ ), há diferença significativa entre os estadiamentos (clínico e patológico) por grupo, agrupando-se os estadiamentos IB2 e IIA. No grupo com MI linfonodal, o percentual de pacientes com estadiamento (clínico e patológico) IB2 ou IIA é significativamente maior do que no grupo sem MI linfonodal.



**Figura 18.** Comparação entre Estadiamento (clínico e patológico) por grupo (Com micrometástase linfonodal vs Sem micrometástase linfonodal), agrupando-se os estadiamentos IB2 e IIA.

**ANEXOS**

---

**Anexo 1** Quadro 1: Classificação histológica dos tumores epiteliais de colo do útero.

Lesões Escamosas	Lesões intraepiteliais (NIC)
	Carcinoma epidermoide
	Verrucoso
	Condilomatoso
	Papilífero
	Tipo linfoepitelioma
Lesões Glandulares	Adenocarcinoma <i>in situ</i>
	Adenocarcinoma
	Mucinoso tipo endocervical
	Mucinoso tipo intestinal
	Endometrióide
	Células claras
	Seroso
	Mesonéfrico
Outros Tumores Epiteliais	Carcinoma adenoescamoso
	De células vítreas
	Adenocístico
	Basoadenoide
	De células pequenas
	Indiferenciado

**Anexo 2** Estadiamento do câncer de colo do útero (Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia - 2009)

**Estádio 0** *Carcinoma in situ.*

**Estádio I** *O carcinoma é estritamente confinado ao colo do útero (a extensão ao corpo deve ser descartada).*

IA – O câncer invasor é identificado somente microscopicamente. Todas as lesões macroscópicas, ainda que com invasão superficial, são do estágio IB.

IA1 – A invasão do estroma em profundidade não excede 3 mm e não é maior que 7 mm de extensão.

IA2 – A invasão do estroma mede entre 3 a 5 mm de profundidade e não excede os 7 mm de extensão.

IB – Lesões clínicas limitadas ao colo do útero ou lesões pré-clínicas maiores que o estágio clínico IA.

IB1 – Lesões clínicas até 4 cm de tamanho.

IB2 – Lesões clínicas maiores que 4 cm de tamanho.

**Estádio II** *Carcinoma estende-se além do colo do útero, mas não atinge a parede pélvica. O carcinoma pode comprometer a vagina, mas não até o seu terço inferior.*

IIA – Envolvimento não evidente do paramétrio. Não invade o terço inferior da vagina.

IIA1 – Lesões clínicas até 4 cm de tamanho.

IIA2 – Lesões clínicas maiores do que 4 cm de tamanho.

IIB – Envolvimento do paramétrio evidente, porém não atingindo a parede pélvica.

**Estádio III** *Carcinoma estende-se até parede pélvica. Ao toque retal, não há espaço livre entre o tumor e a parede pélvica. O tumor pode comprometer o terço inferior da vagina. Todos os carcinomas com hidronefrose ou exclusão renal se incluem nesse estágio.*

IIIA – Não há extensão até parede pélvica, porém envolve o terço inferior da vagina.

IIIB – Extensão até parede pélvica e/ou hidronefrose ou exclusão renal.

Obs.: Deve ser considerado IIIB se o paramétrio for nodular/tumoral até a parede pélvica ou se houver extensão direta tumoral.

**Estádio IV** *O carcinoma estende-se além da pelve menor (verdadeira) ou clinicamente, inclui a mucosa da bexiga ou reto. O edema bolhoso (túnica mucosa da bexiga (vesical)) não permite classificar o caso como estágio IV.*

IVA – O tumor estende-se aos órgãos adjacentes (bexiga ou reto).

IVB – Metástases à distância (inclui linfonodos inguinais e periaórticos).

**Fonte:** modificado de Pecorelli (2010)

**Anexo 3** Quadro 2: Classificação de Piver e Rutledge para hysterectomias (1974).

Classe I	Remoção do tecido cervical, sem dissecação do ureter. Também chamada de Histerectomia extrafacial.
Classe II	Radicalidade moderada. Remove-se o tecido paracervical medialmente ao ureter, sem desvascularizar o seu 1/3 distal, mantendo-o preso ao ligamento pubocervical. Artéria uterina é ligada medialmente ao ureter. Os ligamentos uterossacrais são ligados no ponto médio entre sua inserção na parede pélvica e o útero. Remove-se o 1/3 superior da vagina.
Classe III	Remove-se todo o paramétrio e tecido paracervical. Artéria uterina é ligada na sua origem junto à artéria iliaca interna (hipogátrica). Ureter é dissecado até o ligamento pubovesical (entrada na bexiga). Remove-se a 1/2 superior da vagina. Cirurgia de Wertheim-Meigs.
Classe IV	Completa ressecção de todo o tecido Periureteral e Pericervical. Ureter é liberado totalmente do ligamento pubocervical. Artéria vesical superior é ligada. Remove-se ¾ da vagina (em desuso).
Classe V	Classe IV acrescido de ressecção do 1/3 distal do ureter e/ou bexiga com posterior reimplante ureteral (em desuso).

**Anexo 4** Quadro 3: Classificação de Querleu e Morrow para histerectomias e linfadenectomias (2007).

Histerectomias	Classe A	Paracérvice é seccionado medialmente ao ureter, mas lateralmente ao colo (ponto médio). Histerectomia extrafacial, na qual a posição do ureter é determinada pela palpação ou pela dissecação no paramétrio, mas sem soltá-lo de seu leito. Os pilares vesical e retal são seccionados junto ao útero. Objetivo: garantir ressecção completa do colo.
	Classe B	Ureter é dissecado e lateralizado, permitindo a retirada de todo o tecido paracervical medial ao túnel ureteral. O componente neural do paracérvice não é seccionado. Os pilares vesical e retal são seccionados à distância do útero. B1: descrito acima. B2: dissecação linfonodal lateral paracervical adicional.
	Classe C	Ureter é totalmente mobilizado. Ressecção do pilar vesical junto à bexiga e o pilar retal junto ao reto. C1: ressecção dos componentes medial e lateral do pilar vesical, cranial e caudal dos componentes do paracérvice e o pilar retal com técnica de preservação neural (“nerve sparing”). C2: sem preservação autonômica
	Classe D	Associado a procedimentos exenterativos. D1: remoção do sistema vascular parietal. D2: remoção da fáscia ou musculatura da parede pélvica
Linfadenectomias	Nível 1	Linfadenectomia ilíaco-obturatória (até a bifurcação ilíaca externa e hipogástrica)
	Nível 2	Nível 1, incluindo linfadenectomia de ilíaca comum e pré-sacral
	Nível 3	Nível 2, incluindo linfadenectomia retroperitoneal abaixo da artéria mesentérica inferior
	Nível 4	Nível 3, incluindo linfadenectomia retroperitoneal infrarrenal

## **Anexo 5** Grau de recomendação e força de evidência

**Nível de evidência A:** Estudos experimentais ou observacionais de melhor consistência (metanálise ou ensaios clínicos randomizados).

**Nível de evidência B:** Estudo experimentais ou observacionais de menos consistência (outros ensaios clínicos não randomizados ou estudos observacionais ou estudo caso-controle).

**Nível de evidência C:** Relatos ou séries de casos (estudos não controlados).

**Nível de evidência D:** Opinião desprovida de avaliação crítica, baseada em consensos, estudos fisiológicos ou modelos animais.

**Fonte:** Revista FEMINA

**Anexo 6** Quadro 4: Critérios histopatológicos de risco para indicação de tratamento adjuvante radioquimioterápico.

Critérios histopatológicos	Diâmetro do tumor	Invasão angiolinfática	Invasão estromal
Baixo Risco	< 4 cm	Não	< 1/3
	< 5 cm	Sim	< 1/3
	< 2 cm	Sim	< 2/3
Risco Intermediário	> 4 cm	Não	> 1/3
	Qualquer	Sim	> 2/3
	> 2 cm	Sim	1/3 a 2/3
	< 5 cm	Sim	> 1/3
Alto Risco	Linfonodos da pelve (pélvicos) positivos (pós-cirurgia ou não) Margens cirúrgicas positivas (vaginal ou pericervical) Paramétrios comprometidos		

**Anexo 7** Quadro 5: Taxas de sobrevida em cinco anos para câncer do colo do útero pelo estadiamento da FIGO.

Estádio	Número de pacientes	Sobrevida em 5 anos (%)
I	12.143	81,6
II	10.285	61,3
III	8.206	36,7
IV	1.378	12,1

**Anexo 8** Quadro 6: Porcentagem de metástase linfonodal pélvica e para-aórtica pelo estadiamento clínico.

Estádio Clínico		Linfonodos da Pelve (%)	Linfonodos Para-aórticos (%)
I	IA1	0 a 1	6,3
	IA2	3 a 8	
	IB1	15 a 20	
	IB2	25 a 30	
II		28,6	16,5
III		47	30
IV		55	40

**Anexo 9** Quadro 7: Critérios estabelecidos pela União Internacional Contra o Câncer, para o diagnóstico diferencial entre micrometástases e células tumorais isoladas.

CRITÉRIO	CÉLULAS TUMORAIS ISOLADAS	MICROMETÁSTASES
Tamanho	Células isoladas ou pequenos agrupamentos	Menor ou igual a 2 mm (maior diâmetro)
Contato com a parede de vasos ou seios linfáticos	Não	Sim
Extravasamento (Invasão e penetração de vasos ou seios linfáticos)	Não	Sim
Reação estromal (Extravascular ou extrassinusoidal)	Não	Sim
Proliferação	Não	Sim

Anexo 10 Folha de rosto para pesquisa envolvendo seres humanos.



MINISTÉRIO DA SAÚDE - Conselho Nacional de Saúde - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

1. Projeto de Pesquisa: MICROMETÁSTASE LINFONODAL EM CÂNCER DO CUIO UTERINO EM ESTÁDIOS INICIAIS		2. CAAE:	
3. Área do Conhecimento: Ciência Área 4 - Ciências da Saúde			
<b>PESQUISADOR RESPONSÁVEL</b>			
4. Nome: Leandro Freitas Coimbra			
5. CPF: 215.681.808-67	5. Endereço (Rua, nº): JOSE PICERNI JARDIM PANDRAMA 46 S/AO, 1036-110 RIO PRETO SÃO PAULO 15091200		
7. Nacionalidade: BRASILEIRA	8. Telefone: (17) 3227-7632	9. Outro Telefone:	10. E-mail: leandrocoimbra@gmail.com
11. Cargo:			
<p>Termo de Compromisso: Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 195/96 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para as fins previstos no protocolo e a publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não. Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima. Tenho ciência que esta folha será anexada ao projeto devidamente assinada por todos os responsáveis e fará parte integrante da documentação do mesmo.</p>			
Data: <u>03</u> / <u>04</u> / <u>12</u>		Assinatura: <u>Leandro F. Coimbra</u>	
<b>INSTITUIÇÃO PROPONENTE</b>			
12. Nome: Centro de Referência de Saúde da Mulher	13. CNPJ: 46.574.503/0129-81	14. Unidade/Orgão:	
15. Telefone: (11) 3248-3067	16. Outro Telefone:		
<p>Termo de Compromisso (do responsável pela instituição): Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 195/96 e suas complementares e como esta instituição tem condições para o desenvolvimento deste projeto, autorizo sua execução.</p>			
Responsável: <u>Prof. Dr. Luiz Henrique Gebrim</u>		CPF: <u>041.226.858 - 26</u>	
Cargo/Função: <u>Director Técnico de Departamento de Saúde</u>			
Data: <u>03</u> / <u>04</u> / <u>12</u>		Prof. Dr. Luiz Henrique Gebrim Director Técnico de Departamento de Saúde RG 8.401.375 C.R.S.M. Assinatura: <u>[Assinatura]</u>	
<b>PATROCINADOR PRINCIPAL</b>			
17. Nome: /9 Centro de Referência de Saúde da Mulher	18. Telefone: (11) 3248-3067	19. Outro Telefone:	
<p>Termo de Compromisso: Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 195/96 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e a publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não. Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima.</p>			
Nome: <u>Prof. Dr. Luiz Henrique Gebrim</u>		CPF: <u>041.226.858 - 26</u>	
Cargo/Função: <u>Dir. Tec. Departamento Saúde</u>		E-mail: <u>CRSM - DIRETORIA @ SAUDE.SP.GOV.BR</u>	
Data: <u>03</u> / <u>04</u> / <u>12</u>		Assinatura: <u>[Assinatura]</u> Prof. Dr. Luiz Henrique Gebrim Director Técnico de Departamento de Saúde RG 8.401.375 C.R.S.M.	

## Anexo 11 Protocolo do Comitê de Ética em Pesquisa do CRSM.

Plataforma Brasil - Ministério da Saúde

Centro de Referência da Saúde da Mulher - CRSM

### PROJETO DE PESQUISA

**Título:** MICROMETÁSTASE LINFONODAL EM CÂNCER DO COLO UTERINO EM ESTÁDIOS INICIAIS

**Pesquisador:** Leandro Freitas Colturato

**Versão:** 1

**Instituição:** Centro de Referência da Saúde da Mulher

**CAAE:** 02128012.1.0000.0089

### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

**Número do Parecer:** 16327

**Data da Relatoria:** 25/04/2012

#### **Apresentação do Projeto:**

Trata-se de estudo retrospectivo, de enfermas atendidas no Hospital Pérola Byington com diagnóstico de câncer do colo uterino em estádios iniciais, IB1 e IIA. Serão incluídas mulheres com diagnóstico de câncer do colo uterino, de 2000 a 2009, tipo histológico epidermóide e adenocarcinoma, estágio clínico IB1, IB2 e IIA, submetidas ao tratamento cirúrgico radical com histerectomia total, parametrectomia, exérese de terço superior de

vagina e linfadenectomia pélvica. São critérios de exclusão pacientes submetidas à radioterapia como tratamento primário ou adjuvante, ausência de segmento clínico por período mínimo de 36 meses e neoplasias múltiplas. Os dados clínicos e laboratoriais serão obtidos pelo prontuário das enfermas. Após a seleção de lâminas pelo laudo histopatológico das peças, serão solicitadas as lâminas e blocos de parafina dos linfonodos pélvicos. As lâminas serão processadas e serão solicitadas novas lâminas para o estudo imunohistoquímico com objetivo da identificação de micrometástase linfonodal.

**Critério de Inclusão:**

Mulheres com diagnóstico de câncer do colo uterino, de 2000 a 2009, tipo histológico epidermóide e adenocarcinoma, estágio clínico IB1, IB2 e IIA, submetidas ao tratamento cirúrgico radical com histerectomia total, parametrectomia, exérese de terço superior de vagina e linfadenectomia pélvica.

**Critério de Exclusão:**

Pacientes submetidas à radioterapia como tratamento primário ou adjuvante, ausência de segmento clínico por período mínimo de 36 meses e neoplasias múltiplas.

#### **Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo Primário:**

Avaliar a incidência de micrometástase linfonodal pélvica no câncer do colo uterino em estádios iniciais, IB1 - IIA, e sua eventual correlação com recidiva tumoral e sobrevida.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:**

Não há.

**Benefícios:**

Aprimorar conhecimento sobre micrometástase em câncer de colo uterino e sua repercussão na recidiva e sobrevida.

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Analisando o estudo apresentado, encontra-se de acordo com a resolução 196/96.

#### **Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Estão de acordo com as recomendações.

#### **Recomendações:**

Não há recomendações.

#### **Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Aprovado

#### **Situação do Parecer:**

Aprovado

#### **Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Anexo 12** Protocolo da técnica de IHQ para o anticorpo anti-pan – citoqueratina AE1/AE3 e marcador endotelial linfático D2-40.

Os blocos selecionados de linfonodos são condicionados no freezer, à temperatura de 18°C, por uma hora. Depois, cada bloco é seriadamente seccionado à espessura de três micrômetros, usando o micrótomo LUPE MRP-03. Após banho-maria, cada corte é confeccionado em lâmina polarizada.

A desparafinização foi realizada com banho em estufa a 60°C por três horas.

As lâminas são banhadas em solução de xilol aquecido a 95°C, durante três períodos de cinco minutos, depois em metanol absoluto, durante quatro períodos (10 imersões rápidas e consecutivas em cada período) e, por fim, lavagem em água corrente e três banhos de cinco minutos em água destilada.

São introduzidas em panela de pressão com solução de citrato, permanecendo por quatro minutos após o início do processo de pressão. Após, deixa-se em repouso à temperatura ambiente por 20 minutos.

A seguir, lavam-se as lâminas em água corrente, realizando três banhos de cinco minutos em água destilada.

São colocadas em cuba de ranhaduras verticais (borel), preenchidas por peróxido de hidrogênio a 10 volumes, deixadas em câmara úmida e escura por período de cinco minutos, seguido de 10 lavagens consecutivas com água corrente, três banhos de cinco minutos com água destilada e três banhos de cinco minutos em solução Tampão PBS (Phosphate Buffer Sulfate – PBS 1X).

Retira-se o excesso da solução Tampão PBS e pinga-se o bloqueador de fundo, deixando as lâminas em câmara úmida e escura por 30 minutos.

Em seguida, são incubadas durante 16 horas em câmara úmida e escura, a 6°C, com o anticorpo primário AE1/AE3 (Marca Dako – Clone AE1/AE3), diluído na proporção de 1:2000. Então, a câmara úmida e escura é aberta, permanecendo à temperatura ambiente por 20 minutos.

As lâminas são recolocadas no borel e lavadas três vezes em solução de Tampão PBS, cinco minutos cada. O polímero é colocado nas lâminas, permanecendo por 30 minutos na câmara úmida e escura. Novamente, três lavagens em solução de tampão PBS são realizadas, cinco minutos cada.

A imunomarcação foi realizada por incubação das lâminas em solução de diaminobenzidina, contendo 50 microlitros de cromógeno por 1.000 microlitros de substrato tampão, por cinco minutos.

Após a revelação do cromógeno, as lâminas são lavadas em água corrente e contracoradas com hematoxilina por um minuto. São novamente lavadas em água corrente, álcool absoluto, álcool/xilol e xilol.

Por fim, são cobertas com lamínulas e montadas pelo meio *Entellan'* e identificadas. Todos os cortes foram corados usando o mesmo lote de anticorpo, sob as mesmas condições.

Nos casos de recidiva tumoral e/ou MI linfonodal, a IHQ foi realizada também nos blocos do tumor original no colo do útero, usando como anticorpo primário o marcador endotelial linfático D2-40 (Marca Dako – Clone D2-40), na proporção de 1:200. O mesmo procedimento foi realizado em todos os casos de tumor de colo do útero sem MI linfonodal, mas que apresentaram recidiva da doença durante o seguimento clínico.

**Anexo 13** Quadro 8: Critérios utilizados para diferenciação entre inclusões epiteliais e metástases nos linfonodos da pelve.

CRITÉRIO	INCLUSÃO EPITELIAL BENIGNA	METÁSTASE
Aparência microscópica	Microcística	Glandulopapilífera
Epitélio	Cuboidal ou colunar	Estratificado ou pseudopapilífero
Células ciliadas	Sim	Não
Atividade mitótica	Não	Sim
Membrana basal	Distinta	Difusa
Células atípicas	Não	Sim
Corpos psamomatosos	Comum	Incomum
Reação estromal	Não	Sim

**Anexo 14** Quadro 9: Variáveis utilizadas para avaliar a associação com a micrometástase linfonodal e com a recorrência da doença.

TIPO DE VARIÁVEIS	DESCRIÇÃO
Sociodemográficas	Idade; Tabagismo;
Reprodutivas	Gestações; Paridade;
Histopatológicas	Diâmetro do tumor (menor que 2 cm, maior que 2 cm e menor que 4 cm, maior que 4 cm); Terço de comprometimento estromal (menor que 1/3, entre 1/3 e 2/3, e maior que 2/3); Tipo histológico (adenocarcinoma, epidermoide e adenoescamoso); Grau histológico (1, 2, 3); Presença ou ausência de NIC III; Presença ou ausência de invasão angiolinfática pela técnica de HE; Presença ou ausência de invasão angiolinfática pela técnica de imuno-histoquímica D2-40; Estadiamento clínico e patológico.