

**Diocésio Alves Pinto de Andrade**

**REVISÃO ANATOMO-PATOLÓGICA E MOLECULAR DO CÂNCER DE ENDOMÉTRIO DE RISCO  
BAIXO E INTERMEDIÁRIO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação da Fundação Pio XII - Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Ricardo dos Reis

Coorientador: Prof. Dr. Rui Manuel Vieira Reis

Barretos, SP

2021

**Diocésio Alves Pinto de Andrade**

**REVISÃO ANATOMO-PATOLÓGICA E MOLECULAR DO CÂNCER DE ENDOMÉTRIO DE RISCO  
BAIXO E INTERMEDIÁRIO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação da Fundação Pio XII - Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Ricardo dos Reis

Coorientador: Prof. Dr. Rui Manuel Vieira Reis

Barretos, SP

2021

A553r Andrade, Diocésio Alves Pinto de.

Revisão anátomo-patológica e molecular do câncer de endométrio de risco baixo e intermediário. / Diocésio Alves Pinto de Andrade. - Barretos, SP 2021. 159 f. : il.

Orientador: Ricardo dos Reis  
Coorientador: Rui Manuel Vieira Reis

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos, 2021.

1. Neoplasias do endométrio. 2. Carcinoma endometriode. 3. Revisão anátomo-patológica especializada. 4. Classificação Molecular. 5. Perfilação da expressão gênica. 6. Escore de Risco de Recorrência.  
I. Autor. II. Título.

CDD 571.638

### **FICHA CATALOGRÁFICA**

Preparada por Martins Fideles dos Santos Neto CRB 8/9570  
Biblioteca da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos

## FOLHA DE APROVAÇÃO



HOSPITAL de  
CÂNCER de  
BARRETOS

INSTITUTO DE ENSINO & PESQUISA

Rua Antenor Duarte Villela, 1331  
Bairro Dr. Paulo Prata  
Barretos (SP), Brasil  
CEP: 14.784-400  
Telefone: +55 (17) 3321-6600

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Diocésio Alves Pinto de Andrade**

***“RECLASSIFICAÇÃO ANÁTOMO-PATOLÓGICA E MOLECULAR DO CÂNCER DE ENDOMÉTRIO DE RISCO BAIXO E INTERMEDIÁRIO”***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação PIO XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde - Área de Concentração: Oncologia

Data da aprovação: 04/08/2021

Banca Examinadora:

**Profª. Dra. Angélica Nogueira Rodrigues**

Instituição: UFMG - Faculdade de Medicina

**Profª. Dra. Louise de Brot Andrade**

Instituição: A.C. Camargo Cancer Center

**Prof. Dr. Jesus Paula Carvalho**

Instituição: Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP-HC-FMUSP)

**Prof. Dr. Rui Manuel Vieira Reis**

Coorientador

**Prof. Dr. Ricardo dos Reis**

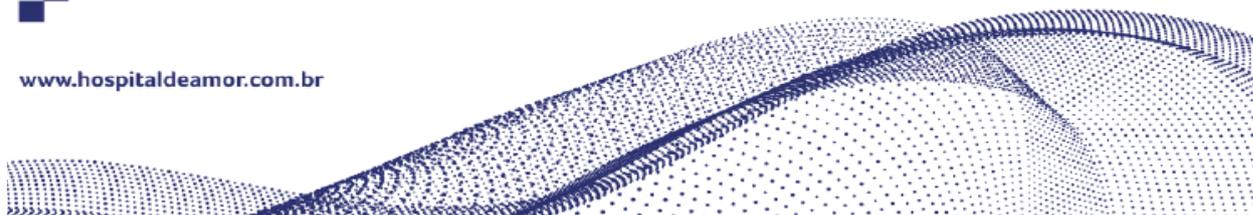
Orientador

**Profª. Dra. Adriane Feijó Evangelista**

Presidente da Banca



[www.hospitaldeamor.com.br](http://www.hospitaldeamor.com.br)



“Esta tese de doutorado foi elaborada e está apresentada de acordo com as normas da Pós-Graduação do Hospital de Câncer de Barretos – Fundação Pio XII, baseando-se no Regimento do Programa de Pós-Graduação em Oncologia e no Manual de Apresentação de Dissertações e Teses do Hospital de Câncer de Barretos. Os pesquisadores declaram ainda que este trabalho foi realizado em concordância com o Código de Boas Práticas Científicas (FAPESP), não havendo nada em seu conteúdo que possa ser considerado como plágio, fabricação ou falsificação de dados. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos.”

“Embora o Núcleo de Apoio ao Pesquisador do Hospital de Câncer de Barretos tenha realizado as análises estatísticas e orientado sua interpretação, a descrição da metodologia estatística, a apresentação dos resultados e suas conclusões são de inteira responsabilidade dos pesquisadores.”

“Os pesquisadores declaram não ter qualquer conflito de interesse relacionado a este estudo.”

## **Dedico este trabalho aos meus familiares,**

À minha amada esposa **Cristiane**, que está ao meu lado desde o início da trajetória de residente em Barretos. Obrigado por ser essa mulher doce, compreensiva, e que nos piores momentos sempre teve uma palavra de incentivo para que não desistisse. AMO você.

Às duas joias raras que minha esposa nos presenteou: **Letícia** e **Clarissa**. Obrigado por entender cada manhã de sábado que não pude estar com vocês, seja para brincar ou ir até a pracinha andar de bicicleta. A vida é feita de sacrifícios, que bom que entenderam este sacrifício profissional que escolhi seguir.

Aos meus pais **Olney** e **Mírian**, exemplos de honestidade e perseverança. Não há como externar minha gratidão por terem me formado em todas as etapas da vida. Lembro que desde pequeno nos ensinaram que a maior herança que um pai pode deixar a seus filhos é o ESTUDO. Realmente vocês tinham toda razão.

Ao meu irmão **Diego**, que apesar de sempre estarmos longe, foi um amigo que sempre pude recorrer.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador **Prof. Dr. Ricardo dos Reis**, sinônimo de lealdade e entrega aos seus pacientes. Foi figura fundamental ao abrir as portas da pós-graduação do Hospital do Câncer de Barretos para que pudesse desenvolver este trabalho. Mais do que orientador, um grande amigo e mestre. MEU MUITO OBRIGADO.

Ao meu coorientador **Prof. Dr. Rui Manuel Reis**, por acreditar e dedicar grande parte do seu tempo escasso, visto todas suas atribuições na instituição, e possibilitar com a estrutura do CPOM (Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular), o desenvolvimento do projeto.

Aos **Dr. Vinicius Duval da Silva e Dra. Graziela de Macedo Matsushita**, patologistas de extrema competência que foram fundamentais para que as revisões das lâminas e reações de imuno-histoquímica acontecessem.

Ao **Prof. Jesus Paula Carvalho e Profa. Adriane Feijó Evangelista**, pelas enormes contribuições nas bancas de acompanhamento fundamentais no refinamento do projeto.

Ao **Dr. Aurélio Julião de Castro Monteiro**, que me abriu as portas profissionais em 2012. Não tenho como agradecer toda a confiança depositada em um simples ex-residente de oncologia do Hospital do Câncer de Barretos. Tudo que consegui nestes anos foi graças ao senhor por acreditar em mim. Aprendi o quanto devemos ser dedicados aos pacientes (já era, porém o exemplo do senhor me aguçou mais esta responsabilidade) e algo que nunca tive a oportunidade antes, o de gerenciar um serviço de oncologia. MEU MUITO OBRIGADO.

À **Carla Libralli**, uma amiga e companheira de trabalho que tive a honra de conviver desde que cheguei em Ribeirão Preto. O mundo estaria muito melhor se existissem mais pessoas como você, honesta, humilde e de uma competência profissional como poucas. Tenho orgulho de poder trabalhar ao seu lado.

À família da minha esposa Cristiane, **na figura da sua mãe Maria Cristina e dos seus irmãos Camila e Edinho**, por me acolherem desde 03/2008 quando nos conhecemos e ser sempre um ponto de apoio longe da minha casa em Minas Gerais.

Ao **EVA – Grupo Brasileiro de Tumores Ginecológicos**, pois o convívio com pessoas tão brilhantes foi o motivo para enfrentar os desafios da pós-graduação em oncoginecologia e tentar me aproximar da capacidade profissional de cada um de vocês.

Ao **Departamento de Patologia do Hospital do Câncer de Barretos**, em nome da **Alexandra, Patrícia, Monise e Guilherme**, por ajudarem com afinco na confecção das lâminas e realização dos testes de imunohistoquímica.

Ao **Departamento de Pós-Graduação**, em nome da **Carolina Sgorlon, Caroline Oliveira, Vitória Bianchin**, pela ajuda na resolução das burocracias do dia a dia.

À **Carol Laus, Luciane Sussuchi, Fernanda Munari, Gustavo Nóriz, Aline Larissa e Murilo Bonatelli**, pela ajuda enorme em uma área inóspita a um simples oncologista.

Ao **Departamento de Bioinformática e Estatística**, na figura da **Luciane Sussuchi e Marcos Alves**, pela ajuda nas complexas análises realizadas.

Ao **Martins e Milene**, funcionários da Biblioteca, por todo apoio acadêmico que ali encontrei.

Aos **funcionários do SAME (Serviço de Arquivo Médico e Estatística)**, por toda ajuda e organização no acesso aos prontuários das pacientes.

A todos os meus **ex-chefes de residência do Hospital do Câncer de Barretos** e aos **professores da pós-graduação**, graças a vocês tornei-me um profissional competente na área da oncologia.

Aos profissionais do **InORP – Instituto Oncológico de Ribeirão Preto**, pelo convívio diário nestes quase 10 anos.

Aos **familiares e amigos (Belo Horizonte, Lavras, Araxá, Barretos e Ribeirão Preto)**, pelo incentivo e torcida nesta longa trajetória.

Aos **meus pacientes de Ribeirão Preto**, a dedicação profissional é sempre em prol do melhor para vocês.

Às **pacientes do Hospital do Câncer de Barretos**, mesmo não as conhecendo, foi graças a vocês que este trabalho existiu.

À **Deus**. Sem fé, não somos capazes de atingir nada que almejamos.

*“Enquanto descansa, carregue pedras.”*

**Autor desconhecido.**

*“Tudo posso naquele que me fortalece.”*

**Filipenses 4:13.**

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1	Epidemiologia	1
1.2	Fisiopatologia e fatores de risco	2
1.3	Classificação clássica do câncer de endométrio (clínico-patológica)	2
1.4	Classificação morfológica do câncer de endométrio	4
1.5	Avaliação molecular	4
1.6	Outros marcadores prognósticos e tratamentos relacionados	7
1.7	Estadiamento e estratificação de risco do carcinoma de endométrio	8
1.8	Perfil de expressão gênica	9
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>11</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>12</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>13</b>
4.1	Delineamento e fator em estudo	14
4.2	Desfecho clínico	14
4.3	Critérios de inclusão	14
4.4	Critérios de exclusão	15
4.5	Local do estudo	15
4.6	Descrição das etapas do estudo	15
	Estudo 1 – Reavaliação anátomo-patológica	15
	Estudo 2 – Classificação molecular e <i>Nanostring</i> (Parte A e B)	16
<b>5</b>	<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA E DE BIOINFORMÁTICA</b>	<b>29</b>

<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>31</b>
<b>6.1</b>	<b>Resultados Estudo 1 – Reavaliação anátomo-patológica</b>	<b>37</b>
<b>6.2</b>	<b>Resultados Estudo 2 – Classificação molecular e <i>Nanostring</i></b>	<b>41</b>
<b>6.2.1</b>	<b>Resultado Classificação Molecular</b>	<b>43</b>
<b>6.2.2</b>	<b>Resultado <i>Nanostring</i></b>	<b>47</b>
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>55</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>63</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>64</b>
	<b>ANEXOS</b>	<b>77</b>
	<b>Anexo 1. Carta de aprovação do CE</b>	<b>77</b>
	<b>Anexo 2. Ficha de dados clínicos, cirúrgicos e patológicos</b>	<b>91</b>
	<b>Anexo 3. Tabela com vias de sinalização do <i>NanoString</i></b>	<b>94</b>
	<b>Anexo 4. Artigo publicado relacionado à Tese</b>	<b>95</b>
	<i>Artigo 1 – Squamous differentiation portends poor prognosis in low and intermediate-risk endometrioid endometrial cancer.</i>	<b>95</b>
	<i>Artigo 2 – A 4-gene signature associated with recurrence in low- and intermediate-risk endometrial cancer.</i>	<b>104</b>
	<b>Anexo 5. Artigos publicados em conjunto com o orientador não relacionados à Tese</b>	<b>112</b>
	<i>Artigo 1 – Early removal of indwelling urinary catheter after radical surgery for early-stage cervical cancer – A cohort study.</i>	<b>112</b>
	<i>Artigo 2 – Accuracy of MRI for diagnosing pelvic and para-aortic lymph node metastasis in cervical cancer.</i>	<b>120</b>
	<i>Artigo 3 – Ovarian Sertoli-Leydig Cell Tumors: Epidemiological, Clinical and Prognostic Factors.</i>	<b>128</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Localização das mutações na sequência do gene <i>TP53</i> no câncer endometrial.	23
<b>Figura 2</b>	Esquema ilustrativo das 3 etapas principais da técnica <i>Nanostring</i> .	24
<b>Figura 3</b>	Esquema ilustrativo dos barcodes moleculares (sonda de captura específica e sonda reporter codificada por cores) determinando correlação com gene específico.	25
<b>Figura 4</b>	Vias de sinalização celular avaliadas pela metodologia <i>Nanostring</i> .	26
<b>Figura 5</b>	Distribuição da característica morfológica, grau histológico, estadiamento e ILV após análise de patologistas especialistas em oncoginecologia.	39
<b>Figura 6</b>	Distribuição na Estratificação de Risco Modificada da ESMO após análise de patologistas especialistas em oncoginecologia.	40
<b>Figura 7</b>	Curva de Kaplan-Meier entre pacientes sem mudanças na estratificação de risco e que apresentaram <i>up-staging</i> após revisão patológica.	41
<b>Figura 8</b>	Amostras do experimento (eixo X) divididas nos 5 cartuchos (cores verde escuro, marrom, violeta, rosa e verde claro) demonstrando os logs das contagens dos genes (eixo Y).	48
<b>Figura 9</b>	Análise do controle de qualidade do experimento com controles positivos em ascensão e controles negativos agrupados abaixo da linha ascendente.	48

- Figura 10** Genes endógenos antes da normalização com as 49 amostras representadas no eixo X e o  $\log_2$  da contagem dos genes no eixo Y. 49
- Figura 11** Genes endógenos após normalização (técnica *Quantil*) com as 49 amostras representadas no eixo X e o  $\log_2$  da contagem dos genes no eixo Y. 49
- Figura 12** *Heatmap* dos RNAs diferencialmente expressos entre pacientes que apresentaram recidiva (rosa) em relação aos que não recidivaram (azul). No eixo X estão representadas as amostras do estudo e no eixo Y à direita os genes endógenos codificadores do RNA diferencialmente expressos (em cor vermelha estão os genes com maior expressão e na cor azul os com menor expressão). 50
- Figura 13** Tabela com os 12 genes diferencialmente expressos e as vias de sinalização relacionadas a cada um deles. 51
- Figura 14** *Heatmap* dos RNAs diferencialmente expressos entre pacientes que apresentaram recidiva (rosa) em relação aos que não recidivaram (azul escuro), correlacionando com a classificação molecular (laranja – MSI; rosa claro – *POLE* ultramutado; azul piscina – p53 *wild-type*; verde – p53 anormal; cinza – inconclusivo). No eixo X estão representadas as amostras do estudo e no eixo Y à direita os genes endógenos codificadores do RNA diferencialmente expressos (em cor vermelha estão os genes com maior expressão e na cor azul os com menor expressão). 51
- Figura 15** Curvas ROC individuais dos genes codificadores de RNA diferencialmente expressos – recidivas. 52
- Figura 16** Curvas ROC individuais dos genes codificadores de RNA diferencialmente expressos – não-recidivas. 53

**Figura 17** Curva ROC combinada dos genes codificadores de RNA diferencialmente expressos que podem influenciar no risco de recidiva.

54

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Protocolo para detecção de RE, RPg, p53, PTEN e Beta-Catenina ( <i>Dako, Agilent</i> ).	16
<b>Tabela 2</b>	Protocolo para detecção de p16, ARIAD1a e L1CAM ( <i>Ventana, ROCHE</i> ).	17
<b>Tabela 3</b>	Níveis de expressão e padrões de coloração PD-L1.	19
<b>Tabela 4</b>	Sequência dos primers utilizados para amplificação do gene <i>POLE</i> (éxons 9, 10, 11, 12, 13 e 14) e condições para realização do sequenciamento.	21
<b>Tabela 5</b>	Características clínicas da população.	31
<b>Tabela 6</b>	Características cirúrgicas da amostra.	33
<b>Tabela 7</b>	Características anatomopatológicas dos espécimes.	33
<b>Tabela 8</b>	Características do tratamento de radioterapia adjuvante.	34
<b>Tabela 9</b>	Características dos sítios de recidiva da população.	34
<b>Tabela 10</b>	Status atual das pacientes.	35
<b>Tabela 11</b>	Análise univariada para avaliação do risco de recorrência.	36
<b>Tabela 12</b>	Análise multivariada para avaliação do risco de recorrência.	37
<b>Tabela 13</b>	Características clínicas e demográficas das pacientes.	37

<b>Tabela 14</b>	Distribuição da característica morfológica, grau histológico, estadiamento, ILV e estratificação de risco após análise de patologistas especialistas em oncoginecologia.	38
<b>Tabela 15</b>	Mudanças na Estratificação de Risco Modificada da ESMO após análise por patologistas especialistas em oncoginecologia.	40
<b>Tabela 16</b>	Painel de Imuno-histoquímica das 51 amostras (17 recidivas; 34 não-recidivas).	42
<b>Tabela 17</b>	Avaliação de Instabilidade de Microssatélite.	43
<b>Tabela 18</b>	Análise da mutação do <i>TP53</i> baseada em NGS.	45
<b>Tabela 19</b>	Resultados da Classificação Molecular.	45
<b>Tabela 20</b>	Classificação Molecular entre recidivas e não-recidivas.	47
<b>Tabela 21</b>	Curvas ROC individuais dos genes codificadores de RNA diferencialmente expressos.	52
<b>Tabela 22</b>	Genes selecionados através de regressão logística ( <i>backward stepwise</i> ) para determinação da Curva ROC combinada.	53
<b>Tabela 23</b>	Classificações de risco para câncer de endométrio.	60

## LISTA DE ABREVIATURAS

ARIAD1A	Proteína codificada pelo gene <i>ARIAD1A</i>
AUC	Área sob a curva
Beta-catenina	Proteína codificada pelo gene <i>CTNNB1</i>
CA-125	<i>Cancer antigen 125</i>
cga	Campos de grande aumento
CGI	<i>Cancer Genome Interpreter</i>
CPOM	Centro de Pesquisa em Biologia Molecular
CV	Coeficiente de variação
DFS	Sobrevida livre de doença
DM	Diabetes Mellitus
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECOG	Escala de desempenho ( <i>Eastern Cooperative Oncologic Group</i> )
ESMO	<i>European Society for Medical Oncology</i>
FOV	Campos de visão ( <i>Field of View</i> )
FIGO	Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
HAS	Hipertensão Arterial
HCB	Hospital de Câncer de Barretos
HDR	Braquiterapia de alta taxa de dose
HRP	<i>Horse Radish Peroxidase</i>
HTA + SOOB	Histerectomia total + salpingooforectomia bilateral
IHQ	Imuno-histoquímica
ILV	Invasão linfovascular
Ki67	Proteína nuclear codificada pelo gene <i>MKI67</i>
L1CAM	Proteína transmembrana codificada pelo gene <i>L1CAM</i>
LND	Linfadenectomia
IMC	Índice de massa corpórea
INCA	Instituto Nacional do Câncer
ml	Mililitro
Min	Minutos
MMR	Proteínas de reparo ao dano do DNA

MSI-H	Instabilidade de microssatélite alta
MSI-L	Instabilidade de microssatélite baixa
MSS	Estabilidade de microssatélite
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
μl	Microlitro
μm	Micrômetro
ND	Não disponível
NGS	Sequenciamento de Nova Geração
ng	Nanograma
p16	Proteína citoplasmática codificada pelo gene <i>CDKN2A</i>
p53	Proteína citoplasmática de massa molecular 53 kDa codificada pelo <i>TP53</i>
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PD-L1	Proteína de morte celular programada 1 codificada pelo gene <i>PDCD1</i>
PLS	Pesquisa do linfonodo sentinela
POLE	Gene da polimerase <i>épsilon</i>
<i>ProMise</i>	<i>Proactive Molecular Risk Classifier for Endometrial Cancer</i>
PTEN	Proteína fosfatase homóloga à tensina codificada pelo gene <i>PTEN</i>
REDCap	<i>Research Electronic Data Capture</i>
Ref.	Referência
RE	Receptor de Estrógeno
<i>ROC</i>	<i>Receiver operating characteristic</i>
RPg	Receptor de Progesterona
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	RNA mensageiro
RNAmi	micro RNA
RNAInc	RNA longo da não codificação
siRNA	RNA silenciadores
rpm	Rotações por minuto
RRS	Escore do risco de recorrência
SEER	<i>Surveillance, Epidemiology, and End Results</i>

SOOB	Salpingooforectomia bilateral
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
U/ml	Unidades por mililitro
VAF	Frequência de variante alélica
WT	<i>Wild-type</i>

## RESUMO

Andrade, DAP. *Revisão anátomo-patológica e molecular do câncer de endométrio de risco baixo e intermediário. Tese de Doutorado (Doutorado)*. Barretos: Hospital de Câncer de Barretos;2021.

**JUSTIFICATIVA:** O câncer de endométrio é a neoplasia ginecológica mais frequente nos países desenvolvidos e a segunda nos países em desenvolvimento. Tradicionalmente classificava-se o carcinoma de endométrio em tipo I (endometrióide) e tipo II (serosos e células claras). Recentemente, o projeto *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) mudou a compreensão da carcinogênese deste tumor, definindo quatro subgrupos moleculares com prognósticos diferentes: polimerase E (*POLE*) ultramutado; instabilidade de microsatélite (MSI-H); número de cópias somáticas baixas e número de cópias altas (*serous-like*). Novas metodologias com menor complexidade e custos foram desenvolvidas. Por outro lado, o diagnóstico histopatológico do carcinoma de endométrio é de difícil reprodutibilidade, mesmo quando realizado por patologistas especialistas em oncoginecologia. Os tumores do trato genital feminino são os que possuem maior discordância no seu diagnóstico.

**OBJETIVO:** Os dois objetivos principais são avaliar a discrepância no diagnóstico histopatológico de pacientes com câncer de endométrio de risco baixo e intermediário revisados por dois patologistas especialistas em oncoginecologia comparando com os laudos iniciais de patologistas não especialistas. Também avaliaremos a expressão do RNA tumoral das pacientes que apresentaram recidiva comparando com seus pares que não recidivaram com o intuito de determinar um perfil de expressão gênica preditora de risco de recorrência nesta população.

**MATERIAIS E MÉTODOS:** Foi realizado um estudo de coorte retrospectivo em pacientes diagnosticadas com adenocarcinoma de endométrio de risco baixo (carcinoma endometrióide estágio IA grau 1 ou 2) e intermediário (carcinoma endometrióide estágio IB grau 1 ou 2; carcinoma endometrióide estágio IA grau 3) no Hospital de Câncer de Barretos entre janeiro de 2009 a dezembro de 2014. As 195 pacientes incluídas tiveram seus laudos iniciais revisados por dois patologistas especialistas em oncoginecologia e quatro variáveis analisadas (característica morfológica; grau histológico; invasão miometrial; invasão linfocelular (ILV)). Estas quatro variáveis foram confrontadas com os laudos previamente existentes, além da estratificação de risco modificada da ESMO (*European Society of Medical Oncology*) de cada

uma delas. Na sequência, correlacionamos o impacto desta reclassificação histopatológica com a sobrevida livre de doença das pacientes. A partir desta coorte retrospectiva, realizamos um estudo de caso-controle entre pacientes com e sem recidiva com inclusão 2:1 (2 não-recidivas / 1 recidiva) pareando por idade e estadiamento com o intuito de comparar a expressão do RNA tumoral pela metodologia *Nanostring* entre os dois grupos e construir um escore de risco de recorrência (RRS).

**RESULTADOS:** Das 195 pacientes avaliadas pelos patologistas especialistas, 15 foram excluídas. A frequência de mudança no laudo anátomo-patológico da característica morfológica, grau histológico, invasão miometrial e ILV foi respectivamente 13,3%, 62,8%, 18,3% e 11,1%. Considerando a estratificação de risco modificada da ESMO, 126 pacientes (70%) não tiveram mudança em relação a classificação inicial. Das 54 pacientes restantes (30%), 24 (44,4%) tiveram *downstaging* e 30 (50,6%) tiveram *upstaging*. A sobrevida livre de doença (SLD) em 5 anos das pacientes que tiveram *upstaging* foi de 86,7% e das pacientes que não tiveram mudança foi de 88,0% ( $p = 0,77$ ). Dezesete pacientes recidivadas e 34 não recidivadas tiveram o RNA tumoral avaliado, sendo que duas foram excluídas pela baixa qualidade do material (1 recidiva e 1 não-recidiva). O perfil de expressão mostrou 12 genes diferencialmente expressos entre os dois grupos. A curva ROC individual de cada um dos genes foi realizada e todas apresentaram uma AUC > 0,7. Utilizando a técnica *backward stepwise* de regressão logística, quatro genes foram destacados: *FN1*, *DUSP4*, *LEF1* e *SMAD9*. O RRS foi calculado determinando uma curva ROC do modelo de 4 genes com AUC de 0,93, sensibilidade de 100% e especificidade de 72,7%.

**CONCLUSÃO:** Apesar das diferenças nos laudos reavaliados por patologistas especialistas em oncoginecologia e a mudança na estratificação das mesmas (30%), não houve diferença na SLD. Identificamos uma assinatura de quatro genes que prevê o risco de recorrência em pacientes com câncer de endométrio de risco baixo e intermediário.

**PALAVRAS-CHAVE:** Câncer de endométrio de risco intermediário e baixo; revisão anátomo-patológica especializada; discrepâncias anátomo-patológica; classificação molecular; perfil de expressão gênica; escore de risco de recorrência.

## ABSTRACT

Andrade, DAP. *Anatomopathological and molecular review of low- and intermediate-risk endometrial cancer. Doctoral Dissertation (PhD's Degree)*. Barretos: Barretos Cancer Hospital;2021.

**BACKGROUND:** Endometrial cancer is the most frequent gynecological cancer in developed countries and the second in lower income countries. Traditionally, endometrial carcinoma was classified as type I (endometrioid) and type II (serous and clear cell). Recently, the Cancer Genome Atlas (TCGA) project changed the understanding of the carcinogenesis of this tumor, leading to four molecular subgroups with different prognosis: DNA polymerase epsilon (*POLE*) ultra-mutated; microsatellite instability hypermutated; copy-number low, and copy-number high (serous-like). New methodologies with less complexity and costs were developed. On the other hand, the histopathological diagnosis of endometrial carcinoma has a low reproducibility, even when performed by pathologists specialized in oncogynecology. Tumors of the female genital tract are the most disagreeable in their diagnosis.

**AIM:** The two main objectives are to evaluate the discrepancy in the histopathological diagnosis of patients with low and intermediate-risk endometrial cancer reviewed by two pathologists specialized in oncogynecology, comparing with the initial reports of non-specialist pathologists. Also, evaluate the RNA expression of patients who had recurrence compared to their peers who did not relapse in order to determine a gene expression profile that predicts the risk of recurrence in this population.

**MATERIALS AND METHODS:** A retrospective cohort study was performed in patients diagnosed with low-risk (stage IA, grade 1 or 2 endometrioid carcinoma) and intermediate-risk endometrioid adenocarcinoma (stage IB, grade 1 or 2 endometrioid carcinoma; stage IA, grade 3 endometrioid carcinoma) at the Barretos Cancer Hospital from January 2009 to December 2014. The 195 patients included had their initial reports reviewed by two pathologists specialized in oncogynecology and four variables analyzed (morphological feature; histological grade; myometrial invasion; lymphovascular space invasion (LVSI)). These four variables were compared with previously existing reports, in addition to the European Society of Medical Oncology (ESMO) modified classification for each of them. Next, we correlated the impact of the histopathological reclassification with their disease-free survival (DFS). From this retrospective cohort, we conducted a case-control study between patients

with and without recurrence with 2:1 inclusion (2 non-recurrence / 1 recurrence) matched by age and staging in order to compare the RNA expression using the Nanostring methodology between the two groups and to build a recurrence risk score (RRS).

**RESULTS:** Of the 195 patients evaluated by specialist pathologists, 15 were excluded. The frequency of discrepancy in morphological feature, histological grade, myometrial invasion, and LVSI was 13.3%, 62.8%, 18.3%, and 11.1%, respectively. Considering modified ESMO classification, 126 patients (70%) had no modification. Among the remain 54 patients (30%), 24 (44.4%) had downstaging and 30 (50.6%) had upstaging. The 5-year DFS in patients who had upstaging was 86.7% and in patients who had no modification in stage was 88.0% ( $p = 0.77$ ). Seventeen recurrence and 34 non-recurrence patients had their RNA evaluated, two of which were excluded due to the low quality of RNA (1 recurrence and 1 non-recurrence). The expression profile showed 12 genes differentially expressed between the two groups. The ROC curve for each gene was performed and all of them presented AUC higher than 0.7. After backward stepwise logistic regression, four genes were highlighted: *FN1*, *DUSP4*, *LEF1* and *SMAD9*. RRS was calculated leading to a ROC curve of the 4-gene model with an AUC 0.93, sensitivity of 100% and specificity of 72.7%.

**CONCLUSION:** Despite the differences in the reports reassessed by expert gynecological pathologists and the risk classification modification (30%), there was no difference in their DFS. We also identified a four-gene signature that predicts risk of recurrence in patients with low and intermediate-risk endometrial cancer.

**KEYWORDS:** Low and intermediate-risk endometrial cancer; specialized anatomopathological review; anatomopathological discrepancies; molecular classification; gene expression profile; recurrence risk score.

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Epidemiologia

O câncer ginecológico representa um grave problema de saúde em todos os países, tendo, porém, situações peculiares de acordo com o status socioeconômico de cada nação. Nos países do hemisfério norte, os chamados países desenvolvidos, a estatística mostra que os tumores do corpo uterino são os mais prevalentes e o segundo em termos de mortalidade dentre os tumores ginecológicos. Já nos países em desenvolvimento, o câncer de colo de útero é o que apresenta maior prevalência e mortalidade dos tumores do trato genital feminino.<sup>1,2</sup>

Dados da estimativa anual americana do SEER (*Surveillance, Epidemiology, and End Results Program*) de 2021 mostram que o câncer do corpo do útero será responsável por mais de 66000 casos novos de câncer, representando quase 60% de todos os tumores ginecológicos esperados para o presente ano neste país.<sup>1</sup> Quando analisamos as curvas das últimas décadas, há um aumento de novos casos deste tumor, não só na população negra, fato visto há décadas, como também na população branca. A explicação para o aumento na incidência de casos de câncer de endométrio possivelmente correlaciona-se com os hábitos alimentares dos americanos e o número cada vez maior de obesos naquele país.<sup>3</sup> Além disso, houve uma inversão na curva de mortalidade relacionada com esta doença, com um aumento de mortes desde o início dos anos 2000.

No Brasil, os dados estatísticos de câncer são escassos. Dados da estimativa 2020 do Instituto Nacional do Câncer (INCA), contemplando o biênio 2020-2021, mostram que o câncer de corpo de útero é responsável por aproximadamente 6500 casos novos por ano, sendo o 8º tumor mais prevalente no sexo feminino e o 3º tumor ginecológico mais frequente. Independente de qual região geográfica do país, o câncer de colo de útero é mais prevalente que o de endométrio, sendo a região sudeste a que mais se aproxima do cenário dos países desenvolvidos.<sup>4</sup> Duas publicações recentes atualizaram o cenário do câncer ginecológico no Brasil. Paulino *et al.* publicaram análise epidemiológica referente aos tumores ginecológicos mais prevalentes no país no período entre 2000 e 2015, perfazendo um total de 382932 pacientes avaliadas. O câncer de endométrio representava 15,9% dos diagnósticos (60830 casos) neste período dentre todos os tumores ginecológicos avaliados, sendo que pouco mais de 45% dos casos foram diagnosticados com doença localmente avançada ou metastática.<sup>5</sup> Estes mesmos autores demonstraram que assim como nos países desenvolvidos, espera-se

um aumento na incidência do câncer de endométrio no Brasil nas próximas décadas, baseado no envelhecimento da população brasileira e também na epidemia de obesidade presente inclusive nos países em desenvolvimento.<sup>6</sup>

## **1.2 Fisiopatologia e fatores de risco**

Os tumores do corpo uterino podem ter sua origem de duas linhagens celulares principais, a saber: 90% deles são de origem epitelial (os chamados carcinomas de endométrio) e os 10% restantes desenvolvem-se do componente mesenquimal do útero. Com isso há uma subdivisão que compreende os carcinomas endometriais (incluindo os carcinosarcomas) e os sarcomas uterinos.<sup>7</sup>

Os fatores de risco do câncer de corpo de útero estão atrelados diretamente à grande exposição de estrógeno por parte da paciente durante toda sua vida. As situações vivenciadas pelas mulheres que aumentam a exposição do estrógeno são: idade precoce da menarca; menopausa tardia; baixa paridade; terapia de reposição hormonal com estrógeno isolado; síndrome plurimetabólica (obesidade, diabetes mellitus, dislipidemia, hipertensão arterial); presença de tumores secretores de estrogênio; longos períodos anovulatórios. Outro fator de risco importante deste tumor é a idade, sendo que apenas 15% dos diagnósticos acontecem abaixo dos 50 anos e somente 5% abaixo dos 40 anos.<sup>8</sup> O uso de contraceptivos hormonais é um fator de proteção visto que regulariza os ciclos menstruais diminuindo a exposição da mulher a ciclos anovulatórios com alta exposição de estrógeno.<sup>9</sup>

## **1.3 Classificação clássica do câncer de endométrio (clínico-patológica)**

O conceito tradicional do câncer de endométrio divide esta doença em dois grandes grupos: tipo I (endometrióide) e tipo II (serosos e células claras). Estes dois grupos apresentam mecanismos de desenvolvimento distintos, com diferentes lesões precursoras, diferentes anormalidades genéticas e moleculares e como consequência diferentes resultados clínicos. Este modelo dualístico na prática clínica não representa uma boa correlação com o prognóstico e com os tratamentos adjuvantes a serem realizados.<sup>10</sup>

O tipo I compreende 80% dos diagnósticos de câncer de endométrio tendo como protótipo o adenocarcinoma endometrióide moderadamente ou bem diferenciado. Acomete mulheres na menopausa e normalmente está associado à síndrome plurimetabólica (obesidade; diabetes mellitus; dislipidemia). Apresentam baixo potencial de invasividade do

miométrio e alta expressão de receptores de estrógeno, cursando com um melhor prognóstico.<sup>11</sup>

O tipo II corresponde a 10-20% dos carcinomas endometriais, sendo o subtipo seroso o mais prevalente dentro deste grupo heterogêneo de tumores. Está associado à atrofia endometrial, baixa expressão de receptores hormonais e maior potencial de invasão linfovascular e metástases à distância.<sup>11</sup>

#### **1.4 Classificação morfológica do câncer de endométrio**

A classificação do câncer de endométrio em dois grupos mutuamente exclusivos esbarra em um segundo problema que é a reprodutibilidade dos diagnósticos.<sup>12, 13</sup> O patologista avalia as seguintes características morfológicas, dentre outras: subtipo histológico (endometrióide, mucinoso, seroso, células claras, adenoescamoso, indiferenciado, carcinoma misto); profundidade de invasão miometrial do tumor (diferencia-se assim os tumores em estágio IA e IB); grau histológico tumoral (grau 1 – bem diferenciado; grau 2 – moderadamente diferenciado; grau 3 – pouco diferenciado ou indiferenciado); presença ou ausência de invasão linfovascular (ILV) na peça tumoral.

A avaliação de segunda opinião de patologistas é uma prática diária em serviços de oncologia com o intuito de se confirmar um diagnóstico previamente definido. A avaliação do impacto desta consulta é difícil de se mensurar. Estudo retrospectivo da Universidade de Iowa com mais de 5600 avaliações de segunda opinião tentou quantificar as mudanças nos laudos prévios em 3 grupos: nenhuma discordância diagnóstica; discordância diagnóstica mínima; discordância diagnóstica maior. Houve discordância geral nos laudos em pouco mais de 11% dos casos, sendo que 2,3% foram discordâncias maiores. Avaliando por grupos de patologia, a que apresentou maior taxa de discordância foi a do trato reprodutivo feminino (24%).<sup>12</sup>

O estudo multicêntrico PORTEC-3 incluiu 686 pacientes com diagnóstico de carcinoma de endométrio de alto risco (estádio IB – carcinoma endometrióide grau 3 com ou sem ILV; estágio II ou III do tipo endometrióide; estágio I a III com histologia serosa ou células claras) que foram randomizadas para tratamento combinado de quimioterapia + radioterapia ou radioterapia exclusiva.<sup>14</sup> Para tanto, os resultados anátomo-patológicos eram revisados centralmente antes das pacientes serem incluídas no estudo com o intuito de se confirmar um carcinoma de alto risco. Dois centros europeus que participaram deste estudo (Holanda e Inglaterra) enviaram 1226 amostras de pacientes supostamente classificadas como de alto

risco para serem avaliadas, porém apenas 329 pacientes (26,8%) tiveram a confirmação deste diagnóstico. Aproveitando o extenso banco de dados formado, avaliou-se a discrepância dos laudos dos patologistas regionais que fizeram o primeiro diagnóstico com os dos patologistas do time central do estudo PORTEC-3. As variáveis analisadas no laudo anátomo-patológico foram: tipo histológico; grau tumoral; profundidade de invasão miometrial; distância tumoral até a serosa; invasão linfovascular (ILV); envolvimento do estroma cervical; envolvimento de anexos e/ou ovários; envolvimento linfonodal. Houve uma taxa de discrepância em pelo menos um dos itens avaliados de 43%, demonstrando assim a dificuldade de reprodutibilidade do diagnóstico de um carcinoma de endométrio por dois patologistas diferentes.<sup>13</sup>

### **1.5 Avaliação molecular**

Nas últimas duas décadas, vários estudos com o objetivo de melhorar a caracterização molecular do carcinoma endometrial têm demonstrado que a complexidade da fisiopatologia deste tumor é muito maior do que o modelo dualístico acima descrito.<sup>15, 16</sup> As mutações mais prevalentes em cada um dos dois grandes subgrupos tradicionais são: tipo I (*PTEN*; MSI; via da *PIK3CA*); tipo II (*TP53*; *PPP2R1A*; amplificação do *Her-2*).<sup>17, 18</sup>

Após a caracterização genômica do câncer de endométrio realizada em 2013, quatro grupos genéticos foram definidos: polimerase E (*POLE*) ultramutado; instabilidade de microssatélite (MSI-H); número de cópias somáticas baixas e número de cópias altas (*serous-like*). Esta classificação é difícil de ser colocada em prática devido a necessidade da caracterização genômica dos tumores.<sup>19</sup> Desde então outras classificações têm sido realizadas no intuito de aperfeiçoar a classificação prognósticas destas pacientes e proporcionar possíveis tratamentos complementares (quimioterapia e/ou radioterapia e/ou cirurgias mais extensas) visando benefícios em termos de sobrevida.

#### **1.5.1 TCGA (*The Cancer Genome Atlas*)**

Através de um consórcio internacional, 373 pacientes com diagnóstico de câncer de endométrio (306 do subtipo endometrióide, 53 serosos de alto grau e 13 de histologia mista) tiveram suas amostras tumorais e DNA germinativo correspondente analisados. Foi realizado uma primeira análise em 363 pacientes quanto ao número de alterações em cópias somáticas, sendo identificado 4 grupos com as seguintes características:<sup>19</sup>

- *Cluster 1*: composto por tumores quase que desprovidos de alterações no número de cópias somáticas (< 0,5% de alteração do genoma) e sem apresentar eventos recorrentes significativos.
- *Cluster 2*: composto basicamente por tumores endometrióides com baixa amplificação no braço 1q, o que lhes conferiram um melhor prognóstico em termos de recidiva.
- *Cluster 3*: também composto praticamente por tumores endometrióides, porém com alta amplificação no braço 1q, o que diminuiu a sobrevida livre de progressão quando comparado aos *clusters* 1 e 2.
- *Cluster 4*: composto por quase todos os tumores serosos de alto grau (50 pacientes) e de histologia mista (8 pacientes), além de tumores endometrióides de grau 3, caracterizado por alto grau de alterações no número de cópias somáticas, amplificação de oncogenes (*MYC*, *ERBB2* e *CCNE1*) e mutação do *TP53*.

Na sequência foi realizado o sequenciamento do exoma completo de 248 pacientes. Baseado nas análises genéticas descritas, houve a classificação dos tumores de endométrio em 4 grupos:

- Polimerase E (*POLE*) ultramutado: grupo composto por tumores com alto número de mutações restrito a um único nucleotídeo localizado no domínio da exonuclease *POLE* (proteína catalítica da subunidade da DNA polimerase *epsilon* responsável pelo reparo e replicação do DNA nuclear); grupo de melhor prognóstico.
- Instabilidade de microssatélite (MSI-H): grupo composto por tumores com alta taxa mutacional (deleção *frameshift* no gene *RPL22* e mutações não sinônimas no gene *KRAS*) e com presença de instabilidade de microssatélite (sobretudo hipermetilação do promotor *MLH1*).
- Número de cópias somáticas baixas: tumores com alta frequência de mutação no gene *CTNNB1*; considerado um grupo com estabilidade de microssatélite.
- Número de cópias altas (*serous-like*): a maioria dos tumores apresentando mutação no gene *TP53* e alta frequência de mutações nos genes *FBXW7* e

*PPP2R1A*; grupo composto basicamente por tumores serosos e endometrióides de grau 3; grupo de pior prognóstico.

A análise genética completa demonstrou a presença de 48 genes com diferentes frequências entre os grupos acima mencionados. As principais diferenças vistas correlacionando os genes expressos e o subgrupo são: mutação do gene *ARIDB5* e inserção/deleção do gene *RPL22* são vistos com maior frequência no grupo da instabilidade microssatélite; mutação no *TP53* é quase que exclusiva no grupo número de cópias altas (*serous-like*); mutação do gene *TP53* quando ocorre nos tumores endometrióides vêm acompanhada da mutação do gene *PTEN*.<sup>19</sup>

Houve também a análise da expressão dos RNA mensageiros, das proteínas codificadas, dos microRNA e da metilação do DNA. Ao se considerar a expressão dos RNA mensageiros, três grupos foram definidos correlacionando-os com os 4 grupos previamente descritos: mitótico, hormonal e imunorreativo.

### **1.5.2 Classificações moleculares pragmáticas (*ProMisE* e Leiden/TransPORTEC)**

Com o advento da classificação molecular realizada pelo sequenciamento genético no TCGA, ficou claro a nova realidade do diagnóstico do câncer de endométrio. Por outro lado, há uma dificuldade de se implementar na prática diária a metodologia desta nova classificação.

Fez-se necessário o desenvolvimento de tecnologias de mais fácil reprodutibilidade e ao mesmo tempo com a mesma acurácia alcançada nos estudos do genoma do endométrio. *ProMisE* (*Proactive Molecular Risk Classifier for Endometrial Cancer*) e Leiden/TransPORTEC foram metodologias desenvolvidas com o intuito de se determinar uma classificação molecular pragmática e simplificada.<sup>20, 21</sup>

Na metodologia do grupo de Vancouver (*ProMisE*) foram descritos 4 grupos: deficiência nas proteínas do reparo ao dano do DNA (*mismatch repair proteins* – MMR); mutação no domínio exonuclease da polimerase- $\epsilon$  (*POLE*); deficiência ou não na proteína 53 (p53).<sup>20, 22</sup> A primeira etapa desta classificação realiza a pesquisa das proteínas de reparo ao dano do DNA (MMR). Através da técnica de imuno-histoquímica, pesquisa-se a presença ou ausência de 4 proteínas relacionadas ao reparo do DNA: MLH1; MSH2; MSH6; PMS2. O tumor apresenta danos ao reparo do DNA quando uma das quatro proteínas acima descritas está ausente nas células tumorais com controle interno positivo das células não tumorais. Nos casos em que

não há deficiência nas proteínas de reparo ao DNA, é realizado o sequenciamento do domínio exonuclease do gene *POLE* (éxons 9-14). Extrai-se o DNA tumoral dos blocos de parafina e pela técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase) detecta-se a presença de mutações neste referido gene. A terceira e última etapa consiste em avaliar através da imuno-histoquímica se a proteína tumoral 53 (p53) apresenta-se com sua expressão normal. É considerada normal (*wild-type*) quando a reação da IHQ resulta em um *score* 1+ e anormal quando esta mesma reação determina um *score* 0 ou 2+. *Score* 0 representaria mutação com perda de função e *score* 2, mutação com ganho de função/*missense*. Estes dois resultados são agrupados em conjunto considerando a p53 como ausente.

Com isso 4 grupos prognósticos foram definidos com uma estreita correlação com os 4 grupos previamente descritos pelo TCGA: *POLE* ultramutado semelhantes em ambas as classificações; deficiência nas proteínas de reparo ao DNA correlacionando com o grupo da instabilidade microsatélite (MSI-H); p53 normal/*wild-type* correlacionando com o grupo número de cópias somáticas baixo; p53 ausente/anormal correlacionando com o grupo número de cópias altas (*serous-like*).<sup>20, 22, 23</sup>

Já na metodologia do grupo holandês (Leiden/TransPORTEC), foram realizados testes de imuno-histoquímica e sequenciamento para p53, sequenciamento e imuno-histoquímica para determinação de instabilidade de microsatélite e sequenciamento do gene *POLE*. Foram também identificados 4 grupos prognósticos, a saber: p53 mutado (imuno-histoquímica validado por sequenciamento); instabilidade de microsatélite (sequenciamento validado por imuno-histoquímica); *POLE* mutado (sequenciamento genético); grupo sem um perfil molecular específico (NSMP).<sup>21</sup> Esta metodologia foi posteriormente validada em uma coorte com 947 pacientes, sendo possível análise de sobrevida e prognóstico nas pacientes com diagnóstico de câncer de endométrio endometrióide e estágio I.<sup>24</sup>

## 1.6 Outros marcadores prognósticos e tratamentos relacionados

Estudos recentes demonstraram a correlação da proteína de adesão L1CAM como fator de mau prognóstico independente para os tumores de endométrio iniciais.<sup>25</sup> Esta molécula é uma glicoproteína de membrana da superfamília das imunoglobulinas ligada ao processo de neurogênese. O potencial neoplásico desta proteína é sua relação com a proliferação celular, migração, invasão e potencial de metastatização através da ativação da via ERK (*extracelular signal-regulated kinase*) que induz a expressão de genes produtores da motilidade e da

invasividade celular.<sup>26</sup> Esta molécula é detectada através de técnica de imunohistoquímica, facilmente reprodutível nos laboratórios de patologia.<sup>27</sup>

Uma nova classificação dos carcinomas de endométrio do subtipo endometrióide foi publicada levando-se em conta a presença da instabilidade de microssatélite. Os pesquisadores demonstraram quatro subgrupos: normal; defeito epigenético; mutação provável; instabilidade de microssatélite baixa.<sup>28</sup> A instabilidade de microssatélite reflete a inativação dos genes do reparo ao DNA (*MMR*), genes responsáveis por eliminar erros no pareamento das bases nitrogenadas ou erros de inserção-deleção de *loops* que podem surgir durante a replicação do DNA.<sup>29</sup> Para o bom funcionamento deste mecanismo de auto regulação de defeitos na duplicação do DNA, são necessárias seis diferentes proteínas: MSH2; MSH3 ou MSH6; MLH1; MLH3; PMS2 e EXO1. A pesquisa da presença de instabilidade de microssatélite é feita através da expressão dos genes que codificam as proteínas acima descritas ou através da metilação do MLH1.<sup>30</sup>

O entendimento da carcinogênese dos tumores e por consequência o tratamento dos mesmos sofreu mudanças nos últimos anos a partir da descoberta do papel que o sistema imune tem de eliminar e controlar o crescimento tumoral inicial.<sup>31</sup>

Apesar dos avanços da imunoterapia com novas perspectivas de tratamento para câncer de pulmão, melanoma, rim e bexiga, dentre outros, os tumores ginecológicos apresentam resultados mais modestos, com uma taxa de resposta objetiva variando entre 11-15%.<sup>32, 33</sup> Estudos recentes no câncer de endométrio conseguiram demonstrar benefício da imunoterapia independentemente do perfil de expressão do MMR (proficientes ou deficientes).<sup>34</sup>

Os diferentes perfis mutacionais e vias moleculares estão associados a características distintas do câncer de endométrio, no entanto, não existe um painel gênico que possa realizar uma estratificação molecular das pacientes.

### **1.7 Estadiamento e estratificação de risco do carcinoma de endométrio**

Os sistemas de estadiamento de câncer em geral tentam agrupar pacientes com prognósticos similares com o objetivo de definir a melhor estratégia terapêutica. Os grupos de estadiamento baseiam-se no sítio tumoral primário (T), no envolvimento linfonodal regional (N) e na presença de metástases à distância (M).<sup>35</sup>

O estadiamento atual da FIGO (Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia) divide o câncer de endométrio em cinco grandes grupos de acordo com o prognóstico: tumores com invasão máxima restrita ao miométrio (estádio IA e IB); tumores com comprometimento do estroma cervical confinados ao útero (estádio II); tumores que se estendem além do útero mas permanecem confinados na pelve verdadeira (IIIA e IIIB); tumores que apresentam comprometimento linfonodal pélvico e/ou para-aórtico (IIIC1 e IIIC2); tumores metastáticos (IVA e IVB).<sup>36,37</sup> A diferenciação entre estágio IA e IB é a profundidade de invasão miometrial do tumor, sendo que invasão miometrial menor que 50% é classificado como IA e invasão maior ou igual a 50% como IB.<sup>38</sup>

Além da estratificação de risco realizada pelo estadiamento tumoral, outras variáveis são importantes na definição prognóstica do câncer de endométrio. Restringindo apenas ao estágio I, podemos subdividir estas pacientes em três grupos prognósticos ao avaliar o grau tumoral: baixo, intermediário e alto.<sup>39-41</sup> Ao associar a presença de ILV com o estadiamento e grau tumoral, define-se um quarto grupo a esta subdivisão: intermediário-alto.<sup>42</sup>

Avaliando a presença de ILV, dois estudos demonstraram que a sobrevida de pacientes com estágio inicial foi influenciada pela presença desta variável no espécime tumoral.<sup>43, 44</sup> Considerando tumores em estágio I em geral (44% de tumores estágio IB; 25% grau 3), há um risco de comprometimento extrauterino da ordem de 20%.<sup>45</sup>

Outros fatores ainda não muito bem definidos em estudos prospectivos podem influenciar a sobrevida das pacientes com carcinoma de endométrio estágio I: oito ou mais figuras de mitose por 10 campos de grande aumento (CGA) e ausência de receptores de progesterona no tumor.<sup>46</sup>

A expectativa de vida câncer específica desta população de baixo risco (carcinoma endometrióide estágio IA grau 1 ou 2) em 5 anos é de 97,3%<sup>47</sup> e o risco de metástase linfonodal desta mesma população varia de menos de 5% para os tumores grau 1 até 5-9% para os tumores grau 2 ou 3.<sup>48</sup> Já nas pacientes de risco intermediário (carcinoma endometrióide estágio IB grau 1 ou 2 ou estágio IA grau 3), a porcentagem de comprometimento linfonodal pélvico e/ou para-aórtico ultrapassa 20%.<sup>48, 49</sup>

## **1.8 Perfil de expressão gênica**

À medida que o entendimento das várias cascatas responsáveis pelo desenvolvimento dos tumores foi sendo melhor compreendida e descrita,<sup>50</sup> novas tecnologias vêm sendo desenvolvidas no intuito de elucidar e baratear os custos destas descobertas.

A *NanoString nCounter™* é uma tecnologia relativamente nova que pode gerar com acurácia informações genômicas a partir de pequenas quantidades de tecidos fixados de biópsias de pacientes. Esta plataforma usa códigos de barras digitais codificadas por cores (código baseado em combinações de seis sequências com quatro cores distintas), permitindo a quantificação da expressão do RNA mensageiro (mRNA).<sup>51, 52</sup>

Algumas aplicações com esta tecnologia já foram publicadas: possíveis candidatos a biomarcadores no câncer gástrico<sup>53</sup>, câncer de pulmão neuroendócrino<sup>54</sup>, câncer de mama<sup>55</sup>, entre outros; detecção de marcadores preditivos e prognósticos em estudos placebo-controlados<sup>56</sup> ou estudos de fase 3 com quimioterapia<sup>57</sup>; detecção *in vitro* de moléculas imunomoduladoras expressas de acordo com resposta à tratamentos alvo em determinados tumores.<sup>58</sup>

A literatura científica é ainda escassa ao avaliar a aplicabilidade da plataforma *NanoString* no carcinoma de endométrio, independente dos cenários estudados.<sup>59-61</sup>

## 2 JUSTIFICATIVA

O diagnóstico histopatológico do carcinoma de endométrio é de difícil reprodutibilidade, mesmo quando realizado por patologistas especialistas em oncoginecologia. É reconhecido que os tumores do trato genital feminino são os que possuem maior discordância no diagnóstico histopatológico, tanto em laudos inter-examinadores quanto em laudos intra-examinadores.<sup>12, 13</sup>

A classificação molecular do carcinoma de endométrio em quatro subgrupos determinou uma maior acurácia na definição do prognóstico de cada paciente, minimizando os equívocos intra e interobservadores que ocorriam. A possibilidade de realizá-la em quase sua totalidade por técnicas de imuno-histoquímica (necessário apenas o sequenciamento genético do gene *POLE*) determina uma expectativa que logo esteja disponível para o uso diário do oncologista.<sup>20, 22</sup>

Os adenocarcinomas de endométrio de risco baixo (carcinoma endometrióide estágio IA grau 1 ou 2) e de risco intermediário (carcinoma endometrióide estágio IB grau 1 ou 2; carcinoma endometrióide estágio IA grau 3) considerando a classificação de risco modificada da ESMO<sup>42</sup> apresentam excelente prognóstico, com expectativa de vida em cinco anos de aproximadamente 90%.<sup>62</sup> O tratamento é cirúrgico, variando de histerectomia e salpingooforectomia bilateral até a necessidade de linfadenectomia pélvica e/ou para-aórtica associada.<sup>63-65</sup> Além disso, em alguns casos, há a necessidade de complementação de radioterapia adjuvante, sobretudo braquiterapia.<sup>66-68</sup> Porém se uma paciente for classificada erroneamente em um estágio de melhor prognóstico, ela poderá ter suprimido um tratamento adjuvante que aumentaria sua chance de cura, assim como se a mesma for diagnosticada em um estágio de pior prognóstico, poderá receber um tratamento que não era necessário e todas as consequências de seus efeitos colaterais.

Faz-se necessário avaliar através de patologistas especialistas em oncoginecologia a porcentagem de discordância entre os diagnósticos anteriormente firmados. Dentro deste grupo de pacientes de risco baixo e intermediário que tiveram seus casos revistos por patologistas especialistas, fizemos um estudo de caso-controle onde comparamos as pacientes que recidivaram com dois controles que não apresentaram recidiva através da expressão de RNA e pela classificação atual em 4 grupos de acordo com mutação do gene *POLE*, perfil de instabilidade de microssatélite e da mutação ou não do gene *TP53*.

### 3 OBJETIVOS

Avaliar a discrepância existente nos laudos de patologia de pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma de endométrio de risco baixo e intermediário quando comparado a laudos feitos por dois patologistas especialistas em oncoginecologia (**Estudo 1**).

Realizar uma classificação molecular simplificada e pragmática utilizando sequenciamento genético e técnicas de imuno-histoquímica em pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma de endométrio de risco baixo e intermediário, comparando pacientes que apresentaram recidiva com dois pares de pacientes que não recidivaram (**Estudo 2 – Parte A**).

Avaliar a expressão do RNA tumoral das pacientes que apresentaram recidiva comparando com seus pares que não recidivaram e com isso determinar um novo perfil de expressão gênica nos pacientes com diagnóstico de carcinoma de endométrio de risco baixo e intermediário (**Estudo 2 – Parte B**).

#### 4 MATERIAL E MÉTODOS

Após aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos em fevereiro de 2017, com parecer nº 1.909.061 do protocolo 1330/2017, realizou-se um estudo de coorte retrospectivo com o intuito de detectar todas as pacientes com diagnóstico de carcinoma de endométrio de risco baixo e intermediário tratadas no Departamento de Ginecologia Oncológica do Hospital de Câncer de Barretos no período entre janeiro de 2009 a dezembro de 2014. As pacientes foram dispensadas do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) em razão desta pesquisa apresentar caráter retrospectivo com riscos mínimos para as participantes.

Foram coletados:

- dados clínico-demográficos: idade ao diagnóstico; raça; altura; peso; cálculo do índice de massa corpórea (IMC); escala de desempenho (ECOG – *Eastern Cooperative Oncologic Group*); comorbidades clínicas (hipertensão arterial (HAS); diabetes mellitus (DM); outras); número de gestações; status quanto ao hábito de fumar; status hormonal (menopausa ou menacme);
- dados cirúrgicos: data da cirurgia; tipo de cirurgia (histerectomia total + salpingooforectomia bilateral (HTA + SOOB); HTA + SOOB + linfadenectomia pélvica; HTA + SOOB + linfadenectomia pélvica e retroperitoneal; HTA + SOOB + pesquisa do linfonodo sentinela (PLS); histerectomia simples); via de acesso cirúrgico (laparotomia; laparoscopia; robótica; vaginal);
- dados anátomo-patológicos: localização do tumor (fundo uterino; segmento uterino inferior); grau histológico (1, 2 ou 3); tamanho do tumor; presença de invasão da endocérvice; presença de ILV; subtipo histológico (endometrióide; endometrióide com focos de diferenciação escamosa); estadiamento cirúrgico (IA ou IB – de acordo com a profundidade de invasão miometrial); número de linfonodos dissecados;
- dados de tratamento complementar e desfecho clínico: adjuvância com radioterapia (externa; braquiterapia de alta taxa de dose (HDR); externa + HDR); presença ou ausência de recidiva; local da recidiva; tratamento realizado após a recidiva (quimioterapia, cirurgia, radioterapia, cuidados paliativos exclusivo).

Com os dados coletados, montou-se um banco no REDCap (*Research Electronic Data Capture*).<sup>69</sup>

#### 4.1 Delineamento e fator em estudo

##### **Estudo 1:**

Estudo de coorte retrospectivo em pacientes previamente diagnosticadas com adenocarcinoma de endométrio de risco baixo (carcinoma endometrióide estágio IA grau 1 ou 2) e intermediário (carcinoma endometrióide estágio IB grau 1 ou 2; carcinoma endometrióide estágio IA grau 3) considerando a classificação de risco modificada da ESMO<sup>42</sup> com o objetivo de quantificar a porcentagem de discordância de laudos histopatológicos existentes com novos resultados dados por dois patologistas especialistas em oncoginecologia e correlacionar o impacto desta reclassificação histopatológica com a sobrevida das pacientes.

##### **Estudo 2 (Parte A e B):**

Estudo de caso-controle com inclusão 2:1 (2 não-recidivas / 1 recidiva) pareando por idade e estadiamento com o intuito de se comparar a expressão do RNA tumoral pela técnica do *Nanostring* e avaliar os subgrupos moleculares com diferentes prognósticos baseados no sequenciamento genético.

#### 4.2 Desfecho clínico

Reclassificação histopatológica de uma coorte de pacientes com diagnóstico de carcinoma de endométrio de risco baixo e intermediário e sua correlação com a sobrevida dessas pacientes (**Estudo 1**); traçar um novo perfil de expressão gênica através do RNA tumoral pela plataforma *NanoString* e comparar com subgrupos moleculares com prognósticos distintos avaliando possíveis diferenças entre pacientes recidivadas com seus pares que não recidivaram (**Estudo 2 – Parte A e B**).

#### 4.3 Critérios de Inclusão

Pacientes com diagnóstico de carcinoma de endométrio de risco baixo (carcinoma endometrióide estágio IA grau 1 ou 2) e intermediário (carcinoma endometrióide estágio IB grau 1 ou 2; carcinoma endometrióide estágio IA grau 3) considerando a classificação de risco modificada da ESMO<sup>42</sup> tratadas por cirurgia no Hospital de Câncer de Barretos entre 01 de

janeiro de 2009 até 31 de dezembro de 2014 que tenham material biológico armazenado no departamento de patologia da referida instituição.

#### **4.4 Critérios de exclusão**

- Pacientes que tiveram seu laudo histopatológico revisado e não confirmaram um carcinoma de endométrio endometrióide estágio IA grau 1 ou 2; carcinoma endometrióide estágio IB grau 1 ou 2; carcinoma endometrióide estágio IA grau 3;
- Pacientes que não possuíam amostra histopatológica suficiente para o estudo imunohistoquímico e genético realizado neste protocolo;
- Pacientes que não possuíam follow-up mínimo de dois anos.

#### **4.5 Local do estudo**

O estudo foi realizado através da coleta de dados das pacientes tratadas no Hospital de Câncer de Barretos que tiveram diagnóstico de carcinoma de endométrio risco baixo e intermediário. O Departamento de Patologia do referido hospital realizou as reações de imuno-histoquímica e o Centro de Pesquisa em Biologia Molecular (CPOM) realizou a extração dos materiais genéticos (DNA e RNA) para sequenciamento.

#### **4.6 Descrição das etapas do estudo**

##### **Estudo 1 – Reavaliação anátomo-patológica**

Todas as pacientes da coorte retrospectiva tiveram seus diagnósticos histopatológicos revisados por dois patologistas especialistas em oncoginecologia do Departamento de Patologia do Hospital de Câncer de Barretos de maneira independente e cega (VDS e GMM). Tais patologistas fazem parte da subdivisão em oncoginecologia deste departamento desde 2014 quando foi implementada a segmentação em especialidades na patologia. Possuem experiência em oncoginecologia de outros serviços como na cadeira de oncoginecologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Na sequência houve uma reunião de consenso entre ambos para que um novo laudo histopatológico contemplando quatro variáveis fosse feito: subtipo histológico; grau histológico; invasão miometrial; ILV.

Estas quatro variáveis foram confrontadas com os laudos prévios de cada paciente. Determinamos a porcentagem de discordância existente entre cada uma delas. Utilizando a

Estratificação de Risco Modificada da ESMO<sup>42</sup>, comparamos a classificação inicial onde as pacientes eram de risco baixo, intermediário ou intermediário alto com os novos laudos dados pelos especialistas.

### **Estudo 2 – Classificação molecular e Nanostring (Parte A e B)**

Após a avaliação feita pelos patologistas especialistas em oncoginecologia, foram encontrados 17 casos que apresentaram recidiva e que permaneceram como carcinoma endometrióide de risco baixo e intermediário (na coorte inicial tínhamos 22 casos recidivados, porém 5 foram reclassificados como de alto risco e excluídos desta análise). Os 17 casos recidivados foram pareados por idade e estadiamento com 34 pacientes não recidivadas (2 controles para cada caso).

Antes do início das análises genéticas, realizamos análise de imuno-histoquímica (IHQ) das 51 amostras acima descritas. Os seguintes marcadores foram utilizados para as reações: receptor de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RPg), p16, p53, PTEN, Beta-catenina, ARIAD1a, L1CAM e PD-L1. Todo material foi preparado no Setor de Pesquisa do Departamento de Patologia do Hospital de Câncer de Barretos sob a supervisão de três técnicas de laboratório exclusivas deste setor.

Foram realizados cortes histológicos em lâminas silanizadas com a espessura de 4µm. A seguir estas lâminas foram fixadas e desparafinizadas em estufa a 65°C durante 1h. As reações de IHQ para a detecção das proteínas RE, RPg, p53, PTEN e Beta-Catenina foram realizadas em plataforma de automação *Autostainer Link 48 – Dako™ (Capinteria, EUA)*. Foi utilizado método de detecção indireto, composto por um anticorpo primário anti-proteína de interesse, sendo esse anticorpo primário ligado a um anticorpo secundário acoplado a um polímero de HRP (*Horse Radish Peroxidase*). O Kit de detecção utilizado foi *Envision Flex+, High pH (LINK) – Ref.: K800021-2*.

As especificações para cada reação encontram-se na **Tabela 1**.

**Tabela 1.** Protocolo para detecção de RE, RPg, p53, PTEN e Beta-Catenina (*Dako, Agilent*).

Anticorpo (Clone)	Ref.	Incubação (Min)	Diluição	Recuperação Antigênica	Controle	Sistema de Visualização
RE (EP1)	IR8461-2	20	Ready-to-use	TRS High pH	Endométrio	Flex
RPg (RPg)	IR06861-2	20	Ready-to-use	TRS High pH	Endométrio	Flex + Mouse Linker
p53 (DO-7)	IR61661-2	20	Ready-to-use	TRS High pH	Carcinoma de Cólon	Flex

PTEN (6H2.1)	M362729-2	40	Concentrate, 1/100	TRS High pH	GIST	Flex
Beta-Catenina (β-Catenin-1)	IR70261-2	20	Ready-to-use	TRS High pH	Apêndice	Flex + Mouse Linker

Fonte: Laboratório de IHQ – Hospital de Amor de Barretos, 2021; RE – receptor de estrógeno; RPg – receptor de progesterona; p53 – proteína do gene *TP53*; PTEN – proteína do gene *PTEN*; Beta-Catenina – proteína do gene *CTNNB1*; TRS – *target retrieval solution*; GIST – tumor do estroma gastrointestinal; min – minutos.

A recuperação antigênica foi realizada em um sistema fechado de aquecimento, *PT Link, Pre-treatment module for Tissue Specimens – Dako™*, por 20 minutos a 95°C. Após a realização das reações, as lâminas foram submetidas a contra-coloração na mesma plataforma, utilizando-se o *Envision Flex Hematoxilin Link – Dako, Ref.: K800821-2II* por 5 minutos. Em seguida as lâminas foram retiradas do equipamento e desidratadas em um gradiente crescente de etanol (70%, 95% e 2 vezes 100%) e lavadas em xilol para recebimento do meio de montagem. Para montagem utilizou-se lamínulas e meio orgânico (*Dako Mounting Medium – Dako, Ref.: CS703*), sendo aplicada 1 gota por lâmina e adicionada a lamínula. Após a secagem, as lâminas foram visualizadas em microscopia óptica convencional. A avaliação de expressão do p53 foi realizada de acordo com Köbel *et al.*<sup>70</sup>, dos RE e RPg foram adaptados do estudo publicado em 2006 por Reid-Nicholson e colaboradores<sup>71</sup> e a avaliação do PTEN e da Beta-catenina baseou-se na 5ª Edição do *E-book Diagnostic Immunohistochemistry*.<sup>72</sup>

Para as reações de detecção das proteínas p16, ARIAD1a e L1CAM foram feitos cortes histológicos em lâminas silanizadas (carregadas positivamente) com espessura de 4µm, sendo que na sequência estas lâminas foram fixadas e desparafinizadas em estufa a 65°C durante 1h. As reações de IHQ foram realizadas em plataforma de automação *BenchMark Ventana Ultra™*, sendo utilizado método de detecção indireto composto por um anticorpo primário anti-proteína de interesse, sendo esse anticorpo primário ligado a um anticorpo secundário acoplado a um polímero de HRP. Os kits de detecção utilizados foram *Ultra-View DAB IHC Detection Kit, Ref.: 05269806001* e *Optiview DAB IHC Detection Kit, Ref.: 06396500001*.

As especificações para cada reação encontram-se na **Tabela 2**.

**Tabela 2.** Protocolo para detecção de p16, ARIAD1a e L1CAM (*Ventana, ROCHE*).

Tipo de Procedimento	<i>Ultra-View DAB IHC Detection</i>	<i>Optiview DAB IHC Detection</i>
Desparafinização	60 min, 65°C (Estufa de Aquecimento)	60 min, 65°C (Estufa de Aquecimento)
	4 min, 70°C ( <i>Ventana Ultra</i> )	4 min, 70°C ( <i>Ventana Ultra</i> )
Recuperação antigênica	64 minutos a 97°C.	64 minutos a 97°C.
	ULTRA Cell Conditioning Solution 1	ULTRA Cell Conditioning Solution 1

(Condicionador Celular / Identificação Antígenos)	(ULTRA CC1)", Ref.: 05424569001.	(ULTRA CC1)", Ref.: 05424569001
Enzima (Protease)	Não se aplica	Não se aplica
Anticorpo Primário	Anti-CINtec p16 Histology (E6H4) <i>Mouse monoclonal primary antibody</i> , Ref.: 0669548001; Diluição: <i>Ready-to-use</i> Incubação: 32 min.	Anti-L1CAM (Poly), <i>Rabbit polyclonal primary antibody</i> , Ref.: STJ94355; Diluição: 1/100; Incubação: 32 min.
Amplificação	Não se aplica	Não se aplica
Corante de Contraste	Hematoxilina II, 8 minutos	Hematoxilina II, 8 minutos
Pós-Corante de Contraste	(Coloração azulada) <i>Bluing Reagent</i> , 4 min.	(Coloração azulada) <i>Bluing Reagent</i> , 4 min.

Fonte: Laboratório de IHQ – Hospital de Amor de Barretos, 2021; min – minutos.

Após a coloração realizada em plataforma de automação, as lâminas foram secas e passadas em xilol para recebimento do meio de montagem orgânico (*Dako Mounting Medium – Dako, Ref.: CS703*), sendo aplicado 1 gota por lâmina e adicionado a lamínula. Após a secagem as lâminas foram visualizadas em microscopia óptica convencional. A avaliação da expressão do p16 baseou-se estudo publicado em 2006 por Reid-Nicholson e colaboradores<sup>71</sup>, a avaliação do L1CAM seguiu as recomendações do estudo publicado em 2013 por Zeimet *et al.*<sup>25</sup> e do ARIAD1a o artigo publicado em 2018 por Khalique e colaboradores.<sup>73</sup>

O ensaio para avaliação da expressão do PD-L1 utilizou o *kit PD-L1 IHC 22C3 PharmDx – FDA Approved*. As lâminas foram aquecidas a 60°C e em seguida um procedimento 3 em 1 foi realizado: desparafinização, reidratação e recuperação de antígeno. Esta etapa utilizou a solução *Dako EnVision FLEX Target Retrieval, low pH* (fornecida como solução tamponada baseada em citrato a pH 6,1), no *Dako PT Link* (código Dako PT100). As lâminas foram coradas usando a plataforma *Dako Automated Link 48*. O anticorpo PD-L1, clone 22C3 é “ready-to-use”. O kit de detecção é composto por vários reagentes que são utilizados apenas na detecção do PD-L1 e composto por: *Peroxidase-Blocking Reagent, Negative Control Reagent, Linker, Anti-mouse, Visualization Reagent-HRP, DAB (Chromogen + Substrate Buffer), DAB Enhancer*. O *EnVision FLEX Wash Buffer* foi usado durante os passos de lavagem. Além disso,

o kit utiliza controle celular. No final do processo as lâminas foram contra-cortadas com hematoxilina, enxaguadas em água destilada, desidratadas em etanol e apuradas em xileno.

A intensidade de coloração membranosa das células foi graduada em 1+ (intensidade baixa), 2+ (intensidade moderada) ou 3+ (intensidade forte). Utilizando-se microscópio em baixa ampliação foi certificado que existiam pelo menos 100 células tumorais viáveis na amostra. Em ampliações de 10x, 20x, e 40x, foram observadas todas as áreas tumorais com e sem coloração da membrana celular. Esta etapa do processo, de ampliação múltipla, envolveu: (a) a distinção das células tumorais de células imunes, compostas por linfócitos e macrófagos; (b) determinação das áreas tumorais positivas e negativas; (c) determinação da coloração parcial e completa da membrana  $\geq 1+$ . Foi então calculada a porcentagem de células tumorais e inflamatórias positivas para PD-L1 em relação a todas as células tumorais viáveis presentes na amostra. O tumor foi classificado em uma dentre três categorias de acordo com a expressão de PD-L1 como demonstrado na **Tabela 3**.<sup>74</sup>

**Tabela 3.** Níveis de expressão e padrões de coloração PD-L1.

Nível de Expressão PD-L1	% células expressando PD-L1	Padrão de coloração
Não expressor de PD-L1	< 1	Coloração parcial ou completa ( $\geq 1+$ ) em < 1% das células tumorais
Expressor de PD-L1	1-49	Coloração parcial ou completa ( $\geq 1+$ ) em $\geq 1-49\%$ das células tumorais
Alto expressor de PD-L1	$\geq 50$	Coloração parcial ou completa ( $\geq 1+$ ) em $\geq 50\%$ das células tumorais

PD-L1 – proteína de morte celular programada 1.

### a) Classificação Molecular:

Diferentemente da metodologia *ProMisE*, para a definição da classificação molecular das pacientes, realizamos 3 etapas de sequenciamento genético na seguinte ordem: avaliação da pesquisa de instabilidade de microssatélite (MSI), sequenciamento do gene *POLE* e avaliação da mutação do *TP53*.

#### 1. Pesquisa de instabilidade de microssatélite (MSI):

Realizamos no material parafinado a macrodissecção da área tumoral, utilizando kits de extração de DNA da *Qiagen*, de acordo com protocolos estabelecidos pelo nosso grupo.<sup>75</sup> Foi realizado uma reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando um painel com seis mononucleotídeos quase monomórficos (NR21, NR24, NR27, BAT25, BAT26 e HSP110), sem a necessidade de um DNA de referência.<sup>77</sup> Um par de *primers forward* e *reverse* para cada marcador foi adicionado à reação, sendo que um deles (*forward* ou *reverse*) foi conjugado a moléculas fluorescentes da seguinte forma: NR21 – FAM(6-*carboxyfluorescein*); NR24 – NED (2,7,8-benzo-5-fluoro-2,4,7-trichloro-5-*carboxyfluorescein*); NR27 – VIC (2'-chloro-7'-phenyl-1,4-dichloro-6-*carboxyfluorescein*); BAT25 – VIC (2'-chloro-7'-phenyl-1,4-dichloro-6-*carboxyfluorescein*); BAT26 – FAM(6-*carboxyfluorescein*); HSP110 – PET® (ThermoFisher). Utilizamos o kit da *Qiagen Multiplex PCR*, com 0,5 µl de DNA a 50 ng/µl. Foram realizadas termociclagens sucessivas com as seguintes temperaturas: 95°C, 55°C e 72°C.<sup>76</sup>

A presença de dois ou mais marcadores com instabilidade classificou a amostra como instabilidade de microssatélite alta (MSI-H). A presença de um marcador com instabilidade determinou a amostra como instabilidade de microssatélite baixa (MSI-L). Nenhum marcador com instabilidade definiu a amostra como estável (MSS).<sup>77</sup>

#### 2. Sequenciamento do gene *POLE*

Para a análise das variantes no gene *POLE* (domínio de exonuclease – éxons 9, 10, 11, 12, 13 e 14), utilizamos o sequenciamento direto de Sanger como descrito por Briton *et al* em 2019.<sup>78</sup> O sequenciamento restringe-se a estes 6 éxons por se tratar de região *hotspot* patogênica.<sup>79</sup> O DNA tumoral foi extraído dos blocos fixados previamente em parafina utilizando o kit de extração da *Qiagen*. Para determinar o status somático da mutação, DNA normal foi também extraído dos blocos de parafina de tecido não tumoral local. A sequência

dos *primers* utilizados, assim como as condições de ciclagem e o tamanho dos fragmentos gerados, estão descritos na **Tabela 4**.

Inicialmente, amplificamos cada região de interesse com a reação em cadeia da polimerase (PCR), com um volume final de 15  $\mu\text{L}$  para cada amostra, sendo: 5,6  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  Milli-Q, 7,2  $\mu\text{L}$  de HotStarTaq Master Mix (*Qiagen*), 0,6  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (5 mM, *Invitrogen*), 0,3  $\mu\text{L}$  de *primers forward* e *reverse* (10  $\mu\text{M}$ , *Sigma-Aldrich*) e 1,0  $\mu\text{L}$  de DNA a 50 ng/ $\mu\text{L}$ . Para confirmação de amplificação da região de interesse, realizou-se eletroforese em gel de agarose a 2,0%, por 30 minutos a 120 volts. Posteriormente, purificou-se 7,0  $\mu\text{L}$  do produto de PCR com 3,0  $\mu\text{L}$  de *ExoSAP-IT* (*Thermo Fisher Scientific*) durante 15 minutos a 37°C, seguido de 30 minutos a 80°C para inativação enzimática. Para a reação de sequenciamento, utilizou-se 0,5  $\mu\text{L}$  de *BigDye Terminator v3.1 Ready Mix* (*Applied Biosystems*), 2,0  $\mu\text{L}$  de *BigDye Terminator v3.1 Sequencing Buffer* (*Applied Biosystems*) e 1,0  $\mu\text{L}$  dos *primers* M13 universais *forward* e *reverse* (3,2  $\mu\text{M}$ , *Sigma-Aldrich*). As condições para a reação de sequenciamento consistiram em 30 ciclos de dez segundos a 96°C, cinco segundos a 50°C e quatro minutos a 60°C. Em seguida, a reação de sequenciamento foi novamente purificada com a adição de 35  $\mu\text{L}$  de *SAM Solution* (*Applied Biosystems*) e 10  $\mu\text{L}$  de *Xtterminator Solution* (*Applied Biosystems*), seguido de agitação a 1500 rpm por 30 minutos e posterior centrifugação a 2000 rpm por dois minutos. As amostras purificadas foram submetidas à eletroforese capilar no sequenciador *3500XL Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*) e os resultados analisados com o auxílio do software *SeqScape v2.7* (*Applied Biosystems*).

**Tabela 4.** Sequência dos primers utilizados para amplificação do gene *POLE* (éxons 9, 10, 11, 12, 13 e 14) e condições para realização do sequenciamento.

Gene	Sequência dos <i>primers</i>	Fragmento	Ciclagem
<i>POLE</i> (Éxon 09)	<b>Forward</b> 5'- TGTA AACGACGGCCAGTTGGGGAGTTTAGAGCTTGGC -3'	223 pb	96°C – 15 min
			96°C – 45 seg
	<b>Reverse</b> 5'- CAGGAAACAGCTATGACCTCCCAGGAGCTTACTTCCCA -3'		58°C – 45 seg
			72°C – 45 seg
		72°C – 10 min	
<i>POLE</i> (Éxon 10)	<b>Forward</b> 5'- TGTA AACGACGGCCAGTCTGACTTGTGCTGATTGCTAATG -3'	241 pb	96°C – 15 min
			96°C – 45 seg
	<b>Reverse</b>		58°C – 45 seg

	5'- CAGGAAACAGCTATGACAGATCCACATGTCCGTTCTTC -3'		72°C – 45 seg	
			72°C – 10 min	
	<b>Forward</b>		96°C – 15 min	
<b>POLE</b>	5'- TGTA AACGACGGCCAGTACTGCTGTGACTTGGGTTCA -3'		96°C – 45 seg	
<b>(Éxon 11)</b>	<b>Reverse</b>	174 pb	58°C – 45 seg	40x
	5'- CAGGAAACAGCTATGACCCAGTTACTCATAGAGAAGACACAG A -3'		72°C – 45 seg	
			72°C – 10 min	
	<b>Forward</b>		96°C – 15 min	
<b>POLE</b>	5'- TGTA AACGACGGCCAGTTGTCTGTCTCTTTCCAACC -3'		96°C – 45 seg	
<b>(Éxon 12)</b>	<b>Reverse</b>	197 pb	58°C – 45 seg	40x
	5'- CAGGAAACAGCTATGACCCTGCTCTGTGGCCCTAC -3'		72°C – 45 seg	
			72°C – 10 min	
	<b>Forward</b>		96°C – 15 min	
<b>POLE</b>	5'- TGTA AACGACGGCCAGTTCTGTTCTCATTCTCCTCCAG -3'		96°C – 45 seg	
<b>(Éxon 13)</b>	<b>Reverse</b>	210 pb	58°C – 45 seg	40x
	5'- CAGGAAACAGCTATGACCCGGGATGTGGCTTACGTG -3'		72°C – 45 seg	
			72°C – 10 min	
	<b>Forward</b>		96°C – 15 min	
<b>POLE</b>	5'- TGTA AACGACGGCCAGTGACCCTGGGCTCTTGATTTT -3'		96°C – 45 seg	
<b>(Éxon 14)</b>	<b>Reverse</b>	242 pb	58°C – 45 seg	40x
	5'- CAGGAAACAGCTAGACCTGAGGAGGCCAGGGTG -3'		72°C – 45 seg	
			72°C – 10 min	

pb: pares de base; min – minutos; seg – segundos.

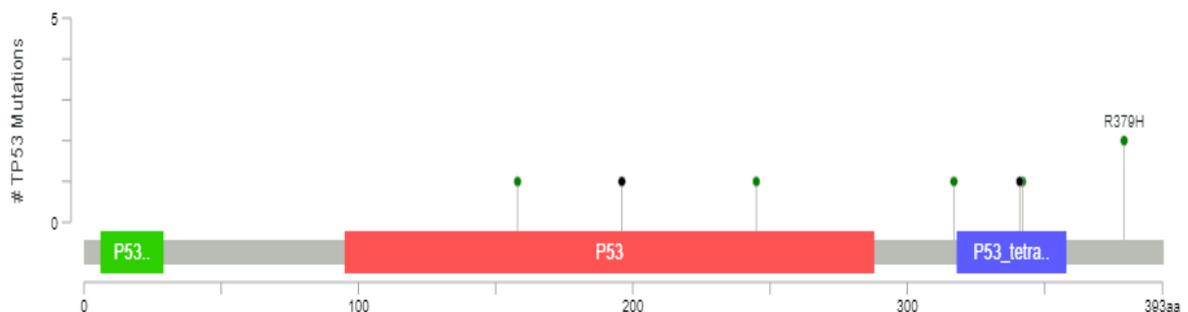
### 3. Sequenciamento do gene *TP53*

O DNA das amostras foi obtido a partir da macrodissecção da área tumoral selecionada por um patologista experiente, garantindo > 60% das células tumorais e <20% de necrose. Utilizamos o kit *QIAamp DNA Micro (Qiagen)* de acordo com as instruções do fabricante. A qualidade do DNA foi verificada no *NanoDrop 2000 UV-Vis Espectrofotômetro (Thermo Fisher Scientific)* e a concentração no *Qubit Fluorometric Quantitation (Thermo Fisher Scientific)* seguido de armazenamento a -20°C até a análise molecular.

A integridade das amostras foi testada através da reação de PCR multiplex para o gene *GAPDH* que gera produtos amplificados de diferentes tamanhos: 100, 200, 300 e 400 pares de bases. Essa análise prévia direcionou a seleção de amostras com o tamanho mínimo dos fragmentos necessários para amplificar as bibliotecas de sequenciamento. A análise de mutação baseada em NGS foi realizada usando o *Illumina TruSight Tumor 15 (TST15)* no instrumento *MiSeq* de acordo com as instruções do fabricante (*Illumina*). O painel de sequenciamento *TST15* avalia 15 genes que são comumente mutados em tumores sólidos (*AKT1, GNA11, NRAS, BRAF, GNAQ, PDGFRA, EGFR, KIT, PIK3CA, ERBB2, KRAS, RET, FOXL2, MET, TP53*). O presente estudo analisou apenas o gene *TP53* devido sua relevância clínica na subclassificação do câncer endometrial. O alinhamento de leitura e a chamada de variantes foram realizados com *BaseSpace BWA Enrichment (Illumina)* e software *Sophia DDM® versão 5.7.3 (Sophia Genetics SA, Suíça)*. A identificação de variantes patogênicas ocorreu após a aplicação de filtros para remover variantes de baixa qualidade. Inicialmente, as variantes com profundidade de leitura <500 vezes e VAF <10% foram filtradas. Em seguida, variantes intrônicas, intergênicas, 3' UTR e sinônimas foram excluídas. A partir destes resultados, foram retiradas as variantes que se apresentavam com polimorfismos em frequência maior que 1% na base de dados *GnomAD* (aquelas que não possuíam informação de frequência populacional seguiram nas análises). Finalmente, as variantes restantes foram verificadas nas bases de dados (*ClinVar, IARC TP53, COSMIC e CGI*) quanto à sua patogenicidade.<sup>80, 81</sup>

Após a filtragem, um total de 8 variantes foram retidas no gene *TP53*. Elas foram classificadas como altamente e potencialmente patogênicas de acordo com Sophia DDM.

**(Figura 1)**



**Figura 1.** Localização das mutações na sequência do gene *TP53* no câncer endometrial

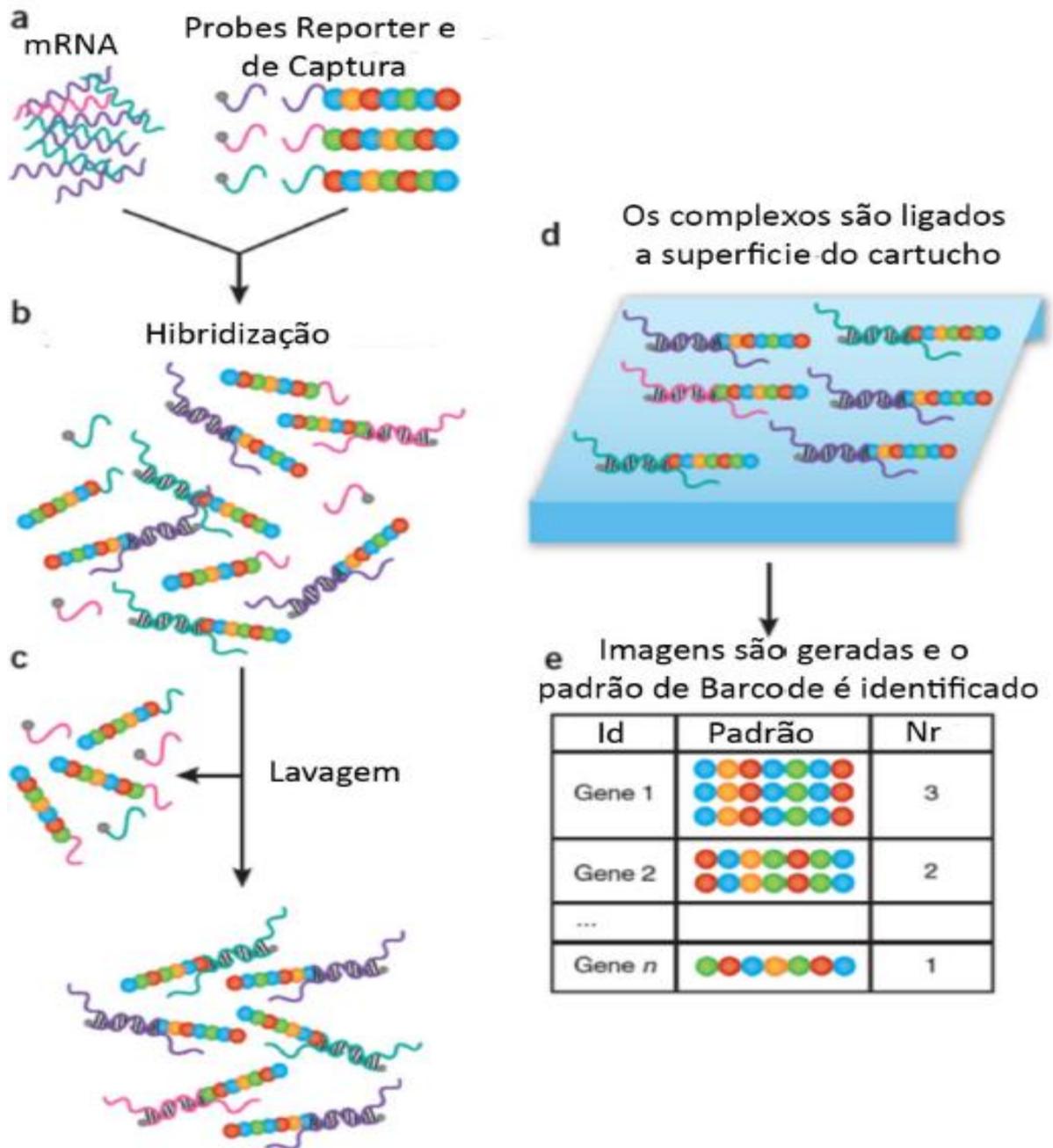
### b) NanoString

A metodologia *NanoString* (*NanoString Technologies*) se baseia em um dispositivo automatizado que requer pouco tempo dispensado às atividades de bancada podendo processar até 12 amostras distintas simultaneamente. De acordo com o painel escolhido, pode-se avaliar os níveis de expressão de centenas de genes (*NanoString Technologies*). Ela é composta por 3 etapas principais: hibridização; purificação e imobilização; contagem e análise.<sup>82</sup> (Figura 2)



**Figura 2.** Esquema ilustrativo das 3 etapas principais da técnica *Nanostring*.

Este sistema captura e conta um código baseado em combinações de 4 cores (color-code ou *barcode*), correspondendo cada combinação a um gene distinto, conforme demonstrado na figura 3.<sup>82</sup> Cada *probe* específico possui uma sequência de pares de bases complementares ao alvo de interesse (RNA no nosso estudo) e *barcodes* moleculares fluorescentes únicos. O processo de ligação da *probe* ao alvo de interesse chama-se hibridização, sendo que a *probe* que carrega o *barcode* é chamada de *Reporter*. Uma segunda *probe* conhecida como *Capture* contém biotinas que permitem que estes complexos (RNA + *probes*) sejam imobilizados no cartucho para avaliação dos dados. (Figura 3a e 3b)



**Figura 3.** Esquema ilustrativo dos barcodes moleculares (sonda de captura específica e sonda reporter codificada por cores) determinando correlação com gene específico.

O painel escolhido foi o *nCounter® PanCancer Pathways*, que conta com a avaliação de 770 genes envolvidos em 13 vias de sinalização celular e sabidamente conhecidas por seu envolvimento na patogênese de diferentes tipos de tumores tais como *MAPK*, *RAS*, *Notch*, *Wnt*, *Hedgehog*, *PI3K* entre outras ([www.nanostring.com/pancancer](http://www.nanostring.com/pancancer)).<sup>51</sup> A escolha deste painel baseou-se no fato que a análise da expressão gênica de diferentes vias de sinalização

permite identificar alterações em grupos distintos conforme o nosso estudo (recidiva *versus* não-recidiva).



**Figura 4.** Vias de sinalização celular avaliadas pela metodologia *Nanostring*.

Uma lâmina de hematoxilina-eosina (HE) de cada uma das 51 amostras usadas para esta etapa do projeto (17 recidivas e 34 não-recidivas) foi avaliada pelos patologistas (VD e GM) para demarcação da área tumoral. A partir disso, três lâminas de 10  $\mu\text{m}$  foram confeccionadas no departamento de patologia e as áreas marcadas foram raspadas manualmente para extração do RNA das amostras.

De acordo com o protocolo do kit *Recover All Total Nucleic Acido Isolation (Ambion by Life Technologies, Austin, TX, USA)*, são necessárias 6 etapas para extração do RNA das amostras: desparafinização; digestão/lise celular; purificação/isolamento; separação do RNA do DNA; quantificação do RNA; diluição do RNA.

- **Desparafinização:** foram realizados dois banhos com 1 ml de Xilol 100% intercalados com incubação em termobloco por 3 minutos a 50°C seguido por centrifugação (14000 rpm/5 minutos) obtendo o *pellet* de células; em seguida, remoção do Xilol por meio de dois banhos com 1 ml de Álcool 100% seguido de centrifugação (14000 rpm/5 minutos); após remoção do sobrenadante, o *pellet* de células foi submetido a secagem a vácuo no *SpeedVac Concentrator (Thermo Scientific, Asheville, NC, USA)* a 45°C por 10 minutos.

- **Digestão/Lise Celular:** foram adicionados 4 µl de protease e 200 µl de tampão de digestão sendo incubados por 3 horas a 50°C seguido por inativação da protease com elevação da temperatura até 80°C por um período de 15 minutos.
- **Purificação/Isolamento:** foram utilizadas colunas de sílica com afinidade para ácido ribonucleico sendo realizadas duas passagens sucessivas do lisado adicionado com solução tampão (550 µl de etanol 100% (*Merck*) + 240 µl de aditivo de isolamento = 790 µl de solução), seguido de duas lavagens com 700 µl de *Wash 1* seguido de centrifugação (10000 rpm/30 segundos) e com 700 µl de *Wash 2* seguido de centrifugação (10000 rpm/30 segundos).
- **Separação do RNA do DNA:** foi adicionada a enzima DNase para degradação do DNA da amostra (4 µl enzima DNase + 6 µl de 10x DNA *buffer* 50 µl de água nuclease *free*) e incubadas por um período de 30 minutos em temperatura ambiente com lavagens sucessivas sequenciais (solução *Wash 1* uma vez; solução *Wash 2* duas vezes); acrescentado então 30 µl de água livre de RNAs para eluição da amostra que foi incubada por 1 minuto em temperatura ambiente seguido por centrifugação (14000 rpm/1 minuto).
- **Quantificação do RNA:** a quantificação foi realizada tanto por *NanoDrop* ND-200 espectrofotômetro (*NanoDrop Products, Wilmington, DE, USA*), quanto com *Qubit Fluorometric Quantitation*.
- **Diluição do RNA:** soluções padrões de 20 ng/µl em 5 µl de volume final foram feitas, utilizando-se as concentrações obtidas por *Qubit Fluorometric Quantitation*.

Iniciou-se então a fase de hibridização com duração de 21 horas a 65°C. O protocolo do kit *nCounter Gene Expression 12 Assays* determina a adição de 130 µl do *buffer* de hibridização em um microtubo que contém a sonda *Reporter* fornecida pelo kit. Em seguida, 20 µl deste *master mix* é adicionado em um microtubo e na sequência adiciona-se 5 µl de RNA total e 5 µl da sonda *Capture*.

Completada as 21 horas da hibridização, as amostras foram transferidas para a *PrepStation*, uma estação automatizada que purifica e prepara os cartuchos (*nCounter® Cartridge*), sendo removidos os excessos de *probes* e alinhados/imobilizados os complexos *probes*/alvos. Estes cartuchos são revestidos por estreptavidina que se liga à biotina das

*probes* de captura permitindo sua contagem digital. Esta etapa teve duração de 3 horas e 30 minutos.

A última etapa consistiu na contagem e análise dos cartuchos acima descritos. Este procedimento ocorre na *nCounter Digital Analyzer (NanoString Technologies)* que realiza a leitura de 280 até 555 campos de visão (FOVs) para cada amostra de acordo com o padrão de fluorescência determinado pelos *barcodes* na superfície dos cartuchos.

## 5 ANÁLISE ESTATÍSTICA E DE BIOINFORMÁTICA

Os dados coletados na ficha previamente definida e padronizada (*Plataforma REDCap*)<sup>69</sup> foram tabulados no programa *SPSS 21.0 for Windows*®.

A estatística descritiva foi utilizada para a caracterização da amostra. As variáveis quantitativas foram descritas através de média e desvio padrão ou mediana e valores mínimo e máximo, conforme sua distribuição. As variáveis qualitativas foram descritas através de frequências absolutas e relativas. A análise estatística para comparações entre grupos utilizou o *Teste de McNemar* para as amostras não paramétricas.<sup>83</sup> Para variáveis categóricas, o *Teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher* foi usado para comparar as proporções entre grupos.<sup>84</sup> A análise univariada dos fatores prognósticos do estudo caso-controle com características clínicas e anatomopatológicas utilizou o *Teste U de Mann-Whitney* ou o *Teste Exato de Fisher*. Os parâmetros com  $p < 0,2$  na análise univariada foram inseridos na análise de regressão logística e modelos de regressão logística *backward stepwise* foram construídos na avaliação dos fatores prognósticos dessa avaliação.<sup>85</sup>

Para a comparação dos itens de revisão do anátomo-patológico foi utilizado o *valor kappa de Cohen* e para interpretar este valor a escala proposta por *Landis e Koch*.<sup>86</sup>

Análise do modelo de regressão multivariada de *Cox* foi utilizada com o objetivo de interpretar informações prognósticas que podiam complementar a classificação molecular (idade, IMC, subtipo histológico, grau histológico, invasão miometrial, ILV).<sup>87</sup>

O nível de significância adotado nos passos acima foi de 5%.

A avaliação dos dados relacionados à expressão do RNA tumoral utilizando o *NanoString nCounter™* foi realizada através do programa *nSolverAnalysis Software v4.0®* (*NanoString Technologies*), o qual permite uma avaliação de vários parâmetros técnicos de qualidade da corrida como controles positivos, densidade de ligação e limite de detecção.

Os dados foram normalizados e analisados no ambiente estatístico-matemático R (*R-project* (v3.6.3); *The R Foundation*, Viena, Áustria). Previamente foi utilizado *Quantro package* (v1.18.0) no ambiente R para uma avaliação interna dos cartuchos analisados (5 cartuchos no total) para auxiliar na escolha do método de normalização.<sup>88</sup> A normalização dos dados tem como objetivo corrigir possíveis variações experimentais das amostras como eficiência da hibridização, purificação ou ligação. Os arquivos em formato *RCC* foram convertidos para o formato *xlsx* e importados na plataforma *Galaxy-HCB*, uma versão customizada e de fácil

acesso da ferramenta *NanostringNorm* (v1.2.1.1).<sup>89</sup> O objetivo desta ferramenta é a avaliação dos controles positivos e negativos da reação e também a normalização e análise da expressão diferencial dos dados.

A inspeção dos controles positivos e negativos foi realizada por meio da relação entre as contagens observadas em escala  $\log_2$  pela concentração esperada em  $\log_2$  ( $fM$ ) dos mesmos. Os dados de expressão gênica foram normalizados pelo método quantil implementado no pacote *NanoStringNorm* e transformados em escala de  $\log_2$ . A expressão diferencial avaliou a diferença de expressão dos RNAs para grupos distintos (no presente estudo recidivas de câncer de endométrio de risco baixo e intermediário e não-recidivas com o mesmo diagnóstico). Para a construção dos *heatmaps* com os genes diferencialmente expressos foi utilizado o pacote *ComplexHeatmap* (v2.0.0) (<http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/ComplexHeatmap.html>) dentro do ambiente R através da correlação de *Pearson*.<sup>90</sup>

As análises estatísticas utilizaram o *Teste t* com nível de significância de  $p \leq 0.01$  e *Fold change* de 2.0 (quantas vezes o gene está expresso em relação ao outro grupo amostral comparado no estudo). Os resultados para todos os genes foram disponibilizados em formato *Volcano plot*.

Após a detecção dos genes com alta ou baixa expressão dos seus respectivos RNAs, avaliamos através da Curva *ROC* a sensibilidade e especificidade deles comparando com o risco de recidiva ou não na população estudada. Definimos o maior valor de sensibilidade e especificidade simultâneos na definição da Curva *ROC*. Esta ferramenta estatística auxilia na quantificação do poder discriminatório de um teste ou biomarcador, sendo considerado aceitável uma AUC acima de 0,7 para diferenciação entre dois grupos.<sup>91,92</sup> Utilizamos o pacote *ROC R 1.0-11* para a análise das curvas *ROC* individuais e o pacote *EPI 2.40* para a análise das curvas *ROC* em conjunto.

## 6 RESULTADOS

Entre janeiro de 2009 a dezembro de 2014, 195 pacientes com diagnóstico de carcinoma de endométrio de risco baixo e intermediário foram operadas no Hospital do Câncer de Barretos.

A idade média ao diagnóstico foi de 61,1 anos (31,0 a 88,0). O tempo médio decorrido entre o diagnóstico realizado na cidade de origem e a primeira consulta no hospital oncológico terciário foi de 48,6 dias (7,0 a 195,0).

Na **Tabela 5** descrevemos as características demográficas da população em estudo. 145 pacientes (74,4%) apresentavam diagnóstico estágio IA e mais de 95% das pacientes tinham ECOG 0 ou 1. Como é característica do câncer de endométrio, sobretudo o subtipo endometrióide, mais da metade das pacientes apresentavam algum grau de obesidade (57,4%). Além disso, 129 pacientes (66,2%) apresentavam diagnóstico de HAS e 47 pacientes (24,1%) de DM. A imensa maioria das pacientes já se encontravam em menopausa no momento do diagnóstico (85,1%).

O valor médio do CA-125, um marcador tumoral epitelial sanguíneo muito utilizado no acompanhamento do tratamento dos tumores ginecológicos, sobretudo no câncer de ovário e endométrio, no momento do diagnóstico foi 29,57 U/ml (1,10 a 615,2). Em até 60 dias após o procedimento cirúrgico, os valores caíram em média para 12,06 U/ml (3,12 a 90,7).

**Tabela 5.** Características clínicas da população.

Variável	Categoria	N	%
<b>Estádio</b>	IA	145	74,4
	IB	50	25,6
<b>ECOG</b>	0	75	38,5
	1	109	55,9
	2	11	5,6
<b>Raça</b>	Branca	147	75,4
	Negra	8	4,1
	Parda	40	20,5

<b>IMC (Kg/m<sup>2</sup>)</b>	Normal (18.5-24.99)	28	14,4
	Sobrepeso (25.0-29.99)	53	27,2
	Obesidade I (30.0-34.99)	49	25,1
	Obesidade II (35.0-39.99)	28	14,4
	Obesidade III ( $\geq 40.0$ )	35	17,9
	ND	2	1,0
<b>Paridade</b>	Não	23	11,8
	Sim	170	87,2
	ND	2	1,0
<b>Tabagismo</b>	Fumante	21	10,8
	Ex-fumante	9	4,6
	Nunca fumou	165	84,6
<b>Comorbidades</b>	HAS	129	66,2
	DM	47	24,1
	Obesidade	112	57,4
	Outras	80	41,0
<b>Status Hormonal</b>	Menacme	28	14,4
	Menopausa	166	85,1
	ND	1	0,5

ECOG – Escala de desempenho (*Eastern Cooperative Oncology Group*); IMC – Índice de Massa C3rporosa; Kg – kilograma; m<sup>2</sup> – metro quadrado; HAS – hipertens3o arterial; DM – diabetes mellitus; ND – n3o dispon3vel.

As **Tabelas 6 e 7** descrevem as caracter3sticas cir3rgicas e an3tomo-patol3gicas. Como a inclus3o das pacientes ocorreu entre os anos de 2009 e 2014, h3 uma n3tida curva de aprendizado das t3cnicas minimamente invasivas, sendo que a laparoscopia representou pouco mais de 65% dos casos nesta s3rie. Do ponto de vista an3tomo-patol3gico, 62,1% das pacientes apresentavam grau 1, 13,8% das pacientes apresentavam invas3o da endoc3rvice e mais de 90% dos casos tinham componente endometri3ide t3pico. O tamanho tumoral m3dio foi de 4,7 cm (0,1 a 11,5 cm) e o n3mero m3dio de linfonodos ressecados foi de 19 linfonodos

(2 a 56), sendo que 45 pacientes (23,1%) foram submetidas a linfadenectomia pélvica e 47 pacientes (24,1%) a linfadenectomia pélvica e para-aórtica.

**Tabela 6.** Características cirúrgicas da amostra.

Variável	Categoria	N	%
Tipo de Cirurgia	HTA + SOOB	94	48,2
	HTA + SOOB + LND pélvica	45	23,1
	HTA + SOOB + LND pélvica + retroperitoneal	47	24,1
	HTA + SOOB + PLS	4	2,1
	HTA	5	2,6
Via de Acesso	Laparotômica	55	28,2
	Laparoscópica	129	66,2
	Vaginal	11	5,6

HTA – histerectomia total; HTA + SOOB – Histerectomia total + salpingooforectomia bilateral; HTA + SOOB + LND – Histerectomia total + salpingooforectomia bilateral + linfadenectomia; HTA + SOOB + PLS – Histerectomia total + salpingooforectomia bilateral + pesquisa do linfonodo sentinela.

**Tabela 7.** Características anatomopatológicas dos espécimes.

Variável	Categoria	N	%
Localização do tumor	Fundo uterino	148	75,9
	Segmento uterino inferior	7	3,6
	Fundo + segmento uterino inferior	40	20,5
Grau histológico	Grau 1	121	62,1
	Grau 2	70	35,8
	Grau 3	4	2,1
Invasão endocérvice	Não	168	86,2
	Sim	27	13,8
Característica Morfológica	Endometrióide	180	92,3
	Endometrióide + diferenciação escamosa	14	7,2
	Outro	1	0,5

Invasão linfocascular	Não	173	88,7
	Sim	22	11,3

Avaliando o tratamento adjuvante, 72,3% das pacientes receberam radioterapia, sendo que 91,5% dos casos receberam HDR exclusiva, corroborando o perfil de risco baixo e intermediário da população em estudo. O tempo médio para início da radioterapia foi de 68,82 dias (20 a 237) contados a partir da data do procedimento cirúrgico.

**Tabela 8.** Características do tratamento de radioterapia adjuvante.

Variável	Categoria	N	%
Tratamento Adjuvante	Não	54	27,7
	Sim	141	72,3
Tipo de tratamento	HDR	129	91,5
	Radioterapia externa + HDR	10	7,1
	Radioterapia externa	2	1,4

HDR – braquiterapia de alta taxa de dose.

Das 195 pacientes avaliadas, 22 (11,3%) apresentaram recidiva (o *follow-up* de todas as pacientes foi atualizado em meados de 2019). O sítio mais prevalente de recidiva foi o pulmão com 7 casos (23,3%) seguido da cúpula vaginal com 5 casos (16,7%), como demonstrado na **Tabela 9**. Uma mesma paciente pode ter apresentado mais de um sítio de recidiva, justificando 30 sítios em 22 pacientes avaliadas. O valor médio do CA-125 na recidiva foi 196,27 U/ml (5,50 a 1636,0).

A maioria das pacientes recebeu quimioterapia como tratamento paliativo (37,9%), porém por se tratar de carcinoma endometrióide, 6 pacientes (20,8%) receberam hormonioterapia no manejo das metástases. A mesma paciente pode ter recebido duas modalidades terapêuticas concomitantes e/ou sequenciais, justificando 29 abordagens terapêuticas nesta população. (**Tabela 9**)

**Tabela 9.** Características dos sítios de recidiva da população.

Variável	Categoria	N	%
Recidiva	Não	173	88,7

	Sim	22	11,3
Local da recidiva	Pulmão	7	23,3
	Vaginal	5	16,7
	Linfonodos pélvicos	4	13,3
	Linfonodos retroperitoneais	4	13,3
	Peritônio	4	13,3
	Pélvica	4	13,3
	Mediastino	1	3,4
	Fígado	1	3,4
	Tratamento da recidiva	Quimioterapia	11
Hormonioterapia		6	20,8
Radioterapia		5	17,2
Cirurgia		5	17,2
Cuidados paliativos		2	6,9

Após um follow-up mediano de 6,38 anos (0,4-10,88), 175 pacientes (89,7%) permanecem vivas, sendo que 11 destas (6,3%) seguem em tratamento da recidiva do câncer de endométrio, conforme demonstrado na **Tabela 10**. Vinte pacientes faleceram (10,3%), sendo 11 (5,6%) em decorrência da progressão do câncer de endométrio e 9 (4,7%) de várias causas não relacionadas a esta neoplasia (3 Sepse; 2 IAM; 1 Esclerose Múltipla; 1 Câncer de Cólon; 1 Câncer de Estômago).

**Tabela 10.** Status atual das pacientes.

Variável	Categoria	N	%
Vivo	Total	175	89,7
	Sem doença	164	84,1
	Com doença	11	5,6
Morte	Total	20	10,3

Doença relacionada	11	5,6
Causas diversas	9	4,7

Ainda sem um *follow-up* atualizado (realizado em meados de 2019), realizamos um estudo caso-controle com os dados clínico-patológicos das pacientes. À época, tínhamos 21 pacientes com recidiva e escolhemos 3 controles pareados por idade e estadiamento para cada uma destas pacientes. Análise univariada das variáveis em estudo está sumarizada na

**Tabela 11.**

**Tabela 11.** Análise univariada para avaliação do risco de recorrência.

Variáveis		Casos (n=21)	Controles (n=63)	Valor p
Idade (mediana, min-max) <sup>a</sup>		64 (46-77)	64 (46-78)	0,873
Estadiamento FIGO (%) <sup>b</sup>	IA	14 (66,7)	42 (66,7)	>0,99
	IB	7 (33,3)	21 (33,3)	
ECOG Performance Status(%) <sup>b</sup>	0-1	20 (95,2)	61 (96,8)	>0,99
	2	1 (4,8)	2 (3,2)	
Etnia (%) <sup>b</sup>	Branco	18 (85,7)	45 (71,4)	0,251
	Outros	3 (14,3)	18 (28,6)	
IMC (mediana, min-max) <sup>a</sup>		31,64 (19,78-48,62)	32,65 (21,93-52,71)	0,339
Tabagismo (%) <sup>b</sup>	Sim	2 (9,5)	4 (6,3)	0,637
	Não	19 (90,5)	59 (93,7)	
Menopausa (%) <sup>b</sup>	Sim	21	56 (88,8)	0,184
	Não	0	7 (11,2)	
Gravidezes (mediana, min-max) <sup>a</sup>		4 (1-7)	4 (1-20)	0,725
Grau histológico (%) <sup>b</sup>	Grau 1	9 (42,9)	44 (69,8)	<b>0,037</b>
	Grau 2 ou 3	12 (57,1)	19 (30,2)	
Característica Morfológica (%) <sup>b</sup>	Endometrióide	15 (71,4)	60 (95,2)	<b>0,007</b>
	Endometrióide com diferenciação escamosa	6 (28,6)	3 (4,8)	
Tamanho (mediana, min-max) <sup>a</sup>		4.0 (16,0-115,0)	4.0 (1.0-105,0)	0,597
Localização do tumor (%) <sup>b</sup>	Corpo uterino	14 (66,7)	47 (74,6)	0,574
	Segmento uterino inferior	7 (33,3)	16 (25,4)	
Invasão endocervical (%) <sup>b</sup>	Sim	6 (28,6)	8 (12,7)	<b>0,103</b>
	Não	15 (71,4)	55 (87,3)	
ILV (%) <sup>b</sup>	Sim	5 (23,8)	9 (14,3)	0,324
	Não	16 (76,2)	54 (85,7)	

HDR – Braquiterapia de alta taxa de dose; HTA + SOOB – Histerectomia total + salpingooforectomia bilateral; IMC – Índice de massa corpórea; ECOG – Escala de desempenho (*Eastern Cooperative Oncology Group*); FIGO – Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia; ILV – invasão linfovascular; IMC – Índice de massa corpórea; min – mínimo; max – máximo.

<sup>a</sup> – Teste Mann-Whitney; <sup>b</sup> – Teste Exato de Fisher.

Todas as variáveis que apresentaram um  $p < 0,2$  participaram da análise multivariada de regressão logística: grau histológico, característica morfológica e invasão endocervical

(menopausa foi retirada pois um dos grupos não tinha representante). Utilizando a técnica *backward stepwise* de regressão logística, o seguinte modelo foi construído. **(Tabela 12)**

**Tabela 12.** Análise multivariada para avaliação de risco de recorrência.

Variáveis		Odds Ratio (IC – 95%)	Valor p
Grau histológico	Grau 1	1	0,080
	Grau 2 ou 3	2.66 (0,89–7,96)	
Característica Morfológica	Endometrióide	1	0,031
	Endometrióide com diferenciação escamosa	5.65 (1,17–27,17)	
Invasão endocervical	Não	1	0,168
	Sim	2.55 (0,67–9,66)	

Constant= -1.939 ( $P = 0.0001$ )

Das três variáveis acima avaliadas, apenas a característica morfológica foi estatisticamente significativo ( $p: 0,031$ ), demonstrando que a chance de recidiva para pacientes com câncer de endométrio endometrióide de risco baixo e intermediário com diferenciação escamosa é 5,6 vezes superior quando comparado com pacientes com câncer de endométrio endometrióide de risco baixo e intermediário.<sup>93</sup>

### 6.1 Resultados Estudo 1 – Reavaliação anátomo-patológica

Dos 195 casos revisados por dois patologistas especialistas em oncoginecologia, 15 foram excluídos desta análise: 9 devido ausência de tumor nas lâminas avaliadas; 5 tiveram resultado de hiperplasia atípica; 1 paciente foi definida como pólipos endometrial.

A grande maioria das pacientes eram estágio IA (74,4%), com idade mediana ao diagnóstico de 61 anos. Como esperado na população com câncer de endométrio, a mediana do IMC foi de 32,8. Após um follow-up mediano de 6.38 anos (0,4-10,88), 22 pacientes apresentaram recidiva. **(Tabela 13)**

**Tabela 13.** Características clínicas e demográficas das pacientes.

Variáveis <sup>&amp;</sup>		Casos (n=195)
Idade (mediana, min-max) <sup>a</sup>		61 (31-88)
Estadiamento FIGO (%) <sup>b</sup>	IA	145 (74,4)
	IB	50 (25,6)
ECOG Performance Status (%) <sup>b</sup>	0-1	184 (94,4)
	2	11 (5,6)
Etnia (%) <sup>b</sup>	Branco	147 (75,4)
	Outros	48 (24,6)
IMC (mediana, min-max) <sup>a</sup>		32,8 (18,7-62,8)
Tabagismo (%) <sup>b</sup>	Sim	30 (18,2)
	Não	165 (81,8)

Menopausa (%) <sup>b</sup>	Sim	166 (85,1)
	Não	29 (14,9)
Tamanho mm (median, min-max) <sup>a</sup>		40
		(1-115)
Grau histológico (%) <sup>b</sup>	Grau 1	121 (62,1)
	Grau 2	70 (35,9)
	Grau 3	4 (2,0)
Característica Morfológica (%) <sup>b</sup>	Endometrióide	181 (92,8)
	Endometrióide com diferenciação escamosa	14 (7,2)
Localização do tumor (%) <sup>b</sup>	Corpo uterino	148 (75,9)
	Segmento uterino inferior	47 (24,1)
Invasão endocervical (%) <sup>b</sup>	Sim	27 (13,9)
	Não	168 (86,1)
ILV (%) <sup>b</sup>	Sim	22 (11,3)
	Não	173 (88,7)
Cirurgia (%) <sup>b</sup>	HTA + SOOB	94 (48,2)
	HTA + SOOB + linfadenectomia pélvica	45 (23,1)
	HTA + SOOB + linfadenectomia pélvica e para-aórtica	47 (24,1)
	HTA + SOOB + pesquisa linfonodo sentinela	4 (2,0)
	Histerectomia simples	5 (2,6)
	Laparotomia	55 (28,2)
Via de acesso cirúrgico (%) <sup>b</sup>	Laparoscopia	129 (66,2)
	Vaginal	11 (5,6)
	Não	54 (27,7)
Radioterapia adjuvante (%) <sup>b</sup>	HDR	129 (66,2)
	Radioterapia pélvica externa	2 (1,0)
	HDR + Radioterapia pélvica externa	10 (5,1)
Recorrência (%) <sup>b</sup>	Sim	22 (11,3%)
	No	173 (88,7%)

HDR – Braquiterapia de alta taxa de dose; HTA + SOOB – Histerectomia total + salpingooforectomia bilateral; IMC – Índice de massa corpórea; ECOG – Escala de desempenho (*Eastern Cooperative Oncology Group*); FIGO – Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia; ILV – invasão linfovascular; IMC – Índice de massa corpórea; min – mínimo; max – máximo.

<sup>a</sup> – Teste Mann-Whitney; <sup>b</sup> – Teste Exato de Fisher; & – Todos os resultados relacionados ao diagnóstico inicial sem revisão do especialista

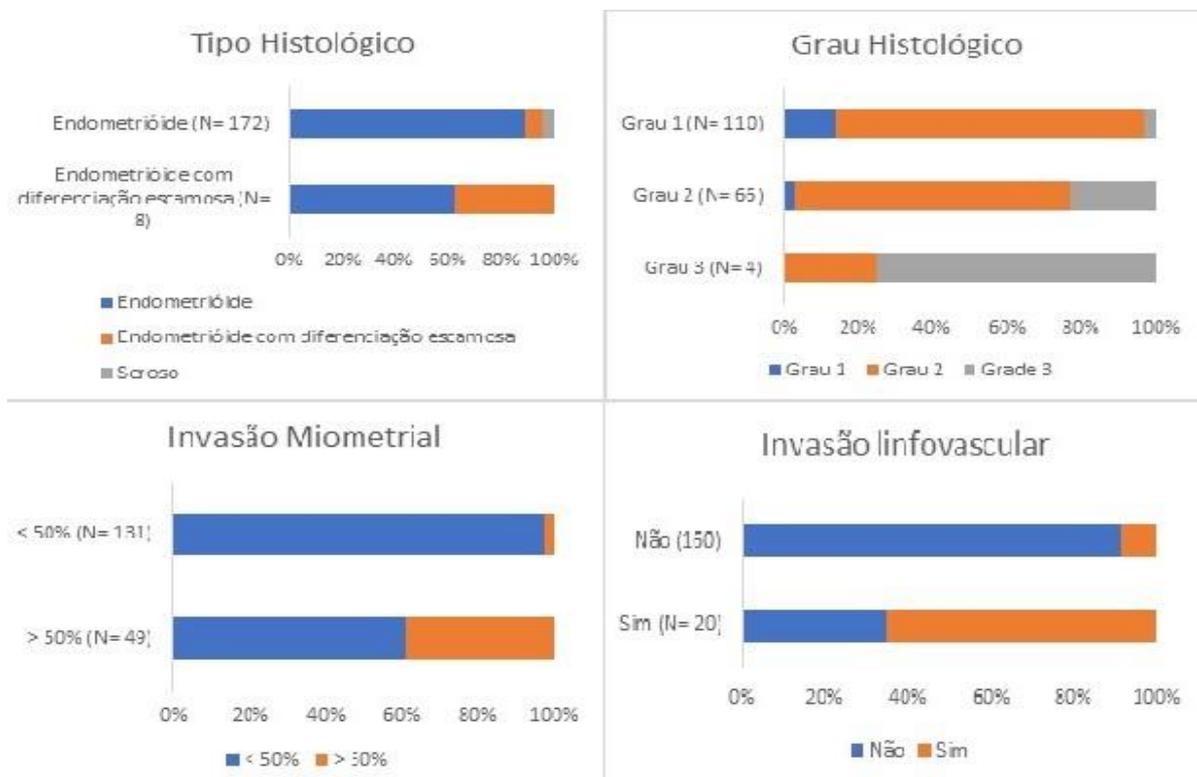
Após a avaliação dos patologistas especialistas em oncoginecologia, a frequência de mudança no laudo anátomo-patológico das variáveis característica morfológica, grau histológico, invasão miometrial e ILV foi respectivamente: 13,3%, 62,8%, 18,3% e 11,1%. Das 113 pacientes (62,8%) que tiveram alterações do grau histológico, apenas 3 (2,6%) apresentaram *downstaging* na nova classificação. Na análise dos especialistas, 7 (3,9%) diagnósticos de carcinoma seroso foram dados. Das 33 pacientes (18,3%) que tiveram mudanças na invasão miometrial, apenas 3 (7,0%) apresentaram *upstaging* na nova classificação. (Tabela 14 e Figura 5)

**Tabela 14.** Distribuição da característica morfológica, grau histológico, estadiamento, ILV e estratificação de risco após análise de patologistas especialistas em oncoginecologia.

Variável	Diagnóstico inicial		Revisão		Concordância	
	N	%	N	%	N	%
<b>Característica Morfológica</b>						

Endometrióide	172	95,5	158	87,8	153/172	88,9
Endometrióide com diferenciação escamosa	8	4,5	15	8,3	3/8	37,5
Seroso	0	0	7	3,9	-	-
Total	-	-	-	-	156/180	86,7
<b>Grau histológico</b>						
Grau 1	110	61,1	17	9,4	15/110	13,6
Grau 2	66	36,7	142	78,9	49/66	74,2
Grau 3	4	2,2	21	11,7	3/4	75
Total	-	-	-	-	67/180	37,2
<b>Invasão Miometrial</b>						
Menos que 50%	131	72,8	158	87,8	128/131	97,7
Mais que 50%	49	27,2	22	12,2	19/49	38,8
Total	-	-	-	-	147/180	81,7
<b>ILV</b>						
Sim	160	88,9	154	85,6	147/160	91,9
Não	20	11,1	26	14,4	13/20	65,0
Total	-	-	-	-	160/180	88,9
<b>Estratificação de Risco</b>						
Baixo	118	65,6	129	71,7	105/118	89,0
Intermediário	39	21,7	11	6,1	10/39	25,6
Intermediário Alto	23	12,7	29	16,1	11/23	47,8
Alto	0	0	11	6,1	-	-
Total	-	-	-	-	126/180	70,0

ILV – invasão linfovascular.



**Figura 5.** Distribuição da característica morfológica, grau histológico, estadiamento e ILV após análise de patologistas especialistas em oncoginecologia.

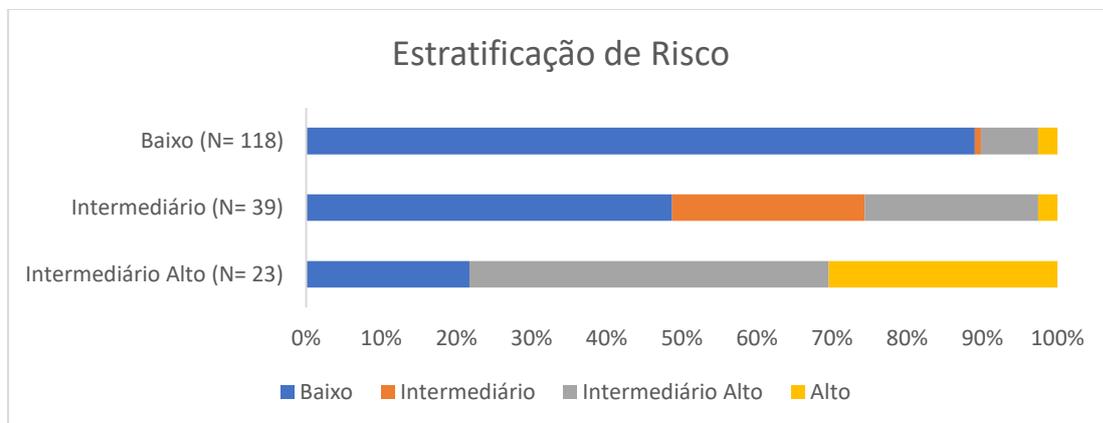
Considerando a Estratificação de Risco Modificada da ESMO do laudo inicial realizado pelos patologistas generalistas, 65,6% das pacientes eram de risco baixo, 21,7% de risco intermediário e 12,7% de risco intermediário alto. Após avaliação por parte dos patologistas especialistas, 11 pacientes (6,1%) foram classificadas como de risco alto. 126 pacientes (70%) não tiveram mudança em relação a classificação inicial e das 54 pacientes restantes (30%), 24 (44,4%) tiveram *downstaging* e 30 (55,6%) tiveram *upstaging* em suas classificações de risco.

(Tabela 15 e Figura 6)

**Tabela 15.** Mudanças na Estratificação de Risco Modificada da ESMO após análise por patologistas especialistas em oncoginecologia.

Estratificação de Risco Inicial	Estratificação de Risco Final				Total N (%)
	Baixo N (%)	Intermediário N (%)	Intermediário Alto N (%)	Alto N (%)	
<b>Baixo</b>	105 (89) <sup>a</sup>	1 (0,9) <sup>c</sup>	9 (7,6) <sup>c</sup>	3 (2,5) <sup>c</sup>	118 (65,6)
<b>Intermediário</b>	19 (48,7) <sup>b</sup>	10 (25,6) <sup>a</sup>	9 (23,1) <sup>c</sup>	1 (2,6) <sup>c</sup>	39 (21,7)
<b>Intermediário Alto</b>	5 (21,7) <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	11 (47,8) <sup>a</sup>	7 (30,4) <sup>c</sup>	23 (12,7)
<b>Total</b>	129 (71,7)	11 (6,1)	29 (16,1)	11 (6,1)	180

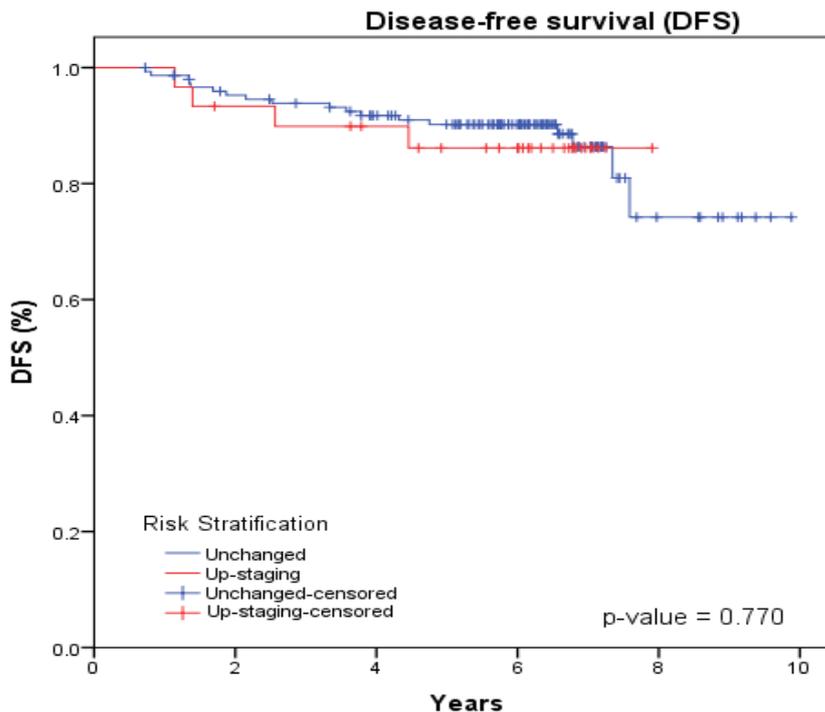
<sup>a</sup> – Nenhuma mudança; <sup>b</sup> – *Down-staging*; <sup>c</sup> – *Up-staging*



**Figura 6.** Distribuição na Estratificação de Risco Modificada da ESMO após análise de patologistas especialistas em oncoginecologia

Utilizando o coeficiente de *kappa* para avaliar a concordância entre os laudos iniciais dos patologistas generalistas e os laudos finais feitos em conjunto por dois patologistas especialistas em oncoginecologia, os resultados mostraram alta variabilidade na comparação destes laudos para as 4 variáveis analisadas: tipo histológico ( $\kappa = 0.154$ ), grau histológico ( $\kappa = 0.035$ ), invasão miometrial ( $\kappa = 0.441$ ) e ILV ( $\kappa = 0.503$ ). As mudanças nas variáveis descritas levaram a uma alta variabilidade na Estratificação de Risco Modificada da ESMO ( $\kappa = 0.396$ ).

A sobrevida global e a sobrevida livre de doença em 5 anos da coorte estudada foi de 94,7% e 89,3% respectivamente. Comparando a sobrevida livre de progressão em 5 anos das pacientes que tiveram um *upstaging* após avaliação dos patologistas especialistas em oncoginecologia com as pacientes que não tiveram mudança no laudo realizado por estes mesmos profissionais, não houve diferença estatisticamente significativa influenciada pelo novo laudo dado pelos especialistas (86,7% vs 88,0%,  $p = 0.77$ ). **(Figura 7)**



**Figura 7.** Curva de Kaplan–Meier entre pacientes sem mudanças na estratificação de risco e que apresentaram *up-staging* após revisão patológica.

## 6.2 Resultados Estudo 2 – Classificação molecular e *Nanostring*

Das 22 pacientes que apresentaram recidiva, 5 tiveram diagnóstico de tumor de alto grau (serosos) após revisão feita pelos patologistas especialistas em oncoginecologia e foram excluídas da presente análise. O grupo das pacientes que apresentaram recidiva foi numerado de 1 a 17. O grupo de pacientes que não apresentaram recidiva foi numerados como 1a/1b até 17a/17b.

Realizamos reações de imuno-histoquímica com os seguintes marcadores: receptor de estrogênio (RE); receptor de progesterona (RPg); p16; p53; PTEN; Beta-Catenina; ARIAD1a; L1CAM; PD-L1. **(Tabela 16)**

**Tabela 16.** Painel de Imuno-histoquímica das 51 amostras (17 recidivas; 34 não-recidivas)

Pacientes	RE	RPg	p16	p53	PTEN	Beta-Catenina	ARIAD1a	L1CAM	PD-L1
<b>Recidivas</b>									
1	-	-	-	Inc	-	+	-	1-5%	0
2	-	-	-	Inc	-	+	-	0	0
3	-	+	+	Inc	+	-	-	1-2%	0
4	+	+	+	-	-	+	+	0	0
5	+	-	+	-	-	+	+	0	0
6	-	+	-	-	+	+	+	0	0
7	-	-	+	+	-	+	+	0	0
8	-	-	-	+	-	-	-	0	0
9	-	+	+	-	-	+	-	1-2%	+
10	+	+	-	-	-	+	+	0	0
11	-	+	+	-	-	+	+	0	0
12	+	-	+	-	+	+	-	1-3%	+
13	+	+	+	-	+	+	-	0	0
14	-	-	-	-	+	+	+	0	0
15	+	+	+	-	-	+	+	0	0
16	+	+	-	-	-	+	+	0	0
17	-	+	+	-	+	+	+	1-2%	0
<b>Não-recidivas</b>									
1a	-	-	-	-	-	+	+	0	0
1b	+	-	+	-	+	+	+	0	0
2a	-	-	-	-	-	+	-	0	0
2b	+	-	+	-	+	+	-	0	0
3a	+	+	+	-	-	+	+	1-2%	0
3b	-	-	-	-	-	+	-	0	0
4a	+	-	+	-	+	+	-	0	0
4b	+	+	-	-	-	+	+	0	0
5a	-	-	-	-	+	+	-	0	0
5b	-	-	+	-	-	+	+	0	0
6a	+	+	-	-	-	+	+	0	0
6b	+	+	-	-	+	+	+	1-2%	0
7a	+	+	-	-	-	+	+	0	0
7b	-	-	+	Inc	+	+	-	1-10%	0
8a	-	-	+	-	-	+	-	0	0
8b	-	-	+	-	-	+	-	0	0
9a	-	-	-	-	-	+	-	0	0
9b	-	-	+	-	-	+	+	0	0
10a	-	-	+	-	-	+	+	0	0
10b	+	+	-	-	-	+	-	0	0
11a	-	+	+	-	-	+	+	0	0
11b	+	+	+	-	+	+	+	0	0
12a	+	+	-	-	+	+	+	0	0
12b	-	-	+	+	-	+	+	1-5%	0
13a	+	+	+	-	-	+	-	1-10%	0

13b	-	+	+	-	-	+	+	0	0
14a	+	+	-	-	+	+	+	0	0
14b	+	+	+	+	-	+	-	0	0
15a	-	-	+	Inc	-	+	+	0	0
15b	-	-	+	Inc	+	+	-	0	0
16a	+	-	+	-	+	+	-	0	+
16b	-	-	-	-	-	+	+	0	+
17a	-	-	-	Inc	-	-	-	0	0
17b	+	+	-	-	+	+	+	0	0

Tivemos problemas analíticos nestas reações (amostras muito homogêneas relacionadas sobretudo ao p53, Beta-Catenina, L1CAM e PD-L1) possivelmente por tratar-se de amostras antigas e que podem ter sido mal fixadas à época do diagnóstico.

Realizamos análise estatística para cada um dos marcadores (*Teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher*) comparando o grupo de pacientes com recidiva com o grupo não recidivado e para nenhum dos marcadores de imuno-histoquímica houve diferença entre os mesmos: RE (p = 0.69); RPg (p = 0.23); p16 (p = 0.84); p53 (p = 0.58); PTEN (p = 1.00); Beta-Catenina (p = 0.26); ARIAD1a (p = 0.84); L1CAM (p = 0.24); PD-L1 (p = 0.59).

### 6.2.1 Resultado Classificação Molecular

O resultado do sequenciamento do gene *POLE* mostrou apenas uma amostra mutada no Éxon 9 (c.857C>G; p.(Pro286Arg)). Das 51 amostras avaliadas, 23 (45,1%) foram descartadas devido baixa qualidade nos respectivos DNAs. Das 28 amostras válidas, 27 eram *wild type* (96,4%).

Das 51 amostras que foram sequenciadas para avaliação de instabilidade de microssatélite, apenas uma apresentou resultado inconclusivo (**Tabela 17**). Das 50 amostras restantes, 12 apresentaram instabilidade de microssatélite (24%) e 38 estabilidade de microssatélite (76%). Das 16 pacientes recidivadas (1 amostra excluída devido resultado inconclusivo), 4 tiveram resultado de instabilidade microssatélite (25%) e 12 de estabilidade de microssatélite (75%). Das 34 pacientes não recidivadas, 8 apresentaram instabilidade de microssatélite (23,5%) e 26 estabilidade de microssatélite (76,5%).

**Tabela 17.** Avaliação de Instabilidade de Microssatélite.

Pacientes	Resultado
Recidivas	
1	<b>Inconclusivo</b>
2	Estabilidade de microssatélite

3	Estabilidade de microssatélite
4	Estabilidade de microssatélite
5	Estabilidade de microssatélite
6	Estabilidade de microssatélite
7	Estabilidade de microssatélite
8	Estabilidade de microssatélite
9	<b>Instabilidade de microssatélite</b>
10	Estabilidade de microssatélite
11	Estabilidade de microssatélite
12	<b>Instabilidade de microssatélite</b>
13	Estabilidade de microssatélite
14	Estabilidade de microssatélite
15	<b>Instabilidade de microssatélite</b>
16	Estabilidade de microssatélite
17	<b>Instabilidade de microssatélite</b>
<hr/>	
Não-recidivas	
1a	<b>Instabilidade de microssatélite</b>
1b	Estabilidade de microssatélite
2a	Estabilidade de microssatélite
2b	Estabilidade de microssatélite
3a	Estabilidade de microssatélite
3b	<b>Instabilidade de microssatélite</b>
4a	Estabilidade de microssatélite
4b	Estabilidade de microssatélite
5a	<b>Instabilidade de microssatélite</b>
5b	Estabilidade de microssatélite
6a	Estabilidade de microssatélite
6b	Estabilidade de microssatélite
7a	Estabilidade de microssatélite
7b	Estabilidade de microssatélite
8a	<b>Instabilidade de microssatélite</b>
8b	<b>Instabilidade de microssatélite</b>
9a	Estabilidade de microssatélite
9b	<b>Instabilidade de microssatélite</b>
10a	Estabilidade de microssatélite
10b	Estabilidade de microssatélite
11a	Estabilidade de microssatélite
11b	<b>Instabilidade de microssatélite</b>
12a	Estabilidade de microssatélite
12b	Estabilidade de microssatélite
13a	Estabilidade de microssatélite
13b	Estabilidade de microssatélite
14a	Estabilidade de microssatélite
14b	Estabilidade de microssatélite
15a	Estabilidade de microssatélite
15b	Estabilidade de microssatélite
16a	Estabilidade de microssatélite

16b	Estabilidade de microssatélite
17a	<b>Instabilidade de microssatélite</b>
17b	Estabilidade de microssatélite

Realizamos sequenciamento genético para o gene *TP53* nas 51 amostras, sendo que 31 (60,8%) foram descartadas devido baixa qualidade dos respectivos DNAs. Das 20 amostras restantes, 5 (25%) apresentaram pelo menos uma variante mutada de acordo com a metodologia do estudo, sendo que duas delas carregavam mais de uma mutação patogênica. Uma dessas variantes (c.1136 G> A) foi comum a 2 casos distintos. Os tipos de mutação foram 6 *missense* (75,0%), 1 *nonsense* (12,5%) e 1 *frameshift* (12,5%). Cinco variantes foram descritas nas três bases de dados e previstas pelo CGI (*Cancer Genome Interpreter*). Apenas a variante *frameshift* não foi encontrada nas bases de dados pesquisadas. **(Tabela 18)**

**Tabela 18.** Análise da mutação do *TP53* baseada em NGS.

ID amostra	Tipo de mutação	Éxon	c.DNA	Proteína
5	frameshift	10	c.1020_1021dup	p.(Phe341Cysfs*5)
5	missense	11	c.1136G>A	p.(Arg379His)
8	missense	10	c.1025G>A	p.(Arg342Gln)
6b	missense	9	c.949C>A	p.(Gln317Lys)
7a	missense	11	c.1136G>A	p.(Arg379His)
13a	missense	7	c.733G>A	p.(Gly245Ser)
13a	nonsense	6	c.586C>T	p.(Arg196*)
13a	missense	5	c.472C>T	p.(Arg158Cys)

Compilando os resultados das 3 análises acima descritas (sequenciamento do gene *POLE*, pesquisa da instabilidade microssatélite e sequenciamento do gene *TP53*), tivemos o resultado da classificação molecular **(Tabela 19)**.

**Tabela 19.** Resultados da Classificação Molecular.

Pacientes	Resultado			
	<i>POLE</i>	Instabilidade de Microssatélite	<i>TP53</i>	Grupo
1	<b>Inconclusivo</b>	<b>Inconclusivo</b>	<b>Inconclusivo</b>	<b>Inconclusivo</b>
2	<b>Inconclusivo</b>	Estável	<b>Inconclusivo</b>	<b>Inconclusivo</b>
3	<b>Inconclusivo</b>	Estável	<b>Inconclusivo</b>	<b>Inconclusivo</b>
4	<i>Wild type</i>	Estável	<i>Wild type</i>	Grupo 3
5	<i>Wild type</i>	Estável	Mutado	Grupo 4

6	<b>Inconclusivo</b>	Estável	<b>Inconclusivo</b>	<b>Inconclusivo</b>
7	<b>Inconclusivo</b>	Estável	<b>Inconclusivo</b>	<b>Inconclusivo</b>
8	<b>Inconclusivo</b>	Estável	Mutado	Grupo 4
9	<i>Wild type</i>	<b>Instável</b>	<i>Wild type</i>	Grupo 1
10	<i>Wild type</i>	Estável	<i>Wild type</i>	Grupo 3
11	<b>Inconclusivo</b>	Estável	<b>Inconclusivo</b>	<b>Inconclusivo</b>
12	<i>Wild type</i>	<b>Instável</b>	<b>Inconclusivo</b>	Grupo 1
13	<i>Wild type</i>	Estável	<b>Inconclusivo</b>	<b>Inconclusivo</b>
14	<i>Wild type</i>	Estável	<b>Inconclusivo</b>	<b>Inconclusivo</b>
15	<i>Wild type</i>	<b>Instável</b>	<i>Wild type</i>	Grupo 1
16	<b>Inconclusivo</b>	Estável	<b>Inconclusivo</b>	<b>Inconclusivo</b>
17	<b>Inconclusivo</b>	<b>Instável</b>	<b>Inconclusivo</b>	Grupo 1
<hr/>				
Não-recidivas				
1a	<i>Wild type</i>	<b>Instável</b>	<b>Inconclusivo</b>	Grupo 1
1b	<i>Wild type</i>	Estável	<b>Inconclusivo</b>	<b>Inconclusivo</b>
2a	Mutado	Estável	<b>Inconclusivo</b>	Grupo 2
2b	<i>Wild type</i>	Estável	<b>Inconclusivo</b>	<b>Inconclusivo</b>
3a	<i>Wild type</i>	Estável	<i>Wild type</i>	Grupo 3
3b	<b>Inconclusivo</b>	<b>Instável</b>	<b>Inconclusivo</b>	Grupo 1
4a	<b>Inconclusivo</b>	Estável	<b>Inconclusivo</b>	<b>Inconclusivo</b>
4b	<i>Wild type</i>	Estável	<i>Wild type</i>	Grupo 3
5a	<i>Wild type</i>	<b>Instável</b>	<i>Wild type</i>	Grupo 1
5b	<i>Wild type</i>	Estável	<b>Inconclusivo</b>	<b>Inconclusivo</b>
6a	<i>Wild type</i>	Estável	<b>Inconclusivo</b>	<b>Inconclusivo</b>
6b	<i>Wild type</i>	Estável	Mutado	Grupo 4
7a	<b>Inconclusivo</b>	Estável	Mutado	Grupo 4
7b	<i>Wild type</i>	Estável	<b>Inconclusivo</b>	<b>Inconclusivo</b>
8a	<i>Wild type</i>	<b>Instável</b>	<i>Wild type</i>	Grupo 1
8b	<b>Inconclusivo</b>	<b>Instável</b>	<b>Inconclusivo</b>	Grupo 1
9a	<b>Inconclusivo</b>	Estável	<b>Inconclusivo</b>	<b>Inconclusivo</b>
9b	<b>Inconclusivo</b>	<b>Instável</b>	<b>Inconclusivo</b>	Grupo 1
10a	<b>Inconclusivo</b>	Estável	<i>Wild type</i>	<b>Inconclusivo</b>
10b	<i>Wild type</i>	Estável	<i>Wild type</i>	Grupo 3
11a	<b>Inconclusivo</b>	Estável	<b>Inconclusivo</b>	<b>Inconclusivo</b>
11b	<i>Wild type</i>	<b>Instável</b>	<i>Wild type</i>	Grupo 1
12a	<i>Wild type</i>	Estável	<b>Inconclusivo</b>	<b>Inconclusivo</b>
12b	<b>Inconclusivo</b>	Estável	<b>Inconclusivo</b>	<b>Inconclusivo</b>
13a	<i>Wild type</i>	Estável	Mutado	Grupo 4
13b	<i>Wild type</i>	Estável	<i>Wild type</i>	Grupo 3
14a	<b>Inconclusivo</b>	Estável	<b>Inconclusivo</b>	<b>Inconclusivo</b>
14b	<i>Wild type</i>	Estável	<i>Wild type</i>	Grupo 3
15a	<b>Inconclusivo</b>	Estável	<b>Inconclusivo</b>	<b>Inconclusivo</b>
15b	<b>Inconclusivo</b>	Estável	<b>Inconclusivo</b>	<b>Inconclusivo</b>
16a	<i>Wild type</i>	Estável	<i>Wild type</i>	Grupo 3
16b	<i>Wild type</i>	Estável	<i>Wild type</i>	Grupo 3
17a	<b>Inconclusivo</b>	<b>Instável</b>	<b>Inconclusivo</b>	Grupo 1
17b	<b>Inconclusivo</b>	Estável	<b>Inconclusivo</b>	<b>Inconclusivo</b>

Grupo 1 – instabilidade de microssatélite; Grupo 2 – *POLE* ultramutado; Grupo 3 – *p53 wild-type*; Grupo 4 – *p53* anormal

Das 51 amostras analisadas, 24 (47,1%) tiveram resultado inconclusivo em decorrência da baixa qualidade do DNA extraído para sequenciamento dos genes *POLE* e *TP53*. As 27 amostras restantes (52,9%) foram divididas em 4 grupos: grupo 1 (instabilidade de microssatélite) – 12 pacientes (23,5%); grupo 2 (*POLE* ultramutado) – 1 paciente (2%); grupo 3 (*p53 wild-type*) – 9 pacientes (17,6%); grupo 4 (*p53* anormal) – 5 pacientes (9,8%). (Tabela 20)

**Tabela 20.** Classificação Molecular entre recidivas e não-recidivas.

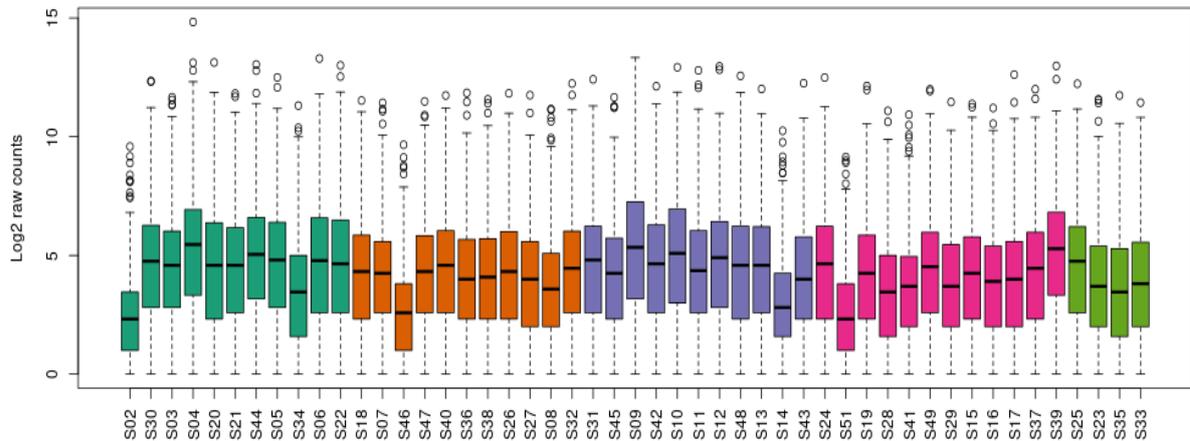
	<b>N (%)</b>	<b>Casos</b>	<b>Controle</b>
<b>Grupo 1</b>	12 (23,5)	4	8
<b>Grupo 2</b>	1 (2,0)	0	1
<b>Grupo 3</b>	9 (17,6)	2	7
<b>Grupo 4</b>	5 (9,8)	2	3
<b>Inconclusivo</b>	24 (47,1)	9	15

Através do *Teste Exato de Fisher*, avaliamos se houve diferença entre os 4 grupos citados e a chance aumentada de recidiva destas pacientes. Não houve diferença entre a probabilidade da paciente estar alocada em algum dos 4 grupos e ela ter apresentado ou não recidiva ( $p = 0,823$ ).

### 6.2.2 Resultado Nanostring

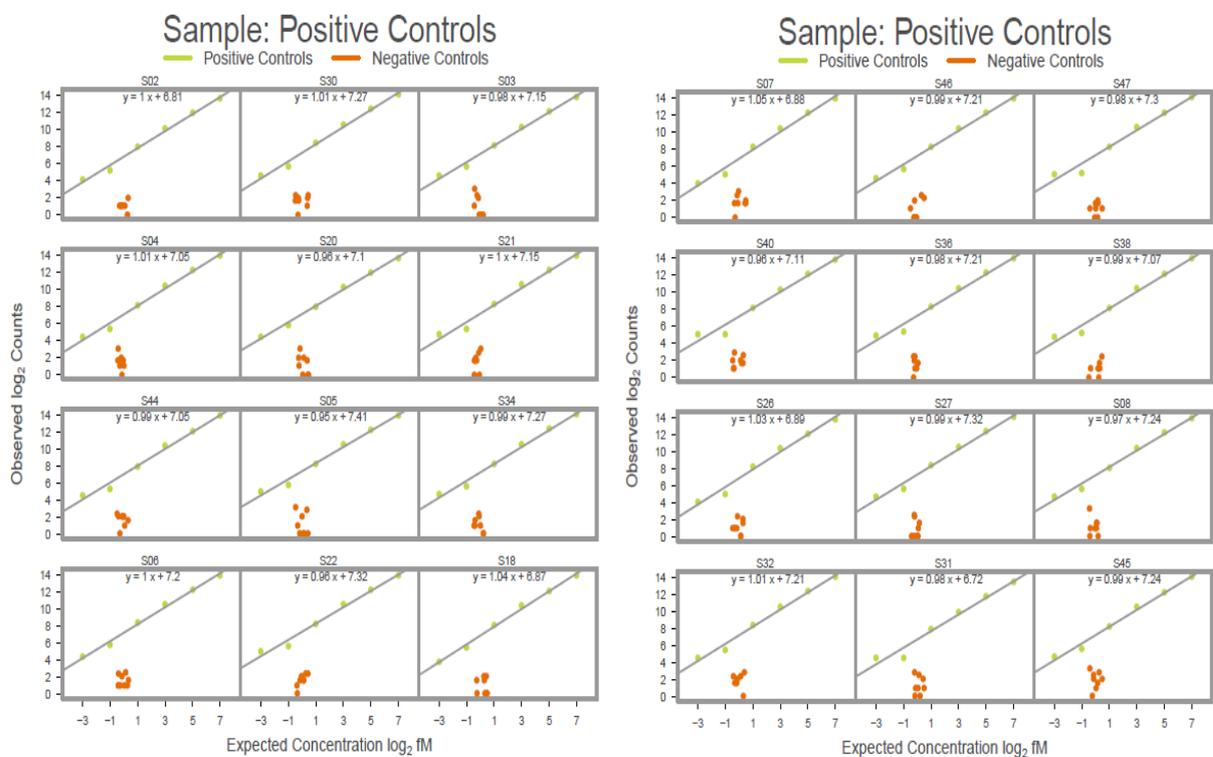
A análise da expressão do RNA foi realizada nas 51 amostras do estudo. As amostras no programa de software *nSolver* são nomeadas com a letra “S”. As amostras S01 até S17 representam as pacientes com recidiva e as amostras S18 até S51 as não recidivados. Duas destas amostras foram excluídas (S01 – recidiva; S50 – não recidiva) devido à baixa qualidade do RNA. Esta avaliação aconteceu através de controles de qualidade do *software nSolver*. Utilizamos para as amostras do estudo leitura com 280 FOVs.

O resultado da análise da normalização das amostras está demonstrado na **Figura 8**. O intuito foi detectar a existência de *Batches* de cartucho (problemas técnicos dentro do mesmo cartucho ou entre eles). Também nesta etapa da análise não foram detectados erros de contagem amostral (*flags*) que evidenciariam problemas no *nSolver* (já haviam sido excluídas as 2 amostras devido baixa contagem de RNA).



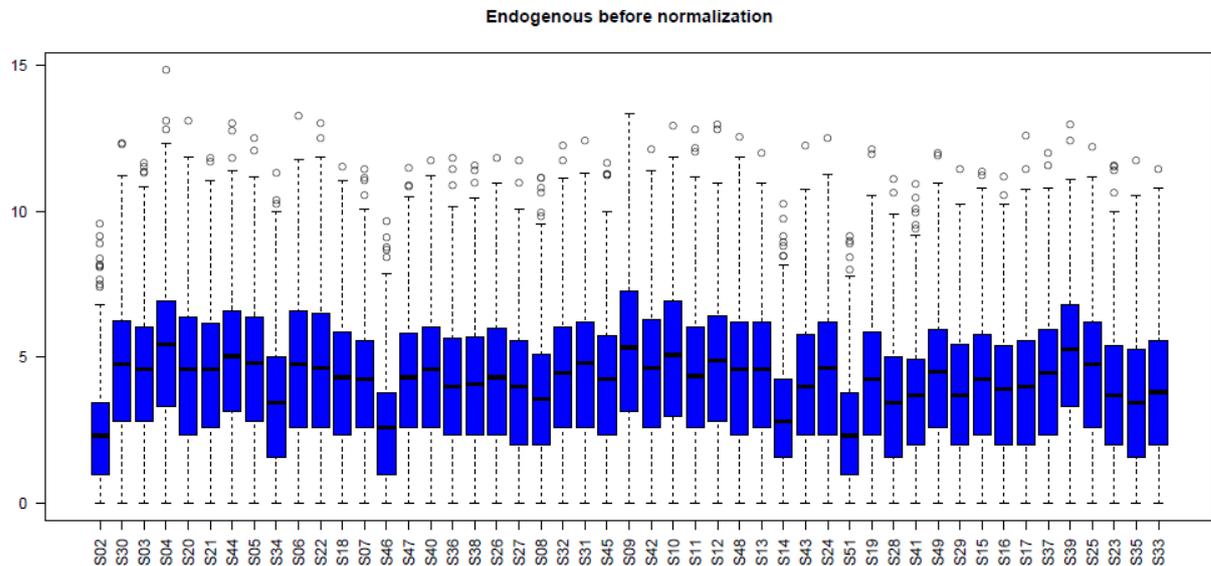
**Figura 8.** Amostras do experimento (eixo X) divididas nos 5 cartuchos (cores verde escuro, marrom, violeta, rosa e verde claro) demonstrando os logs das contagens dos genes (eixo Y).

Uma segunda análise do controle dos resultados foi realizada através dos controles positivos e negativos das amostras no pacote *NanoStringNorm*. O gráfico da **Figura 9** demonstra que os controles positivos em cada amostra têm um aumento linear do nível de contagem da expressão de RNA e os controles negativos ficam agrupados abaixo da linha ascendente do gráfico demonstrando uma baixa expressão.

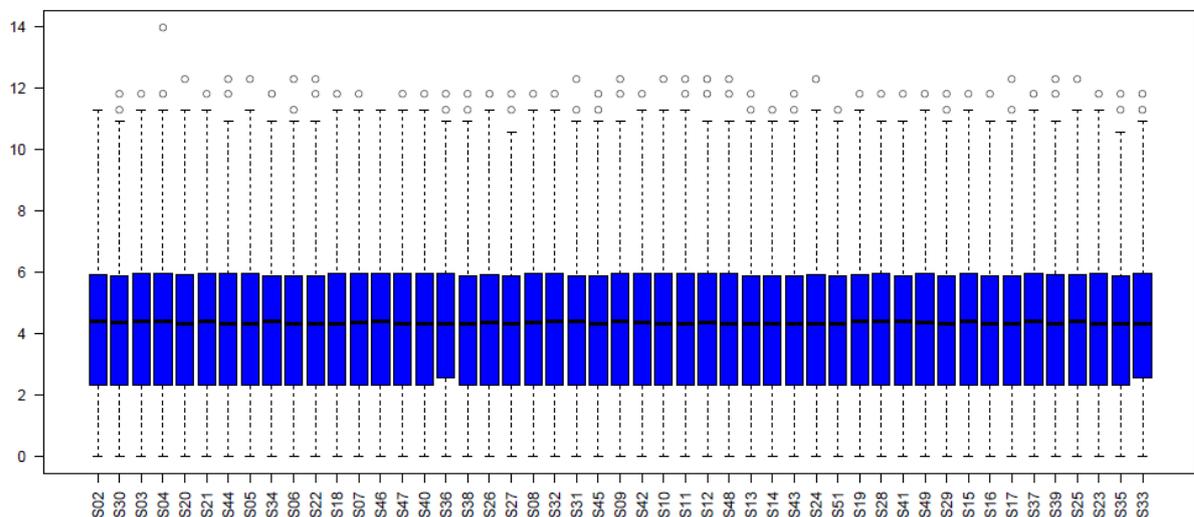


**Figura 9.** Análise do controle de qualidade do experimento com controles positivos em ascensão e controles negativos agrupados abaixo da linha ascendente.

Realizamos a técnica quantil para normalização dos dados, não sendo detectadas *flags*, conforme demonstrado nas **Figuras 10 e 11**.



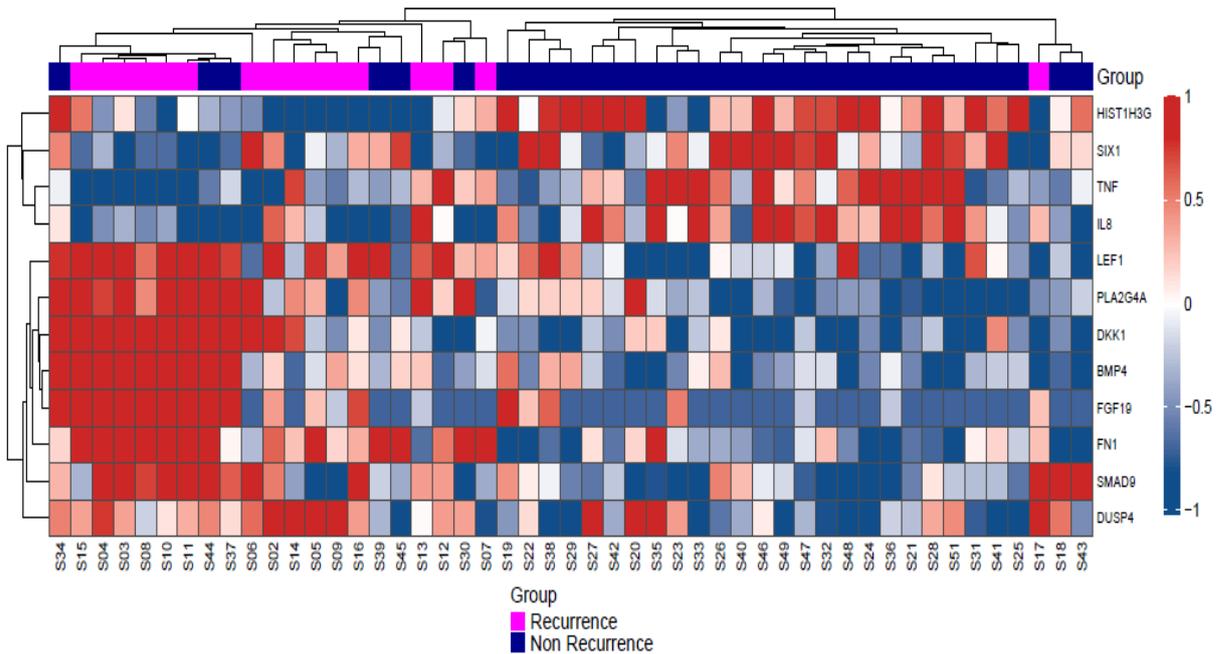
**Figura 10.** Genes endógenos antes da normalização com as 49 amostras representadas no eixo X e o log<sub>2</sub> da contagem dos genes no eixo Y.



**Figura 11.** Genes endógenos após a normalização (técnica Quantil) com as 49 amostras representadas no eixo X e o log<sub>2</sub> da contagem dos genes no eixo Y.

Após a etapa da normalização das amostras, procedemos a realização da análise da expressão do RNA comparando o grupo das pacientes que recidivaram com o grupo das pacientes que não recidivaram. Assumindo um  $p \leq 0.01$  e um *Fold change* de 2.0, encontramos 12 genes com expressão de RNA estatisticamente significativa: *HIST1H3G*, *SIX1*, *TNF*, *IL8* (baixa

expressão nas recidivas); *LEF1*, *PLA2G4A*, *DKK1*, *BMP4*, *FGF19*, *FN1*, *SMAD9* e *DUSP4* (alta expressão nas recidivas). (**Figura 12**)



**Figura 12.** *Heatmap* dos RNAs diferencialmente expressos entre pacientes que apresentaram recidiva (rosa) em relação aos que não recidivaram (azul). No eixo X estão representadas as amostras do estudo e no eixo Y à direita os genes endógenos codificadores do RNA diferencialmente expressos (em cor vermelha estão os genes com maior expressão e na cor azul os com menor expressão).

A **figura 13** demonstra as vias da carcinogênese que pertencem estes genes diferencialmente expressos. Dos 4 genes com baixa expressão nas pacientes recidivadas, 3 fazem parte da via da *Regulação Transcricional* (*HIST1H3G*, *SIX1*, *IL8*). Já as vias mais hiperexpressas das pacientes recidivadas são *MAPK* (*PLA2G4A*, *FGF19* e *DUSP4*), *Wnt* (*LEF1*, *DKK1*), *RAS* (*PLA2G4A*, *FGF19*), *PI3K* (*FGF19*, *FN1*) e *TGF- $\beta$*  (*BMP4*, *SMAD9*).


 nCounter Pan-Cancer Pathways Panel - Gene to Pathway Summary

Gene	Groups	Notch	Wnt	HH	ChromMod	TXmisReg	DNAREpair	TGF-B	MAPK	JAK-STAT	PI3K	RAS	CC+Apop
BMP4	HH;TGF-B	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
DKK1	Wnt	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DUSP4	MAPK	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
FGF19	MAPK;PI3K;RAS	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-



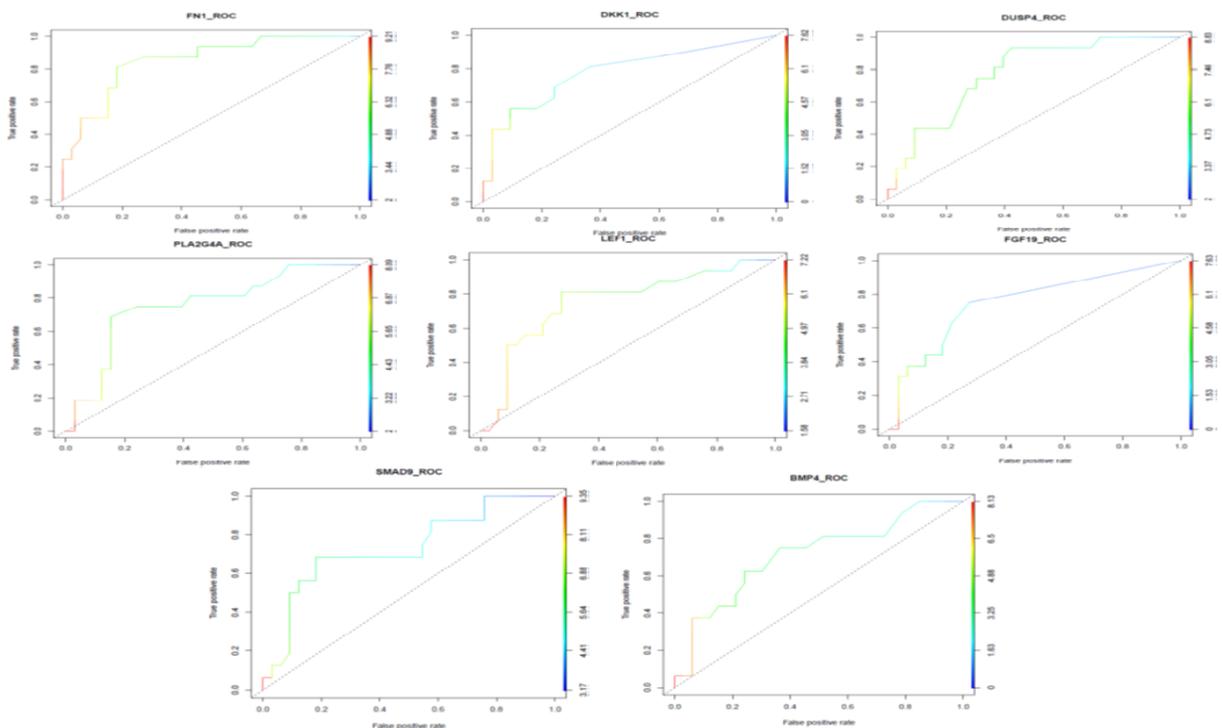
Realizamos curvas ROC individuais dos 12 genes acima descritos para avaliar a sensibilidade e especificidade de cada um deles relacionados ao risco de recidiva de pacientes com câncer de endométrio de risco baixo e intermediário. (Tabela 22) (Figuras 15 e 16)

**Tabela 21.** Curvas ROC individuais dos genes codificadores de RNA diferencialmente expressos.

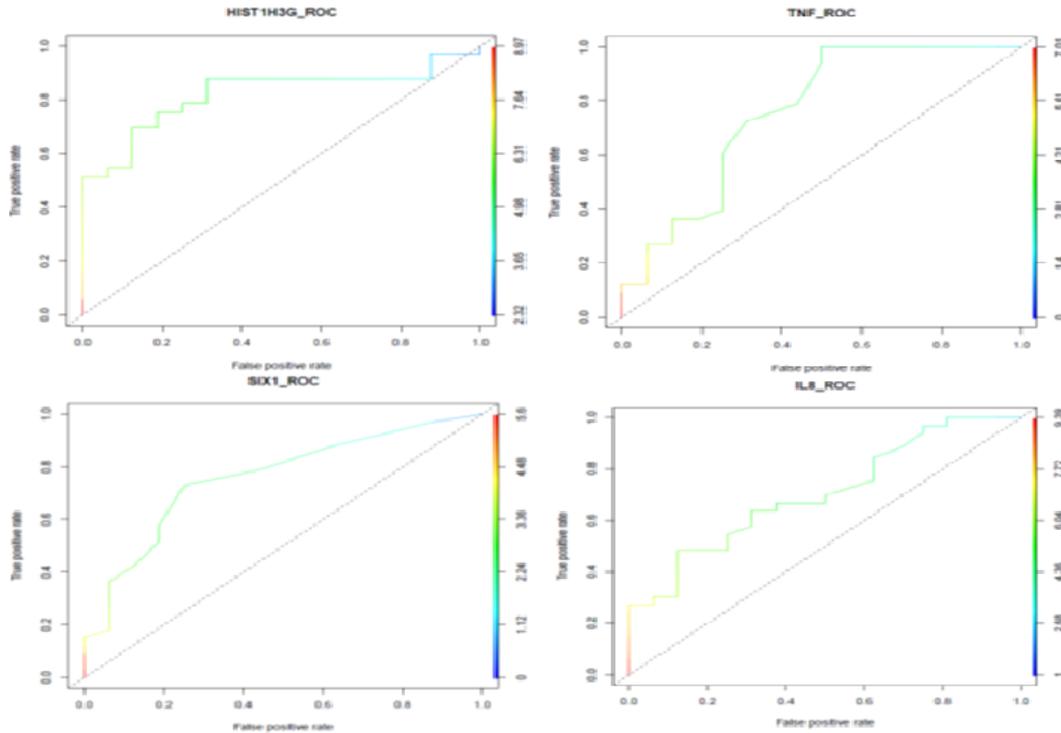
Grupos	Genes	Sensibilidade	Especificidade	Cutoff <sup>1</sup>	AUC <sup>2</sup>
<b>Não-recidivas</b>					
	<i>HIST1H3G</i>	0,7575	0,8125	5,807	0,8219
	<i>TNF</i>	0,7272	0,6875	3,17	0,7613
	<i>SIX1</i>	0,7272	0,75	2,322	0,7575
	<i>IL8</i>	0,6363	0,6875	5,285	0,7045
<b>Recidivas</b>					
	<i>FN1</i>	0,8125	0,8181	6,644	0,8532
	<i>DKK1</i>	0,6875	0,7575	2,0	0,7821
	<i>DUSP4</i>	0,75	0,6969	5,524	0,7784
	<i>PLA2G4A</i>	0,6875	0,8484	5,044	0,7575
	<i>LEF1</i>	0,8125	0,7272	5,248	0,7547
	<i>FGF19</i>	0,75	0,7272	1,0	0,7537
	<i>SMAD9</i>	0,6875	0,8181	5,672	0,7348
	<i>BMP4</i>	0,75	0,6363	3,322	0,7121

<sup>1</sup> Cutoff – ponto de corte

<sup>2</sup> AUC – Área sob a curva



**Figura 15.** Curvas ROC individuais dos genes codificadores de RNA diferencialmente expressos – recidivas.



**Figura 16.** Curvas ROC individuais dos genes codificadores de RNA diferencialmente expressos – não-recidivas.

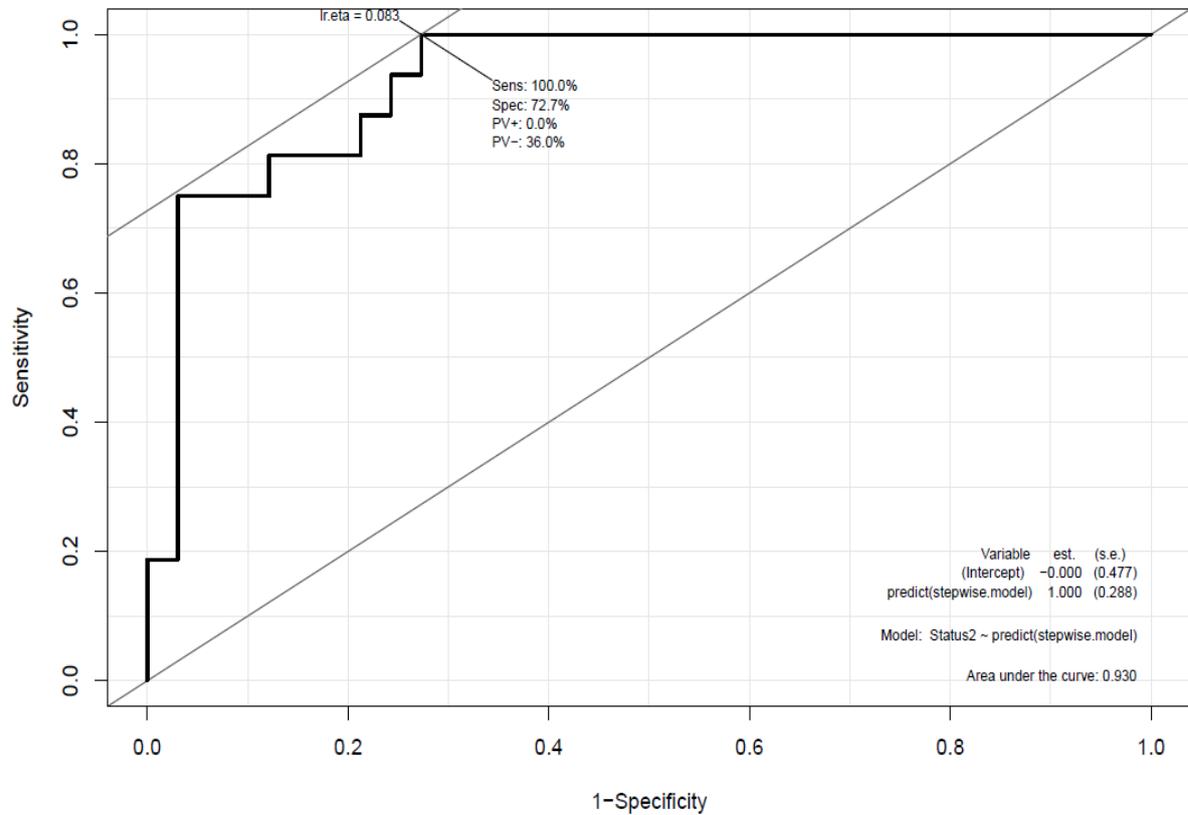
Como todas as curvas ROC individuais apresentaram uma  $AUC \geq 0,7$ , realizamos uma curva ROC combinada com os 12 genes identificados através de regressão logística. Utilizando a técnica *backward stepwise* de regressão logística do pacote *MASS (Modern Applied Statistics with S)* em ambiente R, foram selecionados 4 genes com melhor performance: *FN1*, *DUSP4*, *LEF1* e *SMAD9* (genes com alta expressão do respectivo RNA nas recidivas). (Tabela 23)

**Tabela 22.** Genes selecionados através da regressão logística (*backward stepwise*) para determinação da Curva ROC combinada.

	<b>Coefficiente</b>	<b>Erro padrão</b>	<b>Valor p</b>
<b>Constante (<i>b</i><sub>0</sub>)</b>	-21,1399	6,0792	0,000506
<b>Genes</b>			
<b><i>FN1</i></b>	1,0188	0,4941	0,039
<b><i>DUSP4</i></b>	1,0663	0,4962	0,031
<b><i>LEF1</i></b>	0,6211	0,4399	0,157
<b><i>SMAD9</i></b>	0,8832	0,4531	0,051

O score de risco de recorrência (RRS) foi calculado através da fórmula obtida por regressão logística (*logit* da regressão):  $RRS = -21,14 + 1,02 * FN1 + 1,07 * DUSP4 + 0,6211 * LEF1 + 0,8832 * SMAD9$ . A combinação dos 4 genes expressos definiu uma AUC da curva ROC combinada de 0,93 com uma sensibilidade de 100% e uma especificidade de 72,7% para

identificar através da expressão do RNA o risco de recidiva de pacientes com câncer de endométrio de risco baixo e intermediário. **(Figura 17)**



**Figura 17.** Curva ROC combinada dos genes codificadores de RNA diferencialmente expressos que podem influenciar no risco de recidiva.

## 7 DISCUSSÃO

O câncer de endométrio é uma doença heterogênea e cada vez mais prevalente na população mundial, sobretudo em países desenvolvidos como Estados Unidos e União Europeia devido à epidemia de obesidade que estes países presenciam.<sup>1</sup> Avaliar os fatores prognósticos do câncer de endométrio para definir o melhor tratamento adjuvante complementar para estas pacientes é essencial. Além do estadiamento cirúrgico tradicional, outras variáveis anatomopatológicas influenciam o prognóstico destas pacientes como grau tumoral, ILV e tipo histológico.<sup>42</sup> Com a revolução do entendimento da carcinogênese deste tumor a partir da publicação do TCGA consortium<sup>19</sup> e de novas metodologias mais facilmente reproduzíveis como a *ProMisE*<sup>20</sup> e/ou Leiden/TransPORTEC<sup>21</sup>, mais complexo tornou-se a definição prognóstica e o tratamento adjuvante adequado. Como exemplo podemos citar o estudo de León-Castillo *et al.*<sup>94</sup> que demonstrou que pacientes com expressão anormal ou ausente da p53 por imuno-histoquímica seriam as que mais se beneficiariam de tratamento combinado de quimioterapia e radioterapia quando comparado à radioterapia isolada. Estudo prospectivo PORTEC 4a também avaliará o melhor tratamento adjuvante de acordo com a classificação molecular destas pacientes.<sup>95</sup>

Grupos internacionais têm estudado a construção de modelos prognósticos que poderiam mensurar o risco de recidiva das pacientes com câncer de endométrio através de perfis de expressão gênica. Deng *et al.* avaliaram através do banco de dados do TCGA a expressão do RNA de 496 pacientes correlacionando com os respectivos dados clínicos.<sup>96</sup> Destas 496 pacientes, 100 foram excluídas de maneira randômica por serem o grupo de validação e das 396 pacientes restantes, 33 tiveram o tecido paratumoral também analisado sendo considerado o grupo controle do estudo. Das 12 variáveis clínicas avaliadas, duas (grau tumoral e estadiamento) foram selecionadas para o modelo. Do ponto de vista molecular, 17 RNAm (RNA mensageiro), 8 RNAmi (micro RNA) e 3 RNAlnc (RNA longo de não codificação) foram diferencialmente expressos e selecionados para o modelo matemático. A associação do modelo clínico com o modelo de expressão de RNA resultou numa AUC 0,932 em prever o prognóstico das pacientes, superior aos modelos clínicos ou de expressão de RNA sozinhos. Outros dois estudos avaliaram assinaturas preditoras de prognóstico associadas a genes relacionados à autofagia.<sup>97, 98</sup> Zhang *et al.* demonstraram que 4 genes (*CDKN2A*, *PTK6*, *ERBB2* e *BIRC5*) relacionados à via da sinalização da apoptose intrínseca foram fatores independentes

de mau prognóstico na evolução do câncer de endométrio.<sup>97</sup> Correlacionaram então o modelo matemático descrito com a classificação molecular do câncer de endométrio do TCGA e pacientes com número de cópias altas tinham os maiores *score*, sendo que para o grupo *POLE* ultramutado, MSI-H e número de cópias baixas não houve diferença estatisticamente significativa. Eles validaram ainda através de IHQ a expressão das proteínas destes 4 genes e os resultados mostraram maior expressão no tecido tumoral quando comparado com tecido normal ao redor.<sup>97</sup> Já no estudo de Wang *et al.*, a avaliação ocorreu através de RNAInc. Foram encontrados 5 RNAInc (LINC01871, SCARNA9, SOS1-IT1, AL161618.1 e FIRRE) que estavam diferentemente expressos, sendo que dois RNAInc (FIRRE e SOS1-IT1) apresentavam alta expressão e três RNAInc (LINC01871, SCARNA9 e AL161618.1) apresentavam baixa expressão no grupo de pior prognóstico. Cruzando estes resultados com critérios clínicos prognósticos (idade, grau tumoral, estadiamento), houve correlação dos mesmos de acordo com grupos de pior prognóstico.<sup>98</sup> Um outro estudo avaliou o comportamento da expressão de RNA tumoral em dois cenários evolutivos distintos do câncer de endométrio: desenvolvimento de ILV e metástase linfonodal. Foram avaliados quatro grupos distintos: controle normal; ILV negativo/linfonodo negativo; ILV positivo/linfonodo negativo; ILV positivo/linfonodo positivo. Vias da angiogênese e da adesão imune celular apresentavam alta expressão para o desenvolvimento da ILV enquanto durante a progressão da ILV para acometimento linfonodal há um silenciamento da via da adesão imune celular e uma alta expressão das vias de hipóxia, stress metabólico, remodelamento da matriz e via de metástases.<sup>61</sup>

No presente estudo utilizamos a técnica do NanoString para avaliarmos a diferenciação da expressão do RNA tumoral entre dois grupos distintos: pacientes recidivadas e não recidivadas com diagnóstico de carcinoma de endométrio de risco baixo e intermediário. Trata-se de uma técnica extremamente sensível, comparável à PCR em tempo real e mais sensível que o método de microarranjos, sem a necessidade de reações enzimáticas e amplificação. Por utilizar um método de contagem, não apresenta problemas de sequenciamento, hibridização e amplificação de ácidos nucleicos. Além disso, esta técnica é capaz de detectar fragmentos pequenos provenientes de amostras com alto grau de degradação (amostras derivadas de tecido parafinado, por exemplo) e não necessita validação por outro método.<sup>99-101</sup>

O painel utilizado foi o *nCounter Pan-Cancer Pathways Panel*, onde 13 vias canônicas do câncer são avaliadas através da análise do RNA transcrito de 730 genes: *Notch*, *Wnt*,

*Hedgehog, Chromatin modification, Transcriptional regulation, DNA damage control, TGF- $\beta$ , MAPK, STAT, PI3K, RAS, Cell cycle, Apoptosis.*<sup>102</sup> A descrição sumária a respeito de cada uma destas 13 vias canônicas encontra-se no **Anexo 3**.<sup>82</sup>

Avaliando os resultados encontrados, há no grupo das pacientes recidivadas a superexpressão de 8 genes (*LEF1, PLA2G4A, DKK1, BMP4, FGF19, FN1, SMAD9 e DUSP4*) agrupados em 5 vias de sinalização (**MAPK** (*PLA2G4A, FGF19 e DUSP4*), **Wnt** (*LEF1, DKK1*), **RAS** (*PLA2G4A, FGF19*), **PI3K** (*FGF19, FN1*) e **TGF- $\beta$**  (*BMP4, SMAD9*)) e a baixa expressão de outros 4 genes (*HIST1H3G, SIX1, TNF, IL8*) agrupados em 3 vias de sinalização (**Regulação Transcricional** (*HIST1H3G, SIX1, IL8*), **TGF- $\beta$**  (*TNF*) e **Ciclo celular** (*TNF*)). Dentre os genes e vias acima demonstrados, possivelmente a via **Wnt** seja a que possui dados mais robustos relacionados à carcinogênese do câncer de endométrio. Estudo de caso controle avaliando marcadores moleculares em câncer de endométrio estágio I e grau histológico 1 publicado em 2019 por Moroney *et al.* demonstrou que pacientes recidivados apresentavam maior prevalência da mutação do gene *CTNNB1*, um gene pertencente a via **Wnt**.<sup>103</sup> O papel da superexpressão das proteínas LEF1 e DKK1 na carcinogênese do câncer de endométrio pode estar relacionado tanto com a modulação de proteínas de adesão da superfície celular<sup>104</sup> quanto com a via de sinalização do estrogênio<sup>105</sup>, influenciando no prognóstico em ambas as situações. Um estudo de bancada com ratos *knockout* para a proteína LEF1 demonstrou a importância dela na evolução da carcinogênese do câncer de endométrio nestes animais. A proteína LEF1 é primordial na formação glandular uterina e sua superexpressão possivelmente influencia o crescimento desordenado das células glandulares e a formação do câncer neste órgão.<sup>106</sup> A proteína DKK1 inibe os níveis nucleares da  $\beta$ -catenina levando à inativação da via **Wnt**. Há um favorecimento do desenvolvimento/progressão tumoral ao aumentar a taxa de migração, invasão e metástases das células.<sup>107</sup> Estudo publicado em 2009 por Jiang *et al.* demonstrou que níveis séricos elevados da proteína DKK1 estava associado à pacientes com diagnóstico de câncer de colo de útero e câncer de endométrio quando comparado à população normal, além de se correlacionar com o estadiamento destas pacientes.<sup>108</sup> Outros estudos demonstraram um “efeito protetor” da expressão da DKK1 no câncer de endométrio, seja por inativação de culturas de células tumorais tratadas com RNA silenciadores (siRNA)<sup>109</sup> ou pela demonstração de menores níveis da expressão da DKK1 nas células tumorais do câncer de endométrio quando comparado com tecido endometrial benigno.<sup>110</sup>

Duas vias que apresentam um importante *crosstalk* na carcinogênese de vários tumores é da **MAPK** e **PI3K**, inclusive com terapia alvo direcionada.<sup>111</sup> No presente estudo temos 4 genes relacionados a essas duas vias (*PLA2G4A*, *FGF19*, *DUSP4* e *FN1*). Alguns poucos estudos já mencionaram a relação destes genes com o câncer de endométrio. Estudo conduzido pela Universidade de Bergen na Noruega em parceria com o *M.D. Anderson Cancer Center* avaliou um modelo preditor de acometimento linfonodal no câncer de endométrio com 399 pacientes. Além da constatação que a alta expressão de ciclina D1, fibronectina e o grau tumoral eram importantes marcadores de acometimento linfonodal, este modelo demonstrou que a expressão aumentada do RNAm dos genes *FN1* e *CCND1* correlacionava com maior potencial de invasão mesenquimal.<sup>112</sup> Um estudo recente publicado em 2020 por Raglan *et al.* avaliou dados proteômicos de 560 pacientes com câncer de endométrio do banco de dados do TCGA e demonstrou que em pacientes obesas ainda sem diagnóstico de câncer de endométrio havia uma regulação positiva das proteínas Mcl-1, DUSP4 e do receptor-b da insulina. Tais proteínas estão envolvidas em vias da carcinogênese e progressão tumoral através de atividades mitogênicas e antiapoptóticas.<sup>113</sup> O gene *FGF19* estaria implicado no desenvolvimento e progressão de tumores do trato gastrointestinal alto, como esôfago, estômago, pâncreas e hepatocarcinoma, sendo que até o presente momento nenhuma evidência científica está disponível deste gene relacionado ao carcinoma de endométrio.<sup>114</sup>  
<sup>115</sup> Já os estudos de maior impacto referente ao gene *PLA2G4A* fazem correlação do mesmo com piora na sobrevida global de pacientes diagnosticados com leucemia mieloide aguda.<sup>116</sup>  
<sup>117</sup>

Considerando os outros 2 genes (*BMP4* e *SMAD9*) superexpressos nas pacientes recidivadas, temos poucas evidências na literatura correlacionando os mesmos com o prognóstico do câncer de endométrio. Estudo publicado por Hsu *et al.* em 2013 demonstrou que a hipometilação dos genes da família *BMP*, dentre os quais está o gene *BMP4*, confere um pior prognóstico tanto pelo aumento da taxa de recorrência quanto em termos de menor sobrevida livre de doença.<sup>118</sup> Já o *SMAD9*, outro gene pertencente à via do **TGF- $\beta$** , não tem nenhuma evidência científica até o presente momento que possa correlacionar com a carcinogênese do câncer de endométrio. Este gene estaria implicado no mau prognóstico do adenocarcinoma de pulmão.<sup>119</sup>

Avaliando os genes com baixa expressão nas pacientes recidivadas, temos três (*HIST1H3G*, *SIX1*, *IL8*) que participam da via da **Regulação Transcricional** e o *TNF* relacionado

com a via do **TGF- $\beta$**  e **Ciclo celular**. Existem poucas evidências científicas até o momento correlacionando estes quatro genes com o carcinoma de endométrio. Quatro estudos correlacionam a expressão do gene *SIX1* com a carcinogênese do câncer endometrial.<sup>120-123</sup> Diferentemente do nosso experimento onde a alta expressão do RNA deste gene está relacionado com menor chance de recidiva em pacientes com câncer de endométrio de risco baixo e intermediário, três estudos demonstram que o *SIX1* participa da progressão do câncer de endométrio associado à via da hiperexposição ao estrogênio<sup>121, 122</sup> ou à via ERK/AKT.<sup>120</sup> Em contrapartida, o estudo publicado por Li *et al.* demonstrou que a inibição do *SIX1* através da ligação do RNAmi-23 prejudica o desenvolvimento deste tumor.<sup>123</sup> Um dos mecanismos que influenciam a carcinogênese do câncer de endométrio é um estado inflamatório crônico das pacientes obesas. Uma das citocinas relacionadas a este estado pró-inflamatório seria a TNF- $\alpha$ , citocina secretada pelo gene *TNF*, porém estudo de caso-controle com aproximadamente 600 pacientes não demonstrou que altas taxas de TNF- $\alpha$  estaria associado a um maior risco de câncer de endométrio.<sup>124</sup> O gene *IL8*, que codifica a proteína Interleucina 8 (IL-8), importante na resposta inata imune-mediada por célula, poderia influenciar o desenvolvimento do câncer de endométrio como uma citocina pró-inflamatória para células adiposas<sup>125</sup> ou interferindo na angiogênese e invasão miometrial deste tumor.<sup>126</sup> O gene *HIST1H3G*, que codifica a proteína histona H3.1, não apresenta correlação com a carcinogênese do câncer de endométrio até o presente momento.<sup>127</sup>

Apesar da ampla mudança no entendimento do câncer de endométrio da última década relacionados à biologia molecular deste tumor, a avaliação anatomopatológica realizada por um especialista continua primordial no manejo desta doença.<sup>128</sup> Na pesquisa por nós realizada, dois patologistas especialistas em oncoginecologia revisaram os laudos de 195 pacientes e ao confrontarmos com os laudos iniciais avaliando quatro variáveis (subtipo histológico; grau histológico; invasão miometrial; invasão angiolinfática) tivemos uma taxa de discordância de 13,3%, 62,8%, 18,3% e 11,1%. Como em outras séries previamente publicadas,<sup>12, 129</sup> o grau histológico é a variável onde as maiores taxas de discordância são encontradas. A discrepância do grau tumoral entre a biópsia/curetagem endometrial e histerectomia está bem documentada na literatura. Leitão e colaboradores em 2008 avaliaram retrospectivamente 490 casos diagnosticados como adenocarcinoma endometrial grau 1 por biópsia e mostraram uma discrepância de 14,7% no resultado patológico final da histerectomia.<sup>130</sup> Dois outros estudos retrospectivos mostraram uma discrepância entre a

biópsia inicial e a histerectomia final, variando entre 40,9% a 50,5%. Quando os autores avaliaram apenas a mudança de grau 1 para 2 ou 3, as taxas chegaram a 55%.<sup>131, 132</sup> A diferença histopatológica entre os tumores de grau 1 e grau 2 é tênue e subjetiva. Quando temos até 5% do padrão de crescimento sólido não escamoso (não morular), este tumor é classificado como grau 1 e quando esse padrão de crescimento é encontrado entre 5% e 50% de glândulas, ele é classificado como grau 2.<sup>133</sup> Ao avaliar as classificações de risco para câncer de endométrio, a maioria dos estudos não determinou diferenciação prognóstica entre tumores de grau 1 ou 2,<sup>134, 135</sup> exceto o estudo PORTEC-1,<sup>67</sup> onde os tumores de baixo risco eram considerados estágio IA grau 1 (**Tabela 23**). Alguns autores discutem a mudança na classificação histopatológica em relação ao grau histológico e sugerem agrupar tumores de graus 1 e 2 em uma única categoria para diferenciar dos tumores de grau 3.<sup>136, 137</sup>

**Tabela 23.** Classificações de risco para câncer de endométrio.

	Baixo	Intermediário	Intermediário-Alto	Alto
<b>PORTEC-1</b> <sup>67</sup>	Grau 1 IA	Grau 1 IB Grau 2 IA-IB Grau 3 IA	Idade > 60 anos; IB; grau 1-2 Idade > 60 anos; IA; grau 3	Grau 3 IB II-IV endometrióide Não endometrióide
<b>GOG-99</b> <sup>134</sup>	Grau 1-2 IA confinado ao endométrio	IA c/ IM, IB ou II: - ≥ 70 anos; s/ FR - 50-69 anos; 1 FR - ≤ 50 anos; 2 FR	IA c/ IM, IB ou II: - ≥ 70 anos; 1 FR - 50-69 anos; 2 FR - ≥ 18 anos; 3 FR	III-IV endometrióide Não endometrióide
<b>ESMO 2016</b> <sup>38</sup>	Grau 1-2; IA Sem ILV	Grau 1-2; IB s/ ILV	Grau 3; IA c/ ou s/ ILV Grau 1-2; IA ou IB c/ ILV	Grau 3; IB c/ ou s/ ILV II-III endometrióide Não endometrióide
<b>ESMO modificada</b> <sup>42</sup>	Grau 1-2; IA Sem ILV	Grau 1-2; IA c/ ILV Grau 3; IA s/ ILV Grau 1-2; IB s/ ILV	Grau 3; IA c/ ILV Grau 1-2; IB c/ ILV Grau 3; IB s/ ILV	Grau 3; IB c/ ILV II-III endometrióide Não endometrióide
<b>Risco de Recidiva</b>	<b>&lt; 6%</b>	<b>6-10%</b>	<b>20-27%</b>	<b>35-64%</b>

FR – Fatores de risco GOG-99: grau 2-3; ILV; invasão do terço externo do miométrio; IM – invasão miométrio

Optamos em nosso estudo pela Classificação de Risco Modificada da ESMO, que foi definida após a publicação do estudo prospectivo multicêntrico de banco de dados que incluiu 496 pacientes demonstrando a influência da ILV no prognóstico das pacientes com câncer de endométrio em estágio inicial.<sup>42</sup> A classificação vigente da ESMO baseia-se no consenso de especialistas publicado em 2016 e tem como maior diferença para a classificação adotada no presente estudo por considerar que toda paciente com ILV deva ser classificada no mínimo como risco intermediário-alto.<sup>38, 138</sup> Após os novos laudos dados pelos patologistas

especialistas em oncoginecologia, encontramos um aumento na classificação de risco para 30 pacientes, das quais 11 mudaram para alto risco, diferente dos critérios de inclusão do nosso estudo. Manion *et al.* em 2008 avaliaram discrepâncias nos laudos histopatológicos em tumores gerais e demonstraram 9,0% de discordâncias menores e 2,3% de discordâncias maiores nos novos laudos. Os tumores ginecológicos foram os que apresentaram maiores discrepâncias, correspondendo a 24,2% do total.<sup>12</sup> Outra série exclusiva de tumores ginecológicos demonstrou 33% de alterações em relação aos laudos iniciais, com discordâncias maiores em 12% dos casos. O tumor ginecológico que apresentou as maiores alterações nesta série foi o câncer endometrial com 40 casos (65,5%) dos 63 descritos.<sup>129</sup> Em uma população de carcinoma endometrial de alto risco, diferente do presente estudo, Boer *et al.* demonstraram uma mudança de 43% nos itens reavaliados por patologistas especialistas, com 8% consideradas alterações importantes que excluíram as pacientes da participação no estudo PORTEC-3.<sup>13</sup>

Apesar da revisão anatomopatológica realizada por especialistas já ter sido bastante avaliada conforme a literatura descrita, em nenhum dos estudos foi realizada uma correlação entre as discrepâncias dos laudos histopatológicos e o risco de recorrência ou morte devido a possíveis alterações na classificação de risco do câncer de endométrio. No presente estudo, os pacientes que tiveram um *upstaging* após reanálise dos patologistas especialistas em oncoginecologia foram comparados em termos de risco de recorrência com aqueles pacientes que não tiveram alteração ou que tiveram um *downstaging*. Os dados do presente estudo não demonstraram diferença no risco de recorrência entre estes dois grupos. O prognóstico de pacientes com câncer de endométrio de risco baixo e intermediário é excelente o que pode influenciar nos desfechos que avaliamos. Além disso a amostra de 195 pacientes pode ser insuficiente para demonstrar diferenças de sobrevida numa população de bom prognóstico.

Avaliando outras variáveis histopatológicas, demonstramos que pacientes com carcinoma de endométrio com diferenciação escamosa de risco baixo e intermediário apresentam risco de recorrência 5,6 vezes maior quando comparado com pacientes com diagnóstico de carcinoma de endométrio.<sup>93</sup> A diferenciação escamosa mimetiza áreas de tumores sólidos, porém não entra na diferenciação do grau tumoral no estadiamento FIGO (grau 1 – menos de 5% da neoplasia é organizada como um crescimento sólido; grau 2 – 5% a 50% das neoplasias são organizadas em agrupamentos sólidos; grau 3 – mais de 50% das neoplasias formam massas sólidas).<sup>139</sup> Antigamente dividia-se em dois grupos o que

denominamos hoje diferenciação escamosa: adenoacantoma (diferenciação escamosa bem diferenciada) e carcinoma adenoescamoso (diferenciação escamosa indiferenciada). Abeler *et al.* publicaram uma coorte com 1985 casos com carcinoma de endométrio endometriode, dos quais 255 apresentavam diferenciação escamosa.<sup>140</sup> Os autores dividiram os tumores com diferenciação escamosa nos dois grupos acima descritos. A sobrevida global em cinco anos para todos os pacientes foi de 83,5%. O subgrupo de adenoacantoma apresentou 91,2% de taxa de sobrevida global em cinco anos e o subgrupo adenoescamoso 64,9%, confirmando um pior prognóstico. Os dados na literatura são muito conflitantes a respeito do prognóstico da diferenciação escamosa no câncer de endométrio, com alguns estudos confirmando pior prognóstico para este subtipo histológico<sup>141, 142</sup> e outros não confirmando este risco.<sup>143, 144</sup>

O presente estudo apresenta algumas limitações. Trata-se de um estudo retrospectivo e o material selecionado para análise esteve acondicionado por mais de uma década o que influenciou sobremaneira o resultado da imuno-histoquímica e da extração de DNA para sequenciamento do gene *POLE*, *TP53* e análise da instabilidade de microssatélite. Com os resultados falhos, não foi possível correlacionar a classificação molecular ou os marcadores de imuno-histoquímica com a análise de expressão do RNA via metodologia *NanoString* avaliada em nosso estudo. Outra limitação é o baixo número de pacientes recidivadas, o que pode ser explicado pelo bom prognóstico que pacientes com câncer de endométrio de risco baixo e intermediário apresentam. Faz-se necessário validar numa coorte prospectiva o escore do risco de recorrência da assinatura de quatro genes demonstrado no presente estudo.

Como pontos positivos podemos destacar a robustez da metodologia *NanoString* que conseguiu avaliar em material parafinado acondicionado há aproximadamente 10 anos a expressão diferencial do RNA de pacientes com ou sem recidiva com câncer de endométrio. Além disso focamos em uma subpopulação de excelente prognóstico para definir potenciais fatores de risco de recorrência associado. Todas as pacientes tiveram seus anátomo-patológicos revisados por dois patologistas especialistas em oncoginecologia com o intuito de minimizar os erros diagnósticos inerentes a esta metodologia conforme demonstrado em vários estudos.<sup>128, 129</sup> Foi ainda um estudo realizado em hospital oncológico terciário com protocolos bem definidos de tratamento que minimizam o risco de heterogeneidade nas amostras estudadas.

## 8 CONCLUSÕES

Nas pacientes diagnosticadas com carcinoma de endométrio de risco baixo e intermediário do Hospital de Câncer de Barretos entre janeiro de 2009 e dezembro de 2014 demonstramos:

- Ausência de diferença na sobrevida livre de doença entre pacientes que tiveram mudanças na estratificação de risco modificada da ESMO após terem seus laudos reavaliados por patologistas especialistas em oncoginecologia quando comparadas com pacientes que não apresentaram mudança na sua estratificação de risco após avaliação pelos mesmos profissionais (86,7% vs 88,0%;  $p = 0,77$ );
- 12 genes com RNA diferencialmente expressos quando comparados grupos com recidiva e sem recidiva. Quatro genes foram destacados (*FN1*, *DUSP4*, *LEF1* and *SMAD9*) após regressão logística pela técnica *backward stepwise*. O RRS foi calculado levando a uma curva ROC do modelo de 4 genes com AUC de 0,93, sensibilidade de 100% e especificidade de 72,7%.
- Pacientes com câncer de endométrio com diferenciação escamosa possuem risco de recidiva 5,6 vezes maior quando comparado com pacientes sem apresentar diferenciação escamosa nos laudos anátomo-patológicos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. *Cancer Statistics, 2021*. **CA Cancer J Clin**. 2021;71(1):7-33.
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. *Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012*. **Int J Cancer**. 2015;136(5):E359-86.
3. Aune D, Navarro Rosenblatt DA, Chan DS, Vingeliene S, Abar L, Vieira AR, et al. *Anthropometric factors and endometrial cancer risk: a systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies*. **Ann Oncol**. 2015;26(8):1635-48.
4. *Estimativa 2020: Incidência de Câncer no Brasil*. [Internet] Rio de Janeiro: INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva; 2020 [cited 11 Feb 2021]; Available from: [www.inca.gov.br/estimativa/2020/](http://www.inca.gov.br/estimativa/2020/).
5. Paulino E, de Melo AC, Silva-Filho AL, Maciel LF, Thuler LCS, Goss P, et al. *Panorama of Gynecologic Cancer in Brazil*. **JCO Glob Oncol**. 2020;6:1617-30.
6. Paulino E, Nogueira-Rodrigues A, Goss PE, Faroni L, Guitmann G, Strasser-Weippl K, et al. *Endometrial Cancer in Brazil: Preparing for the Rising Incidence*. **Rev Bras Ginecol Obstet**. 2018;40(10):577-9.
7. Samarathai N, Hall K, Yeh IT. *Molecular profiling of endometrial malignancies*. **Obstet Gynecol Int**. 2010;2010:162363.
8. McPherson CP, Sellers TA, Potter JD, Bostick RM, Folsom AR. *Reproductive factors and risk of endometrial cancer. The Iowa Women's Health Study*. **Am J Epidemiol**. 1996;143(12):1195-202.
9. Cancer CGoESoE. *Endometrial cancer and oral contraceptives: an individual participant meta-analysis of 27 276 women with endometrial cancer from 36 epidemiological studies*. **Lancet Oncol**. 2015;16(9):1061-70.
10. Bokhman JV. *Two pathogenetic types of endometrial carcinoma*. **Gynecol Oncol**. 1983;15(1):10-7.
11. Cirisano FD, Jr., Robboy SJ, Dodge RK, Bentley RC, Krigman HR, Synan IS, et al. *Epidemiologic and surgicopathologic findings of papillary serous and clear cell endometrial cancers when compared to endometrioid carcinoma*. **Gynecol Oncol**. 1999;74(3):385-94.
12. Manion E, Cohen MB, Weydert J. *Mandatory second opinion in surgical pathology referral material: clinical consequences of major disagreements*. **Am J Surg Pathol**. 2008;32(5):732-7.

13. de Boer SM, Wortman BG, Bosse T, Powell ME, Singh N, Hollema H, et al. *Clinical consequences of upfront pathology review in the randomised PORTEC-3 trial for high-risk endometrial cancer.* **Ann Oncol.** 2018;29(2):424-30.
14. de Boer SM, Powell ME, Mileshkin L, Katsaros D, Bessette P, Haie-Meder C, et al. *Adjuvant chemoradiotherapy versus radiotherapy alone for women with high-risk endometrial cancer (PORTEC-3): final results of an international, open-label, multicentre, randomised, phase 3 trial.* **Lancet Oncol.** 2018;19(3):295-309.
15. Lax SF. *Molecular genetic pathways in various types of endometrial carcinoma: from a phenotypical to a molecular-based classification.* **Virchows Arch.** 2004;444(3):213-23.
16. Piulats JM, Guerra E, Gil-Martin M, Roman-Canal B, Gatus S, Sanz-Pamplona R, et al. *Molecular approaches for classifying endometrial carcinoma.* **Gynecol Oncol.** 2017;145(1):200-7.
17. Lax SF, Kendall B, Tashiro H, Slebos RJ, Hedrick L. *The frequency of p53, K-ras mutations, and microsatellite instability differs in uterine endometrioid and serous carcinoma: evidence of distinct molecular genetic pathways.* **Cancer.** 2000;88(4):814-24.
18. Murali R, Soslow RA, Weigelt B. *Classification of endometrial carcinoma: more than two types.* **Lancet Oncol.** 2014;15(7):e268-78.
19. Kandoth C, Schultz N, Cherniack AD, Akbani R, Liu Y, Shen H, et al. *Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma.* **Nature.** 2013;497(7447):67-73.
20. Talhouk A, McConechy MK, Leung S, Li-Chang HH, Kwon JS, Melnyk N, et al. *A clinically applicable molecular-based classification for endometrial cancers.* **Br J Cancer.** 2015;113(2):299-310.
21. Stelloo E, Bosse T, Nout RA, MacKay HJ, Church DN, Nijman HW, et al. *Refining prognosis and identifying targetable pathways for high-risk endometrial cancer; a TransPORTEC initiative.* **Mod Pathol.** 2015;28(6):836-44.
22. Talhouk A, McConechy MK, Leung S, Yang W, Lum A, Senz J, et al. *Confirmation of ProMisE: A simple, genomics-based clinical classifier for endometrial cancer.* **Cancer.** 2017;123(5):802-13.
23. Talhouk A, Hoang LN, McConechy MK, Nakonechny Q, Leo J, Cheng A, et al. *Molecular classification of endometrial carcinoma on diagnostic specimens is highly concordant with final hysterectomy: Earlier prognostic information to guide treatment.* **Gynecol Oncol.** 2016;143(1):46-53.

24. Stelloo E, Nout RA, Osse EM, Jürgenliemk-Schulz IJ, Jobsen JJ, Lutgens LC, et al. *Improved Risk Assessment by Integrating Molecular and Clinicopathological Factors in Early-stage Endometrial Cancer-Combined Analysis of the PORTEC Cohorts.* **Clin Cancer Res.** 2016;22(16):4215-24.
  
25. Zeimet AG, Reimer D, Huszar M, Winterhoff B, Puistola U, Azim SA, et al. *L1CAM in early-stage type I endometrial cancer: results of a large multicenter evaluation.* **J Natl Cancer Inst.** 2013;105(15):1142-50.
  
26. Dellinger TH, Smith DD, Ouyang C, Warden CD, Williams JC, Han ES. *L1CAM is an independent predictor of poor survival in endometrial cancer - An analysis of The Cancer Genome Atlas (TCGA).* **Gynecol Oncol.** 2016;141(2):336-40.
  
27. Geels YP, Pijnenborg JM, Gordon BB, Fogel M, Altevogt P, Masadah R, et al. *L1CAM Expression is Related to Non-Endometrioid Histology, and Prognostic for Poor Outcome in Endometrioid Endometrial Carcinoma.* **Pathol Oncol Res.** 2016;22(4):863-8.
  
28. McMeekin DS, Trichtler DL, Cohn DE, Mutch DG, Lankes HA, Geller MA, et al. *Clinicopathologic Significance of Mismatch Repair Defects in Endometrial Cancer: An NRG Oncology/Gynecologic Oncology Group Study.* **J Clin Oncol.** 2016;34(25):3062-8.
  
29. Jiricny J, Nystrom-Lahti M. *Mismatch repair defects in cancer.* **Curr Opin Genet Dev.** 2000;10(2):157-61.
  
30. Peltomaki P. *Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer.* **J Clin Oncol.** 2003;21(6):1174-9.
  
31. Koebel CM, Vermi W, Swann JB, Zerafa N, Rodig SJ, Old LJ, et al. *Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state.* **Nature.** 2007;450(7171):903-7.
  
32. Hamanishi J, Mandai M, Ikeda T, Minami M, Kawaguchi A, Murayama T, et al. *Safety and Antitumor Activity of Anti-PD-1 Antibody, Nivolumab, in Patients With Platinum-Resistant Ovarian Cancer.* **J Clin Oncol.** 2015;33(34):4015-22.
  
33. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, Hwu WJ, Topalian SL, Hwu P, et al. *Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer.* **N Engl J Med.** 2012;366(26):2455-65.
  
34. Makker V, Taylor MH, Aghajanian C, Oaknin A, Mier J, Cohn AL, et al. *Lenvatinib Plus Pembrolizumab in Patients With Advanced Endometrial Cancer.* **J Clin Oncol.** 2020;38(26):2981-92.
  
35. Webber C, Gospodarowicz M, Sobin LH, Wittekind C, Greene FL, Mason MD, et al. *Improving the TNM classification: findings from a 10-year continuous literature review.* **Int J Cancer.** 2014;135(2):371-8.

36. Pecorelli S. *Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, and endometrium*. **Int J Gynaecol Obstet**. 2009;105(2):103-4.
37. Powell MA, et al. *Corpus Uteri - Carcinoma and Carcinosarcoma*. In: Amin MB, et al., editor. *AJCC Cancer Staging Manual*. 8th ed. **Chicago: Springer**; 2017. p. 661-9.
38. Colombo N, Creutzberg C, Amant F, Bosse T, Gonzalez-Martin A, Ledermann J, et al. *ESMO-ESGO-ESTRO Consensus Conference on Endometrial Cancer: diagnosis, treatment and follow-up*. **Ann Oncol**. 2016;27(1):16-41.
39. AlHilli MM, Mariani A, Bakkum-Gamez JN, Dowdy SC, Weaver AL, Peethambaram PP, et al. *Risk-scoring models for individualized prediction of overall survival in low-grade and high-grade endometrial cancer*. **Gynecol Oncol**. 2014;133(3):485-93.
40. Mariani A, Keeney GL, Aletti G, Webb MJ, Haddock MG, Podratz KC. *Endometrial carcinoma: paraaortic dissemination*. **Gynecol Oncol**. 2004;92(3):833-8.
41. Milam MR, Java J, Walker JL, Metzinger DS, Parker LP, Coleman RL. *Nodal metastasis risk in endometrioid endometrial cancer*. **Obstet Gynecol**. 2012;119(2 Pt 1):286-92.
42. Bendifallah S, Canlorbe G, Raimond E, Hudry D, Coutant C, Graesslin O, et al. *A clue towards improving the European Society of Medical Oncology risk group classification in apparent early stage endometrial cancer? Impact of lymphovascular space invasion*. **Br J Cancer**. 2014;110(11):2640-6.
43. dos Reis R, Burzawa JK, Tsunoda AT, Hosaka M, Frumovitz M, Westin SN, et al. *Lymphovascular Space Invasion Portends Poor Prognosis in Low-Risk Endometrial Cancer*. **Int J Gynecol Cancer**. 2015;25(7):1292-9.
44. Guntupalli SR, Zigelboim I, Kizer NT, Zhang Q, Powell MA, Thaker PH, et al. *Lymphovascular space invasion is an independent risk factor for nodal disease and poor outcomes in endometrioid endometrial cancer*. **Gynecol Oncol**. 2012;124(1):31-5.
45. Creasman WT, Morrow CP, Bundy BN, Homesley HD, Graham JE, Heller PB. *Surgical pathologic spread patterns of endometrial cancer. A Gynecologic Oncology Group Study*. **Cancer**. 1987;60(8 Suppl):2035-41.
46. Tornos C, Silva EG, el-Naggar A, Burke TW. *Aggressive stage I grade 1 endometrial carcinoma*. **Cancer**. 1992;70(4):790-8.

47. Lajer H, Elnegaard S, Christensen RD, Ortoft G, Schledermann DE, Mogensen O. *Survival after stage IA endometrial cancer; can follow-up be altered? A prospective nationwide Danish survey.* **Acta Obstet Gynecol Scand.** 2012;91(8):976-82.
48. Takeshima N, Hirai Y, Tanaka N, Yamawaki T, Yamauchi K, Hasumi K. *Pelvic lymph node metastasis in endometrial cancer with no myometrial invasion.* **Obstet Gynecol.** 1996;88(2):280-2.
49. Morrow CP, Bundy BN, Kurman RJ, Creasman WT, Heller P, Homesley HD, et al. *Relationship between surgical-pathological risk factors and outcome in clinical stage I and II carcinoma of the endometrium: a Gynecologic Oncology Group study.* **Gynecol Oncol.** 1991;40(1):55-65.
50. Hanahan D, Weinberg RA. *Hallmarks of cancer: the next generation.* **Cell.** 2011;144(5):646-74.
51. Geiss GK, Bumgarner RE, Birditt B, Dahl T, Dowidar N, Dunaway DL, et al. *Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs.* **Nat Biotechnol.** 2008;26(3):317-25.
52. Reis PP, Waldron L, Goswami RS, Xu W, Xuan Y, Perez-Ordóñez B, et al. *mRNA transcript quantification in archival samples using multiplexed, color-coded probes.* **BMC Biotechnol.** 2011;11:46.
53. Das K, Chan XB, Epstein D, Teh BT, Kim KM, Kim ST, et al. *NanoString expression profiling identifies candidate biomarkers of RAD001 response in metastatic gastric cancer.* **ESMO Open.** 2016;1(1):e000009.
54. Walter RF, Werner R, Vollbrecht C, Hager T, Flom E, Christoph DC, et al. *ACTB, CDKN1B, GAPDH, GRB2, RHOA and SDCBP Were Identified as Reference Genes in Neuroendocrine Lung Cancer via the nCounter Technology.* **PLoS One.** 2016;11(11):e0165181.
55. Nielsen T, Wallden B, Schaper C, Ferree S, Liu S, Gao D, et al. *Analytical validation of the PAM50-based Prosigna Breast Cancer Prognostic Gene Signature Assay and nCounter Analysis System using formalin-fixed paraffin-embedded breast tumor specimens.* **BMC Cancer.** 2014;14:177.
56. Shike M, Doane AS, Russo L, Cabal R, Reis-Filho JS, Gerald W, et al. *The effects of soy supplementation on gene expression in breast cancer: a randomized placebo-controlled study.* **J Natl Cancer Inst.** 2014;106(9).
57. Liu S, Chapman JA, Burnell MJ, Levine MN, Pritchard KI, Whelan TJ, et al. *Prognostic and predictive investigation of PAM50 intrinsic subtypes in the NCIC CTG MA.21 phase III chemotherapy trial.* **Breast Cancer Res Treat.** 2015;149(2):439-48.
58. Liu L, Mayes PA, Eastman S, Shi H, Yadavilli S, Zhang T, et al. *The BRAF and MEK Inhibitors Dabrafenib and Trametinib: Effects on Immune Function and in Combination with Immunomodulatory Antibodies Targeting PD-1, PD-L1, and CTLA-4.* **Clin Cancer Res.** 2015;21(7):1639-51.

59. Ioffe YJ, Chiappinelli KB, Mutch DG, Zigelboim I, Goodfellow PJ. *Phosphatase and tensin homolog (PTEN) pseudogene expression in endometrial cancer: a conserved regulatory mechanism important in tumorigenesis?* **Gynecol Oncol.** 2012;124(2):340-6.
60. Danaher P, Warren S, Ong S, Elliott N, Cesano A, Ferree S. *A gene expression assay for simultaneous measurement of microsatellite instability and anti-tumor immune activity.* **J Immunother Cancer.** 2019;7(1):15.
61. Cheng Y, Zhang X, Wang Z, Wang J. *Reconstruction of Immune Microenvironment and Signaling Pathways in Endometrioid Endometrial Adenocarcinoma During Formation of Lymphovascular Space Involvement and Lymph Node Metastasis.* **Front Oncol.** 2020;10:595082.
62. Morice P, Leary A, Creutzberg C, Abu-Rustum N, Darai E. *Endometrial cancer.* **Lancet.** 2016;387(10023):1094-108.
63. Walker JL, Piedmonte MR, Spirtos NM, Eisenkop SM, Schlaerth JB, Mannel RS, et al. *Laparoscopy compared with laparotomy for comprehensive surgical staging of uterine cancer: Gynecologic Oncology Group Study LAP2.* **J Clin Oncol.** 2009;27(32):5331-6.
64. Benedetti Panici P, Basile S, Maneschi F, Alberto Lissoni A, Signorelli M, Scambia G, et al. *Systematic pelvic lymphadenectomy vs. no lymphadenectomy in early-stage endometrial carcinoma: randomized clinical trial.* **J Natl Cancer Inst.** 2008;100(23):1707-16.
65. Kitchener H, Swart AM, Qian Q, Amos C, Parmar MK. *Efficacy of systematic pelvic lymphadenectomy in endometrial cancer (MRC ASTEC trial): a randomised study.* **Lancet.** 2009;373(9658):125-36.
66. Blake P, Swart AM, Orton J, Kitchener H, Whelan T, Lukka H, et al. *Adjuvant external beam radiotherapy in the treatment of endometrial cancer (MRC ASTEC and NCIC CTG EN.5 randomised trials): pooled trial results, systematic review, and meta-analysis.* **Lancet.** 2009;373(9658):137-46.
67. Creutzberg CL, van Putten WL, Koper PC, Lybeert ML, Jobsen JJ, Warlam-Rodenhuis CC, et al. *Surgery and postoperative radiotherapy versus surgery alone for patients with stage-1 endometrial carcinoma: multicentre randomised trial. PORTEC Study Group. Post Operative Radiation Therapy in Endometrial Carcinoma.* **Lancet.** 2000;355(9213):1404-11.
68. Kong A, Johnson N, Kitchener HC, Lawrie TA. *Adjuvant radiotherapy for stage I endometrial cancer: an updated Cochrane systematic review and meta-analysis.* **J Natl Cancer Inst.** 2012;104(21):1625-34.

69. Harris PA, Taylor R, Thielke R, Payne J, Gonzalez N, Conde JG. *Research electronic data capture (REDCap)—a metadata-driven methodology and workflow process for providing translational research informatics support.* **J Biomed Inform.** 2009;42(2):377-81.
70. Köbel M, Ronnett BM, Singh N, Soslow RA, Gilks CB, McCluggage WG. *Interpretation of P53 Immunohistochemistry in Endometrial Carcinomas: Toward Increased Reproducibility.* **Int J Gynecol Pathol.** 2019;38 Suppl 1(Iss 1 Suppl 1):S123-s31.
71. Reid-Nicholson M, Iyengar P, Hummer AJ, Linkov I, Asher M, Soslow RA. *Immunophenotypic diversity of endometrial adenocarcinomas: implications for differential diagnosis.* **Mod Pathol.** 2006;19(8):1091-100.
72. Dabbs DJ. *Diagnostic Immunohistochemistry E-Book: Theranostic and Genomic Applications.* 2017(Elsevier Health Sciences).
73. Khaliq S, Naidoo K, Attygalle AD, Kriplani D, Daley F, Lowe A, et al. *Optimised ARID1A immunohistochemistry is an accurate predictor of ARID1A mutational status in gynaecological cancers.* **J Pathol Clin Res.** 2018;4(3):154-66.
74. O'Malley DP, Yang Y, Boisot S, Sudarsanam S, Wang JF, Chizhevsky V, et al. *Immunohistochemical detection of PD-L1 among diverse human neoplasms in a reference laboratory: observations based upon 62,896 cases.* **Mod Pathol.** 2019;32(7):929-42.
75. Campanella NC, Berardinelli GN, Scapulatempo-Neto C, Viana D, Palmero EI, Pereira R, et al. *Optimization of a pentaplex panel for MSI analysis without control DNA in a Brazilian population: correlation with ancestry markers.* **Eur J Hum Genet.** 2014;22(7):875-80.
76. Yamane LS, Scapulatempo-Neto C, Alvarenga L, Oliveira CZ, Berardinelli GN, Almodova E, et al. *KRAS and BRAF mutations and MSI status in precursor lesions of colorectal cancer detected by colonoscopy.* **Oncol Rep.** 2014;32(4):1419-26.
77. Berardinelli GN, Scapulatempo-Neto C, Durães R, Antônio de Oliveira M, Guimarães D, Reis RM. *Advantage of HSP110 (T17) marker inclusion for microsatellite instability (MSI) detection in colorectal cancer patients.* **Oncotarget.** 2018;9(47):28691-701.
78. Britton H, Huang L, Lum A, Leung S, Shum K, Kale M, et al. *Molecular classification defines outcomes and opportunities in young women with endometrial carcinoma.* **Gynecol Oncol.** 2019;153(3):487-95.
79. Imboden S, Nastic D, Ghaderi M, Rydberg F, Rau TT, Mueller MD, et al. *Phenotype of POLE-mutated endometrial cancer.* **PLoS One.** 2019;14(3):e0214318.

80. da Silva LS, Mançano BM, de Paula FE, Dos Reis MB, de Almeida GC, Matsushita M, et al. *Expression of GNAS, TP53, and PTEN Improves the Patient Prognostication in Sonic Hedgehog (SHH) Medulloblastoma Subgroup.* **J Mol Diagn.** 2020;22(7):957-66.
81. Campanella NC, Silva EC, Dix G, de Lima Vazquez F, Escremim de Paula F, Berardinelli GN, et al. *Mutational Profiling of Driver Tumor Suppressor and Oncogenic Genes in Brazilian Malignant Pleural Mesotheliomas.* **Pathobiology.** 2020;87(3):208-16.
82. *nanoString.* [Internet] Seattle: Gray B., et al.; 2018 [cited 2018 Aug 10]; Available from: [www.nanostring.com](http://www.nanostring.com).
83. Durkalski VL, Palesch YY, Lipsitz SR, Rust PF. *Analysis of clustered matched-pair data.* **Stat Med.** 2003;22(15):2417-28.
84. Bewick V, Cheek L, Ball J. *Statistics review 8: Qualitative data - tests of association.* **Crit Care.** 2004;8(1):46-53.
85. Fay MP, Proschan MA. *Wilcoxon-Mann-Whitney or t-test? On assumptions for hypothesis tests and multiple interpretations of decision rules.* **Stat Surv.** 2010;4:1-39.
86. Landis JR, Koch GG. *The measurement of observer agreement for categorical data.* **Biometrics.** 1977;33(1):159-74.
87. Kim S, Sohn KA, Xing EP. *A multivariate regression approach to association analysis of a quantitative trait network.* **Bioinformatics.** 2009;25(12):i204-12.
88. Hicks SC, Irizarry RA. *quantro: a data-driven approach to guide the choice of an appropriate normalization method.* **Genome Biol.** 2015;16(1):117.
89. Waggott D, Chu K, Yin S, Wouters BG, Liu FF, Boutros PC. *NanoStringNorm: an extensible R package for the pre-processing of NanoString mRNA and miRNA data.* **Bioinformatics.** 2012;28(11):1546-8.
90. Gu Z, Eils R, Schlesner M. *Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data.* **Bioinformatics.** 2016;32(18):2847-9.
91. Mandrekar JN. *Receiver operating characteristic curve in diagnostic test assessment.* **J Thorac Oncol.** 2010;5(9):1315-6.
92. Eusebi P. *Diagnostic accuracy measures.* **Cerebrovasc Dis.** 2013;36(4):267-72.

93. Andrade DAP, da Silva VD, Matsushita GM, de Lima MA, Vieira MA, Andrade C, et al. *Squamous differentiation portends poor prognosis in low and intermediate-risk endometrioid endometrial cancer*. **PLoS One**. 2019;14(10):e0220086.
94. León-Castillo A, de Boer SM, Powell ME, Mileskin LR, Mackay HJ, Leary A, et al. *Molecular Classification of the PORTEC-3 Trial for High-Risk Endometrial Cancer: Impact on Prognosis and Benefit From Adjuvant Therapy*. **J Clin Oncol**. 2020;38(29):3388-97.
95. van den Heerik A, Horeweg N, Nout RA, Lutgens L, van der Steen-Banasik EM, Westerveld GH, et al. *PORTEC-4a: international randomized trial of molecular profile-based adjuvant treatment for women with high-intermediate risk endometrial cancer*. **Int J Gynecol Cancer**. 2020;30(12):2002-7.
96. Deng F, Mu J, Qu C, Yang F, Liu X, Zeng X, et al. *A Novel Prognostic Model of Endometrial Carcinoma Based on Clinical Variables and Oncogenomic Gene Signature*. **Front Mol Biosci**. 2020;7:587822.
97. Zhang J, Wang Z, Zhao R, An L, Zhou X, Zhao Y, et al. *An integrated autophagy-related gene signature predicts prognosis in human endometrial Cancer*. **BMC Cancer**. 2020;20(1):1030.
98. Wang Z, Zhang J, Liu Y, Zhao R, Zhou X, Wang H. *An Integrated Autophagy-Related Long Noncoding RNA Signature as a Prognostic Biomarker for Human Endometrial Cancer: A Bioinformatics-Based Approach*. **Biomed Res Int**. 2020;2020:5717498.
99. Tsang HF, Xue VW, Koh SP, Chiu YM, Ng LP, Wong SC. *NanoString, a novel digital color-coded barcode technology: current and future applications in molecular diagnostics*. **Expert Rev Mol Diagn**. 2017;17(1):95-103.
100. Eastel JM, Lam KW, Lee NL, Lok WY, Tsang AHF, Pei XM, et al. *Application of NanoString technologies in companion diagnostic development*. **Expert Rev Mol Diagn**. 2019;19(7):591-8.
101. Veldman-Jones MH, Brant R, Rooney C, Geh C, Emery H, Harbron CG, et al. *Evaluating Robustness and Sensitivity of the NanoString Technologies nCounter Platform to Enable Multiplexed Gene Expression Analysis of Clinical Samples*. **Cancer Res**. 2015;75(13):2587-93.
102. Saunus JM, Smart CE, Kutasovic JR, Johnston RL, Kalita-de Croft P, Miranda M, et al. *Multidimensional phenotyping of breast cancer cell lines to guide preclinical research*. **Breast Cancer Res Treat**. 2018;167(1):289-301.
103. Moroney MR, Davies KD, Wilberger AC, Sheeder J, Post MD, Berning AA, et al. *Molecular markers in recurrent stage I, grade 1 endometrioid endometrial cancers*. **Gynecol Oncol**. 2019;153(3):517-20.

104. Hsu YT, Osmulski P, Wang Y, Huang YW, Liu L, Ruan J, et al. *EpCAM-Regulated Transcription Exerts Influences on Nanomechanical Properties of Endometrial Cancer Cells That Promote Epithelial-to-Mesenchymal Transition*. **Cancer Res**. 2016;76(21):6171-82.
105. Kasoha M, Dernektsi C, Seibold A, Bohle RM, Takacs Z, Ioan-Iulian I, et al. *Crosstalk of estrogen receptors and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in endometrial cancer*. **J Cancer Res Clin Oncol**. 2020;146(2):315-27.
106. Shelton DN, Fornalik H, Neff T, Park SY, Bender D, DeGeest K, et al. *The role of LEF1 in endometrial gland formation and carcinogenesis*. **PLoS One**. 2012;7(7):e40312.
107. Guo F, Zhang H, Jia Z, Cui M, Tian J. *Chemoresistance and targeting of growth factors/cytokines signalling pathways: towards the development of effective therapeutic strategy for endometrial cancer*. **Am J Cancer Res**. 2018;8(7):1317-31.
108. Jiang T, Wang S, Huang L, Zhang S. *Clinical significance of serum DKK-1 in patients with gynecological cancer*. **Int J Gynecol Cancer**. 2009;19(7):1177-81.
109. Yi N, Liao QP, Li ZH, Xie BJ, Hu YH, Yi W, et al. *RNA interference-mediated targeting of DKK1 gene expression in Ishikawa endometrial carcinoma cells causes increased tumor cell invasion and migration*. **Oncol Lett**. 2013;6(3):756-62.
110. Yi N, Liao QP, Li T, Xiong Y. *Novel expression profiles and invasiveness-related biology function of DKK1 in endometrial carcinoma*. **Oncol Rep**. 2009;21(6):1421-7.
111. André F, Ciruelos EM, Juric D, Loibl S, Campone M, Mayer IA, et al. *Alpelisib plus fulvestrant for PIK3CA-mutated, hormone receptor-positive, human epidermal growth factor receptor-2-negative advanced breast cancer: final overall survival results from SOLAR-1*. **Ann Oncol**. 2021;32(2):208-17.
112. Berg HF, Ju Z, Myrvold M, Fasmer KE, Halle MK, Hoivik EA, et al. *Development of prediction models for lymph node metastasis in endometrioid endometrial carcinoma*. **Br J Cancer**. 2020;122(7):1014-22.
113. Raglan O, Assi N, Nautiyal J, Lu H, Gabra H, Gunter MJ, et al. *Proteomic analysis of malignant and benign endometrium according to obesity and insulin-resistance status using Reverse Phase Protein Array*. **Transl Res**. 2020;218:57-72.
114. Fang D, Zhang C, Xu P, Liu Y, Mo X, Sun Q, et al. *S100A16 promotes metastasis and progression of pancreatic cancer through FGF19-mediated AKT and ERK1/2 pathways*. **Cell Biol Toxicol**. 2021.

115. Wu S, Ye S, Lin X, Chen Y, Zhang Y, Jing Z, et al. *Small hepatitis B virus surface antigen promotes malignant progression of hepatocellular carcinoma via endoplasmic reticulum stress-induced FGF19/JAK2/STAT3 signaling.* **Cancer Lett.** 2021;499:175-87.
116. Bai H, Zhou M, Zeng M, Han L. *PLA2G4A Is a Potential Biomarker Predicting Shorter Overall Survival in Patients with Non-M3/NPM1 Wildtype Acute Myeloid Leukemia.* **DNA Cell Biol.** 2020;39(4):700-8.
117. Lai Y, OuYang G, Sheng L, Zhang Y, Lai B, Zhou M. *Novel prognostic genes and subclasses of acute myeloid leukemia revealed by survival analysis of gene expression data.* **BMC Med Genomics.** 2021;14(1):39.
118. Hsu YT, Gu F, Huang YW, Liu J, Ruan J, Huang RL, et al. *Promoter hypomethylation of EpCAM-regulated bone morphogenetic protein gene family in recurrent endometrial cancer.* **Clin Cancer Res.** 2013;19(22):6272-85.
119. Gao L, Tian Q, Wu T, Shi S, Yin X, Liu L, et al. *Reduction of miR-744 delivered by NSCLC cell-derived extracellular vesicles upregulates SUV39H1 to promote NSCLC progression via activation of the Smad9/BMP9 axis.* **J Transl Med.** 2021;19(1):37.
120. Xin X, Li Y, Yang X. *SIX1 is overexpressed in endometrial carcinoma and promotes the malignant behavior of cancer cells through ERK and AKT signaling.* **Oncol Lett.** 2016;12(5):3435-40.
121. Suen AA, Jefferson WN, Wood CE, Padilla-Banks E, Bae-Jump VL, Williams CJ. *SIX1 Oncoprotein as a Biomarker in a Model of Hormonal Carcinogenesis and in Human Endometrial Cancer.* **Mol Cancer Res.** 2016;14(9):849-58.
122. Suen AA, Jefferson WN, Wood CE, Williams CJ. *SIX1 Regulates Aberrant Endometrial Epithelial Cell Differentiation and Cancer Latency Following Developmental Estrogenic Chemical Exposure.* **Mol Cancer Res.** 2019;17(12):2369-82.
123. Li HL, Sun JJ, Ma H, Liu SJ, Li N, Guo SJ, et al. *MicroRNA-23a inhibits endometrial cancer cell development by targeting SIX1.* **Oncol Lett.** 2019;18(4):3792-802.
124. Friedenreich CM, Langley AR, Speidel TP, Lau DC, Courneya KS, Csizmadi I, et al. *Case-control study of inflammatory markers and the risk of endometrial cancer.* **Eur J Cancer Prev.** 2013;22(4):374-9.
125. Linkov F, Goughnour SL, Adambekov S, Lokshin A, Kelley JL, Sukumvanich P, et al. *Inflammatory biomarker in adipose stem cells of women with endometrial cancer.* **Biomark Med.** 2018;12(9):945-52.

126. Fujimoto J, Aoki I, Khatun S, Toyoki H, Tamaya T. *Clinical implications of expression of interleukin-8 related to myometrial invasion with angiogenesis in uterine endometrial cancers.* **Ann Oncol.** 2002;13(3):430-4.
127. Wang L, Yang B, Jiang H, Yu G, Feng M, Lu X, et al. *The molecular mechanism study of insulin in promoting wound healing under high-glucose conditions.* **J Cell Biochem.** 2019;120(9):16244-53.
128. Grevenkamp F, Kommos F, Kommos F, Lax S, Fend F, Wallwiener D, et al. *Second Opinion Expert Pathology in Endometrial Cancer: Potential Clinical Implications.* **Int J Gynecol Cancer.** 2017;27(2):289-96.
129. Chafe S, Honore L, Pearcey R, Capstick V. *An analysis of the impact of pathology review in gynecologic cancer.* **Int J Radiat Oncol Biol Phys.** 2000;48(5):1433-8.
130. Leitao MM, Jr., Kehoe S, Barakat RR, Alektiar K, Gattoc LP, Rabbitt C, et al. *Accuracy of preoperative endometrial sampling diagnosis of FIGO grade 1 endometrial adenocarcinoma.* **Gynecol Oncol.** 2008;111(2):244-8.
131. Wang XY, Pan ZM, Chen XD, Lü WG, Xie X. *Accuracy of tumor grade by preoperative curettage and associated clinicopathologic factors in clinical stage I endometrioid adenocarcinoma.* **Chin Med J (Engl).** 2009;122(16):1843-6.
132. Mitchard J, Hirschowitz L. *Concordance of FIGO grade of endometrial adenocarcinomas in biopsy and hysterectomy specimens.* **Histopathology.** 2003;42(4):372-8.
133. Kurman RJ, Carcangiu ML, Herrington CS, Young RH. *Tumours of the uterine corpus.* **WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs.** 4th Edition ed. **Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC);** 2014. p. 121-54.
134. Keys HM, Roberts JA, Brunetto VL, Zaino RJ, Spirtos NM, Bloss JD, et al. *A phase III trial of surgery with or without adjunctive external pelvic radiation therapy in intermediate risk endometrial adenocarcinoma: a Gynecologic Oncology Group study.* **Gynecol Oncol.** 2004;92(3):744-51.
135. Vargas R, Rauh-Hain JA, Clemmer J, Clark RM, Goodman A, Growdon WB, et al. *Tumor size, depth of invasion, and histologic grade as prognostic factors of lymph node involvement in endometrial cancer: a SEER analysis.* **Gynecol Oncol.** 2014;133(2):216-20.
136. Conlon N, Leitao MM, Jr., Abu-Rustum NR, Soslow RA. *Grading uterine endometrioid carcinoma: a proposal that binary is best.* **Am J Surg Pathol.** 2014;38(12):1583-7.
137. Soslow RA, Tornos C, Park KJ, Malpica A, Matias-Guiu X, Oliva E, et al. *Endometrial Carcinoma Diagnosis: Use of FIGO Grading and Genomic Subcategories in Clinical Practice: Recommendations of*

*the International Society of Gynecological Pathologists. Int J Gynecol Pathol.* 2019;38 Suppl 1(Iss 1 Suppl 1):S64-s74.

138. Colombo N, Creutzberg C, Querleu D, Barahona M, Sessa C. *Appendix 5: Endometrial cancer: eUpdate published online 8 June 2017 ([www.esmo.org/Guidelines/Gynaecological-Cancers](http://www.esmo.org/Guidelines/Gynaecological-Cancers))*. **Ann Oncol.** 2017;28(suppl\_4):iv153-iv6.

139. Blanco LZ, Jr., Heagley DE, Lee JC, Gown AM, Gattuso P, Rotmensch J, et al. *Immunohistochemical characterization of squamous differentiation and morular metaplasia in uterine endometrioid adenocarcinoma*. **Int J Gynecol Pathol.** 2013;32(3):283-92.

140. Abeler VM, Kjørstad KE. *Endometrial adenocarcinoma with squamous cell differentiation*. **Cancer.** 1992;69(2):488-95.

141. Misirlioglu S, Guzel AB, Gulec UK, Gumurdulu D, Vardar MA. *Prognostic factors determining recurrence in early-stage endometrial cancer*. **Eur J Gynaecol Oncol.** 2012;33(6):610-4.

142. Jiang W, Chen J, Tao X, Huang F, Zhu M, Wang C, et al. *Possible Risk Factors of Pulmonary Metastases in Patients With International Federation of Gynecology and Obstetrics Stage I Endometrioid-Type Endometrial Cancer*. **Int J Gynecol Cancer.** 2017;27(6):1206-15.

143. Zaino RJ, Kurman R, Herbold D, Gliedman J, Bundy BN, Voet R, et al. *The significance of squamous differentiation in endometrial carcinoma. Data from a Gynecologic Oncology Group study*. **Cancer.** 1991;68(10):2293-302.

144. Sturgeon SR, Sherman ME, Kurman RJ, Berman ML, Mortel R, Twiggs LB, et al. *Analysis of histopathological features of endometrioid uterine carcinomas and epidemiologic risk factors*. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** 1998;7(3):231-5.

## ANEXOS

### ANEXO 1. Carta de aprovação do CEP (Comitê de Ética em Pesquisa).



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** RECLASSIFICAÇÃO ANÁTOMO-PATOLÓGICA E MOLECULAR DO CÂNCER DE ENDOMÉTRIO DE RISCO BAIXO E INTERMEDIÁRIO.

**Pesquisador:** Ricardo dos Reis

**Área Temática:**

**Versão:** 5

**CAAE:** 64078417.6.1001.5437

**Instituição Proponente:** Fundação Pio XII

**Patrocinador Principal:** Fundação Pio XII

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.821.503

##### Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos denominados "apresentação do projeto", "objetivos" e "avaliação dos riscos e benefícios" foram retiradas do documento intitulado "PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_1188996\_E3.pdf" (submetido na Plataforma Brasil em 20/12/2020).

##### RESUMO:

O câncer de endométrio é a neoplasia ginecológica mais frequente nos países desenvolvidos e a segunda nos países em desenvolvimento. O principal fator de risco é a grande exposição crônica ao estrógeno por parte da paciente, quer de maneira endógena (síndrome plurimetabólica, longos períodos anovulatórios, menarca precoce, menopausa tardia) ou exógena (ingestão de estrogênio exógeno). Tradicionalmente classifica-se o carcinoma de endométrio em tipo I ou endometrióide e tipo II (serosos e células claras). Este modelo dualístico de classificação apresenta um caráter prático, porém na maioria das vezes não se correlaciona em termos prognósticos ou terapêuticos a serem adotados. Além disso há uma grande dificuldade na reprodutibilidade dos resultados anátomo-patológicos tanto inter-examinador quanto intra-examinador. Nos últimos anos, inúmeros estudos estão sendo realizados no intuito de se descobrir as vias carcinogênicas implicadas no desenvolvimento do carcinoma de endométrio. A transformação do epitélio normal em neoplásico parece estar relacionada a diversas mutações nos genes PTEN, PIK3CA, TP53, KRAS,

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331  
 Bairro: Dr. Paulo Prata CEP: 14.784-400  
 UF: SP Município: BARRETOS  
 Telefone: (17)3321-0347 Fax: (17)3321-6600 E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br



## HOSPITAL DO CÂNCER DE BARRETOS / FUNDAÇÃO PIO XII



Continuação do Parecer: 3.821.503

CTNNB1 e instabilidade de microssatélite. Estudo do sequenciamento genético do carcinoma de endométrio demonstrou a subdivisão do mesmo em quatro grandes subgrupos: polimerase E (POLE) ultramutado; instabilidade de microssatélite (MSI-H); número de cópias baixas; número de cópias altas (serous-like). Com o intuito de tornar esta classificação mais reprodutível e menos onerosa, novos estudos conseguiram classificar o câncer de endométrio em quatro grupos prognósticos, realizando o sequenciamento genético do domínio exonuclease do gene POLE e o diagnóstico por imuno-histoquímica (IHQ) no defeito das proteínas de reparo ao dano do DNA e da deficiência ou não da proteína tumoral citoplasmática 53 (p53). Este estudo de coorte retrospectiva realizada em pacientes com carcinoma de endométrio de baixo e intermediário risco objetiva confrontar o diagnóstico histológico dado por patologistas especialistas em oncoginecologia e na sequência definir o perfil molecular dos casos recidivados pareando os mesmos por idade e estadiamento com dois controles que não apresentaram recidiva. A análise molecular será feita através da expressão do ácido ribonucleico tumoral (RNA) pela técnica do nanostring e da extração do ácido desoxirribonucleico (DNA) e avaliações de imuno-histoquímica com o objetivo de definir nestas pacientes a classificação molecular pragmática já definida na literatura.

### INTRODUÇÃO:

1.1 Epidemiologia O câncer ginecológico representa um grave problema de saúde em todos os países, apresentando, porém, situações peculiares considerando-se o status de país desenvolvido ou subdesenvolvido. Nos países do hemisfério norte, os chamados países desenvolvidos, a estatística mostra que os tumores do corpo uterino são os mais prevalentes e responsáveis pela maior mortalidade no grupo de tumores ginecológicos. Já nos países em desenvolvimento, o câncer de colo de útero é o que apresenta maior prevalência e mortalidade dos tumores do trato genital feminino.<sup>1,2</sup> Dados da estimativa anual americana do SEER (Surveillance, Epidemiology, and End Results Program) de 2018 mostram que o câncer do corpo do útero será responsável por mais de 60000 casos novos de câncer, representando quase 60% de todos os tumores ginecológicos esperados para o presente ano neste país.<sup>1</sup> Quando analisamos as curvas das últimas décadas, há um aumento nítido de novos casos deste tumor, não só na população negra, fato visto há décadas, como também na população branca. A explicação para o aumento na incidência de casos de câncer de endométrio possivelmente correlaciona-se com os hábitos alimentares dos americanos e o número cada vez maior de obesos naquele país.<sup>3</sup> Além disso, houve uma inversão na curva de mortalidade relacionada com esta doença, com um aumento de

**Endereço:** Rua Antenor Duarte Vilela, 1331  
**Bairro:** Dr. Paulo Prata **CEP:** 14.784-400  
**UF:** SP **Município:** BARRETOS  
**Telefone:** (17)3321-0347 **Fax:** (17)3321-6600 **E-mail:** cep@hcancerbarretos.com.br



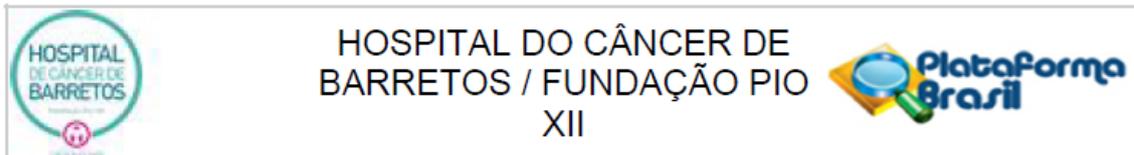
Continuação do Parecer: 3.821.503

mortes desde o início dos anos 2000. No Brasil, os dados estatísticos de câncer são escassos, sendo o mais confiável o publicado pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA). Dados da estimativa 2018, que contempla o biênio 2018-2019, mostram que o câncer de corpo de útero é responsável por aproximadamente 7000 casos novos por ano, sendo o 7º tumor mais prevalente no sexo feminino e o 2º tumor ginecológico mais frequente. Independente de qual região geográfica do país, o câncer de colo de útero é mais prevalente que o de endométrio, sendo a região sudeste a que mais se aproxima do cenário dos países desenvolvidos.

4 1.2 Fisiopatologia e fatores de risco Os tumores do corpo uterino podem ter sua origem de duas linhagens celulares principais, a saber: 90% deles são de origem epitelial (os chamados carcinomas de endométrio) e os 10% restantes desenvolvem-se do componente mesenquimal do útero. Com isso há uma subdivisão que compreende os carcinomas endometriais (incluindo os carcinosarcomas) e os sarcomas do estroma endometrial.<sup>5</sup> Os fatores de risco do câncer de corpo de útero estão atrelados diretamente à grande exposição de estrógeno por parte da paciente durante toda sua vida. As situações vivenciadas pelas mulheres que aumentam a exposição do estrógeno são: idade precoce da menarca; menopausa tardia; baixa paridade; terapia de reposição hormonal de maneira inadvertida; síndrome plurimetabólica (obesidade, diabetes mellitus, dislipidemia, hipertensão arterial); presença de tumores secretores de estrogênio; longos períodos anovulatórios. Outro fator de risco importante deste tipo de câncer é a idade, sendo que apenas 15% dos diagnósticos acontecem abaixo dos 50 anos e somente 5% abaixo dos 40 anos.<sup>6</sup> O uso de contraceptivos hormonais é um fator de proteção visto que regulariza os ciclos menstruais diminuindo a exposição da mulher a ciclos anovulatórios com alta exposição de estrógeno.<sup>7</sup>

1.3 Classificação anatomopatológica clássica O conceito tradicional do câncer de endométrio divide esta patologia em dois grandes grupos: tipo I (endometrióide) e tipo II (serosos e células claras). Estes dois grupos apresentam mecanismos de desenvolvimento distintos, com diferentes lesões precursoras, diferentes anormalidades genéticas e moleculares e como consequência diferentes resultados clínicos. Este modelo dualístico na prática clínica não representa uma boa correlação tanto de prognóstico quanto de terapias que devam ser adotadas.<sup>8</sup> O tipo I compreende 80% dos diagnósticos de câncer de endométrio tendo como protótipo o adenocarcinoma endometrióide moderadamente ou bem diferenciado. Acomete mulheres na menopausa e normalmente está associado à síndrome plurimetabólica (obesidade; diabetes mellitus; dislipidemia), com baixo potencial de invasividade do miométrio e alta expressão de receptores de estrógeno, cursando com um melhor prognóstico.<sup>9</sup> O tipo II corresponde a 10-20% dos carcinomas endometriais, sendo o subtipo seroso de alto grau o mais prevalente dentro deste grupo heterogêneo de

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331  
 Bairro: Dr. Paulo Prata CEP: 14.784-400  
 UF: SP Município: BARRETOS  
 Telefone: (17)3321-0347 Fax: (17)3321-6600 E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br

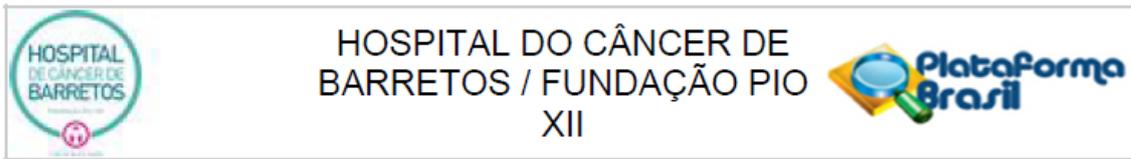


## HOSPITAL DO CÂNCER DE BARRETOS / FUNDAÇÃO PIO XII

Continuação do Parecer: 3.821.503

tumores. Está associado à atrofia endometrial, com baixa expressão de receptores hormonais e maior potencial de invasão linfovascular e metástase à distância.<sup>9</sup> 1.4 Classificação morfológica do câncer de endométrio A classificação simplificada do câncer de endométrio em dois grupos mutuamente exclusivos esbarra em um segundo problema que é a reprodutibilidade dos diagnósticos.<sup>10</sup> 11 O patologista avalia em seu lado as seguintes características morfológicas, dentre outras: subtipo histológico (endometrióide, mucinoso, serosopapilífero, células claras, adenoescamoso, indiferenciado, endometrióide com focos de diferenciação escamosa, carcinoma misto); profundidade de invasão miometrial do tumor (diferencia-se assim os tumores de estágio IA do IB); grau histológico tumoral (grau 1 – bem diferenciado; grau 2 – moderadamente diferenciado; grau 3 – pouco diferenciado ou indiferenciado); presença ou ausência de invasão linfovascular na peça tumoral. A avaliação de segunda opinião de patologistas é uma prática diária em serviços de oncologia com o intuito de se confirmar um diagnóstico previamente definido. A avaliação do impacto desta consulta é difícil de se mensurar. Estudo retrospectivo da Universidade de Iowa com mais de 5600 avaliações de segunda opinião tentou quantificar as mudanças nos laudos prévios em 3 grupos: nenhuma discordância diagnóstica; discordância diagnóstica mínima; discordância diagnóstica maior. Houve discordância geral nos laudos em pouco mais de 11% dos casos, sendo que 2,3% foram discordâncias maiores. Avaliando por grupos de patologia, a que apresentou maior taxa de discordância foi a do trato reprodutivo feminino (24%).<sup>10</sup> O estudo multicêntrico PORTEC-3 incluiu 686 pacientes com diagnóstico de carcinoma de endométrio de alto risco (estádio IB – carcinoma endometrióide grau 3 com ou sem invasão linfovascular; estágio II ou III do tipo endometrióide; estágio I a III com histologia serosa ou células claras) que foram randomizadas para tratamento combinado de quimioterapia + radioterapia ou radioterapia exclusiva.<sup>12</sup> Para tanto, os resultados anátomo-patológicos eram revisados centralmente antes das pacientes serem incluídas no estudo com o intuito de se confirmar um carcinoma de alto risco. Dois centros europeus que participaram deste estudo (Holanda e Inglaterra) enviaram mais de 1200 amostras de pacientes supostamente classificadas como de alto risco para serem avaliadas, porém apenas 329 pacientes tiveram a confirmação de serem de alto risco. Aproveitando o extenso banco de dados formado, avaliou-se a discrepância dos laudos dos patologistas regionais que fizeram o primeiro diagnóstico com os dos patologistas do time central do estudo PORTEC-3. As variáveis analisadas no laudo anátomo-patológico foram: tipo histológico; grau tumoral; profundidade de invasão miometrial; distância tumoral até a serosa; invasão linfo-vascular; envolvimento do estroma cervical; envolvimento de anexos e/ou ovários; envolvimento linfonodal. Houve uma taxa de discrepância em pelo menos um dos itens avaliados de 43%, demonstrando

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331  
 Bairro: Dr. Paulo Prata CEP: 14.784-400  
 UF: SP Município: BARRETOS  
 Telefone: (17)3321-0347 Fax: (17)3321-6600 E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br



## HOSPITAL DO CÂNCER DE BARRETOS / FUNDAÇÃO PIO XII

Continuação do Parecer: 3.821.503

assim a dificuldade de reprodutibilidade do diagnóstico de um carcinoma de endométrio por dois patologistas diferentes.<sup>11</sup> 1.5 Patologia molecular Nas últimas duas décadas, vários estudos com o objetivo de melhorar a caracterização molecular do carcinoma endometrial têm demonstrado que a complexidade da fisiopatologia deste tumor é muito maior do que o modelo dualístico acima descrito.<sup>13, 14</sup> As mutações mais prevalentes em cada um dos dois grandes subgrupos tradicionais são: tipo I (PTEN; MSI; via da PIK3CA); tipo II (TP53; PPP2R1A; amplificação do Her-2).<sup>14, 15</sup> Após caracterização genômica do tumor de endométrio realizada em 2013, quatro grandes grupos genéticos foram determinados: polimerase E (POLE) ultramutado; instabilidade de microssatélite (MSI-H); número de cópias baixas; número de cópias altas (serous-like). Esta classificação é extremamente difícil de ser colocada em prática devido a necessidade da caracterização genômica dos tumores.<sup>16</sup> Desde então inúmeras outras classificações têm sido realizadas no intuito de aperfeiçoar o prognóstico destas pacientes e proporcionar possíveis tratamentos complementares (quimioterapia e/ou radioterapia e/ou cirurgias mais extensas) que beneficiariam as pacientes em termos de sobrevida.

1.5.1 TCGA (The Cancer Genome Atlas) Através de um consórcio internacional, 373 pacientes com diagnóstico de câncer de endométrio (306 do subtipo endometrióide, 53 serosos de alto grau e 13 de histologia mista) tiveram suas amostras tumorais e DNA (ácido desoxirribonucleico) germinativo correspondente analisados. Foi realizada uma primeira análise em 363 pacientes quanto ao número de alterações em cópias somáticas, sendo identificado 4 grupos com as seguintes características:<sup>16</sup>

- Cluster 1: composto por tumores quase que desprovidos de alterações no número de cópias somáticas (< 0,5% de alteração do genoma) e sem apresentar eventos recorrentes significativos.
- Cluster 2: composto basicamente por tumores endometrióides com baixa amplificação no braço 1q o que lhes conferiram um melhor prognóstico em termos de recidiva.
- Cluster 3: também composto praticamente por tumores endometrióides porém com alta amplificação no braço 1q o que diminuiu a sobrevida livre de progressão quando comparado aos clusters 1 e 2.
- Cluster 4: composto por quase todos os tumores serosos de alto grau (50) e de histologia mista (8), além de tumores endometrióides de grau 3, caracterizado por alto grau de alterações no número de cópias somáticas, amplificação de oncogenes (MYC, ERBB2 e CCNE1) e mutação do TP53. Na sequência, em 248 pacientes, foi realizado o sequenciamento do exoma completo. Baseado nestas análises genéticas realizadas, houve a classificação dos tumores de endométrio em 4 grupos assim especificado:

- Polimerase E (POLE) ultramutado: grupo composto por tumores com alto número de mutações restrito a um único nucleotídeo localizado no domínio da exonuclease POLE (proteína catalítica da subunidade da DNA polimerase épsilon responsável pelo reparo e replicação do DNA

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331  
 Bairro: Dr. Paulo Prata CEP: 14.784-400  
 UF: SP Município: BARRETOS  
 Telefone: (17)3321-0347 Fax: (17)3321-6600 E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br



## HOSPITAL DO CÂNCER DE BARRETOS / FUNDAÇÃO PIO XII



Continuação do Parecer: 3.821.503

nuclear); grupo de melhor prognóstico. • Instabilidade de microssatélite (MSI-H): grupo composto por tumores com alta taxa mutacional (deleção frameshift no gene RPL22 e mutações não sinônimas no gene KRAS) e com presença de instabilidade de microssatélite (sobretudo hipermetilação do promotor MLH1). • Número de cópias somáticas baixas: tumores com alta frequência de mutação no gene CTNNB1; considerado um grupo com estabilidade de microssatélite. • Número de cópias altas (serous-like): a maioria dos tumores apresentando mutação no gene TP53 e alta frequência de mutações nos genes FBXW7 e PPP2R1A; grupo composto basicamente por tumores serosos e endometrióides de grau 3; grupo de pior prognóstico. A análise genética completa demonstrou a presença de 48 genes com diferentes frequências entre os grupos acima mencionados. As principais diferenças vistas correlacionando os genes expressos e o subgrupo são: mutação do gene ARIDB5 e inserção/deleção do gene RPL22 são vistos com maior frequência no grupo da instabilidade microssatélite; mutação no TP53 é quase que exclusiva no grupo número de cópias altas (serouslike); mutação do gene TP53 quando ocorre nos tumores endometrióides vêm acompanhada da mutação do gene PTEN.<sup>16</sup> Houve também a análise da expressão dos RNA (ácido ribonucleico) mensageiros, das proteínas codificadas, dos microRNA e da metilação do DNA. Ao se considerar a expressão dos RNA mensageiros, três grupos foram definidos com correlação com os 4 grupos previamente descritos: mitótico, hormonal e imunorreativo.

**1.5.2 CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR PRAGMÁTICA (ProMisE)** Com o advento da classificação molecular realizada pelo sequenciamento genético no TCGA, ficou claro a nova realidade do diagnóstico do câncer de endométrio. Por outro lado, há uma dificuldade enorme de se implementar na prática diária a metodologia desta nova classificação. Fez-se necessário o desenvolvimento de uma tecnologia de mais fácil reprodutibilidade e ao mesmo tempo com a mesma acurácia alcançada nos estudos do genoma do endométrio. ProMisE (Proactive Molecular Risk Classifier for Endometrial Cancer) foi a metodologia desenvolvida com o intuito de se determinar uma classificação molecular pragmática e simplificada.<sup>17</sup> Nesta metodologia também foram descritos 4 grupos: deficiência nas proteínas do reparo ao dano do DNA (mismatch repair proteins – MMR); mutação no domínio exonuclease da polimerase- (POLE); deficiência ou não na proteína 53 (p53).<sup>17, 18</sup> A primeira etapa desta classificação é realizar a pesquisa das proteínas de reparo ao DNA (MMR). Através da técnica de imunohistoquímica, pesquisa-se a presença ou ausência de 4 proteínas relacionadas ao reparo do DNA: MLH1; MSH2; MSH6; PMS2. O tumor apresenta danos ao reparo do DNA quando uma das quatro proteínas acima descritas está ausente nas células tumorais com controle interno positivo das células não tumorais. Os casos que não apresentaram deficiência nas proteínas de reparo ao DNA, realizaram

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331  
 Bairro: Dr. Paulo Prata CEP: 14.784-400  
 UF: SP Município: BARRETOS  
 Telefone: (17)3321-0347 Fax: (17)3321-6600 E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br



## HOSPITAL DO CÂNCER DE BARRETOS / FUNDAÇÃO PIO XII

Continuação do Parecer: 3.821.503

o sequenciamento genético do domínio exonuclease do gene POLE (éxons 9-14). Fez-se a extração do DNA tumoral dos blocos de parafina e pela técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase) detectou-se a presença de mutações neste referido gene. A terceira e última etapa consistia em avaliar através da imunohistoquímica se a proteína tumoral 53 (p53) apresentava-se com sua expressão normal. Era considerada normal (wild-type) quando a reação da IHQ desse score 1+ e anormal quando esta mesma reação desse score 0 ou 2+, sendo que score 0 representaria mutação com perda de função e score 2 mutação com ganho de função/missense. Estes dois resultados eram agrupados em conjunto considerando a p53 como ausente. Com isso 4 grupos prognósticos foram definidos com uma estreita correlação com os 4 grupos previamente descritos pelo TCGA: POLE ultramutado semelhantes em ambas as classificações; deficiência nas proteínas de reparo ao DNA correlacionando com o grupo da instabilidade microssatélite (MSI-H); p53 normal/wild-type correlacionando com o grupo número de cópias somáticas baixo; p53 ausente/anormal correlacionando com o grupo número de cópias altas (serous-like).<sup>17-19</sup>

1.6 Outros marcadores prognósticos e tratamentos relacionados Estudos recentes demonstraram a correlação da proteína de adesão L1CAM como fator de mau prognóstico independente para os tumores de endométrio iniciais.<sup>20</sup> Esta molécula é uma glicoproteína de membrana da superfamília das imunoglobulinas ligada ao processo de neurogênese. O potencial neoplásico desta proteína é sua relação com a proliferação celular, migração, invasão e potencial de metastatização através da ativação da via ERK (extracelular signal-regulatedkinase) que induz a expressão de genes produtores da motilidade e da invasividade celular.<sup>21</sup> Esta molécula é detectada através de técnica de imunohistoquímica, facilmente reproduzível nos laboratórios de patologia.<sup>22</sup> Uma nova classificação dos carcinomas de endométrio do subtipo endometrióide foi recentemente publicada levando-se em conta a presença da MSI. Os pesquisadores demonstraram quatro subgrupos, levando-se em conta apenas esta variável: normal; defeito epigenético; mutação provável; instabilidade de microssatélite baixa.<sup>23</sup> A instabilidade de microssatélite reflete a inativação dos genes do mismatch repair (MMR), genes responsáveis por eliminar erros no pareamento das bases nitrogenadas ou erros de inserção-deleção de loops que podem surgir durante a replicação do DNA.<sup>24</sup> Para o bom funcionamento deste mecanismo de auto regulação de defeitos na duplicação do DNA, são necessárias seis diferentes proteínas: MSH2; MSH3 ou MSH6; MLH1; MLH3; PMS2 e EXO1. A pesquisa da presença de instabilidade de microssatélite é feita através da expressão dos genes que codificam as proteínas acima descritas ou através da metilação do MLH1.<sup>25</sup> O entendimento da carcinogênese dos tumores e por consequência o tratamento dos mesmos sofreu uma mudança brusca nos últimos anos a partir da descoberta do

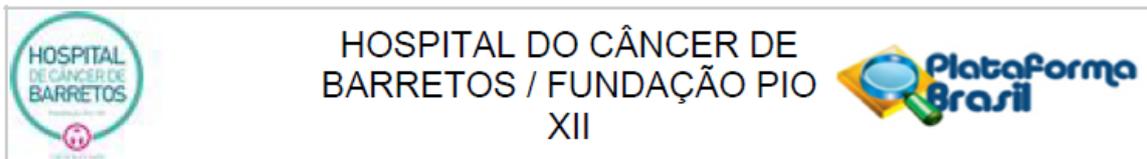
Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331  
 Bairro: Dr. Paulo Prata CEP: 14.784-400  
 UF: SP Município: BARRETOS  
 Telefone: (17)3321-0347 Fax: (17)3321-6600 E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br



Continuação do Parecer: 3.821.503

papel fundamental que o sistema imune tem de eliminar e controlar o crescimento tumoral inicial.<sup>26</sup> Apesar dos avanços da imunoterapia com novas perspectivas de tratamento para câncer de pulmão, melanoma, rim e bexiga, dentre outros, os tumores ginecológicos apresentam pouco benefício até o presente momento, com uma taxa de resposta objetiva variando entre 11-15%.<sup>27, 28</sup> A maior taxa de resposta a estas terapêuticas está claramente relacionada ao perfil imunogênico do tumor que traduz-se com a maior carga mutacional que cada subtipo tumoral apresenta.<sup>29</sup> Os distintos perfis mutacionais e distintas vias moleculares estão certamente associados a um perfil de expressão gênica distinta, no entanto, hoje não existe um painel gênico que possa realizar tal estratificação molecular das pacientes. 1.7 Estadiamento e Estratificação de Risco do Carcinoma de Endométrio Os sistemas de estadiamento de câncer descrevem a forma de propagação anatômica do mesmo e tentam agrupar pacientes com prognóstico e possibilidades terapêuticas no mesmo grupo de estadiamento. Os grupos de estadiamento baseiam-se no tamanho tumoral primário, na extensão linfonodal e na presença de metástases à distância.<sup>30</sup> O estadiamento atual da FIGO divide o câncer de endométrio em seis grandes grupos de acordo com o prognóstico: tumores com invasão máxima até o miométrio (estádio IA e IB); tumores com comprometimento do estroma cervical confinados ao útero (estádio II); tumores que se estendem além do útero mas permanecem confinados na pelve verdadeira (IIIA e IIIB); tumores que apresentam comprometimento linfonodal (IIIC); tumores metastáticos (IVA e IVB).<sup>31,32</sup> A expectativa de vida em 5 anos para pacientes com estágio IA é de 88,4% e para estágio IB de 75,1%.<sup>32</sup> A diferenciação entre estágio IA e IB é a profundidade de invasão miometrial do tumor, sendo que até 50% de invasão miometrial é classificado como IA e acima de 50% de invasão como IB.<sup>33</sup> Além da estratificação de risco realizada pelo estadiamento tumoral, outras variáveis são importantes na definição prognóstica do câncer de endométrio. Restringindo apenas ao estágio I, podemos subdividir estas pacientes em 3 grupos: baixo, intermediário e alto risco.<sup>34-36</sup> As duas variáveis implicadas nesta subdivisão são: invasão linfovascular e grau tumoral.<sup>37</sup> Inúmeros estudos mostram que a sobrevida das pacientes com estágio inicial apresenta diferenças unicamente com a presença de invasão linfovascular no espécime tumoral.<sup>38, 39</sup> Considerando tumores em estágio I em geral (44% de tumores estágio IB; 25% grau 3), há um risco de comprometimento extrauterino da ordem de 20%.<sup>40</sup> Outros fatores ainda não muito bem determinados em estudos prospectivos que podem influenciar a sobrevida das pacientes com carcinoma de endométrio estágio I são: oito ou mais figuras de mitose por 10 campos de grande aumento (CGA) e ausência de receptores de progesterona no tumor.<sup>41</sup> A expectativa de vida câncer específica desta população de baixo risco (carcinoma endometrióide estágio IA grau 1 ou 2)

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331  
 Bairro: Dr. Paulo Prata CEP: 14.784-400  
 UF: SP Município: BARRETOS  
 Telefone: (17)3321-0347 Fax: (17)3321-6600 E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br



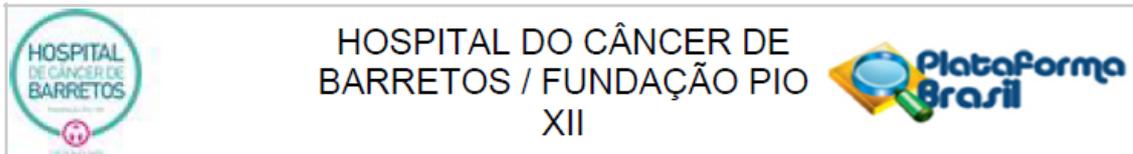
Continuação do Parecer: 3.821.503

em 5 anos é de 97,3%<sup>42</sup> e o risco de metástase linfonodal desta mesma população varia de menos de 5% para os tumores grau 1 até 5-9% para os tumores grau 2 ou 3.<sup>43</sup> Já nas pacientes de risco intermediário (carcinoma endometrióide estágio IB grau 1 ou 2 ou estágio IA grau 3), a porcentagem de comprometimento linfonodal pélvico e/ou para-aórtico ultrapassa 20%.<sup>43, 44</sup> 1.8 Assinatura genética À medida que o entendimento das várias cascatas responsáveis pelo desenvolvimento dos tumores foi sendo melhor compreendida e descrita,<sup>45</sup> inúmeras tecnologias estão sendo desenvolvidas no intuito de elucidar e baratear os custos de tais descobertas. A NanoString nCounter<sup>TM</sup> é uma tecnologia relativamente nova que pode gerar com grande acurácia informações genômicas a partir de pequenas quantidades de tecidos fixados de biópsias de pacientes. Esta plataforma usa código de barras digitais, codificadas por cores ou por um conjunto de códigos marcados por sondas de sequência específica, permitindo a quantificação da expressão do RNA mensageiro (mRNA).<sup>46, 47</sup> Inúmeras aplicações com esta tecnologia já foram publicadas: possíveis candidatos a biomarcadores no câncer gástrico<sup>48</sup>, câncer de pulmão neuroendócrino<sup>49</sup>, câncer de mama<sup>50</sup>, entre outros; detecção de marcadores preditivos e prognósticos em estudos placebo-controlados<sup>51</sup> ou estudos de fase 3 com quimioterapia<sup>52</sup>; detecção in vitro de moléculas imunomoduladoras expressas de acordo com resposta à tratamentos alvo em determinados tumores.<sup>53</sup> Até o presente momento nenhum estudo foi publicado avaliando esta ferramenta em pacientes com diagnóstico de carcinoma de endométrio.

#### HIPÓTESE:

O diagnóstico histopatológico do carcinoma de endométrio é de difícil reprodutibilidade, mesmo quando realizado por patologistas especialistas em oncoginecologia. É reconhecido que os tumores do trato genital feminino são os que possuem maior discordância no diagnóstico histopatológico, tanto em laudos inter-examinadores quanto em laudos intra-examinadores.<sup>10, 11</sup> A classificação molecular do carcinoma de endométrio em quatro subgrupos determinou uma maior acurácia na definição do prognóstico de cada paciente, minimizando os equívocos intra e interobservadores que ocorriam. A possibilidade de realizá-la em quase sua totalidade por técnicas de imuno-histoquímica (necessário apenas o sequenciamento genético do gene POLE) determina uma expectativa que logo esteja disponível para o uso diário do oncologista.<sup>17, 18</sup> Os adenocarcinomas de endométrio de risco baixo (carcinoma endometrióide estágio IA grau 1 ou 2) e de risco intermediário (carcinoma endometrióide estágio IB grau 1 ou 2; carcinoma endometrióide estágio IA grau 3) apresentam excelente prognóstico, com expectativa de vida em cinco anos de aproximadamente 90%.<sup>54</sup> O tratamento é cirúrgico, variando desde histerectomia

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331  
 Bairro: Dr. Paulo Prata CEP: 14.784-400  
 UF: SP Município: BARRETOS  
 Telefone: (17)3321-0347 Fax: (17)3321-6600 E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br



Continuação do Parecer: 3.821.503

com salpingooforectomia bilateral até necessidade de linfadenectomia pélvica e/ou para-aórtica associada.<sup>55-57</sup> Além disso, em alguns casos, há a necessidade de complementação de radioterapia adjuvante, sobretudo braquiterapia.<sup>58-60</sup> Porém se uma paciente for classificada erroneamente em um estágio de melhor prognóstico ela poderá ter suprimido um tratamento adjuvante que aumentaria sua chance de cura, assim como se a mesma for diagnosticada em um estágio de pior prognóstico poderá receber um tratamento que não era necessário e todas as consequências de seus efeitos colaterais. Faz-se necessário avaliar através de patologistas especialistas em oncoginecologia a porcentagem de discordância entre os diagnósticos anteriormente firmados e na sequência realizar a classificação molecular destas mesmas pacientes para comparar com os laudos histopatológicos delas fornecidos.

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

##### **OBJETIVO PRIMÁRIO:**

- Avaliar a discrepância existente nos laudos de patologia de pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma de endométrio de risco baixo e intermediário quando comparado a laudos feitos por dois patologistas especialistas em oncoginecologia.
- Realizar uma classificação molecular simplificada e pragmática utilizando sequenciamento genético e técnicas de imuno-histoquímica em pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma de endométrio de risco baixo e intermediário.

##### **OBJETIVO SECUNDÁRIO:**

- Determinar, através de um estudo de caso controle, uma assinatura genética em pacientes com diagnóstico de carcinoma de endométrio de risco baixo (carcinoma endometrióide estágio IA grau 1 ou 2) e intermediário (carcinoma endometrióide estágio IB grau 1 ou 2; carcinoma endometrióide estágio IA grau 3) que apresentaram ou não recidiva durante sua evolução.

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

##### **RISCOS:**

Sob o ponto de vista ético, o estudo confere risco mínimo, caracterizado pela quebra eventual de sigilo dos dados do paciente. Entretanto, os pesquisadores se comprometem a não divulgar esses dados e manter total sigilo.

##### **BENEFÍCIOS:**

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331		
Bairro: Dr. Paulo Prata		CEP: 14.784-400
UF: SP	Município: BARRETOS	
Telefone: (17)3321-0347	Fax: (17)3321-6600	E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br



Continuação do Parecer: 3.821.503

O estudo não trará benefícios diretos aos participantes. Contudo poderá descobrir uma assinatura genética preditora de risco que possa beneficiar determinadas pacientes com diagnóstico de carcinoma de endométrio de baixo grau (quimioterapia adjuvante?; radioterapia adjuvante?; cirurgia profilática?)

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A presente submissão trata-se de E3 ao projeto para aprovação dos seguintes documentos:

- Folha\_de\_Rosto.pdf
- Projeto\_Doutorado\_Definitivo1.docx
- Emenda\_3.docx
- Emenda\_3.pdf
- PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_1188996\_E3.pdf

**JUSTIFICATIVA DA EMENDA:**

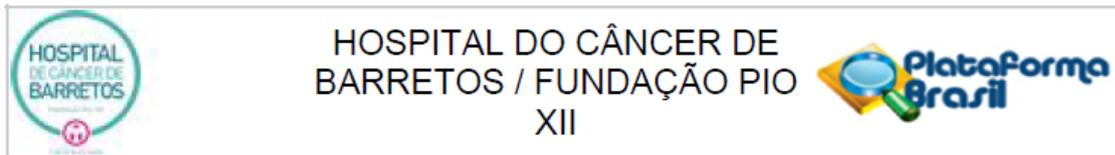
1. O que se propõe a EMENDA apresentada:

- Mudança do título do projeto para: Reclassificação anátomo-patológica e molecular do câncer de endométrio de risco baixo e intermediário
- Revisão da escrita do trabalho como um todo visto mudança na metodologia
- Retirada de todos os centros colaboradores que havíamos incluído previamente: ICESP; AC Camargo; Albert Einstein
- Retirada dos colaboradores dos centros retirados: Jesus Paula Carvalho, Glauco Baiocchi Neto e Renato Moretti Marques
- Retirada de Geórgia Fontes Cintra que deixou o projeto por se deligar da Fundação Pio XII.
- Inclusão do Dr. Ronaldo Luís Schmidt, novo integrante da equipe de oncoginecologia.

2. Item a ser revisado e onde localiza-lo do Projeto Completo:

- Folha de rosto com mudança do título
- Parte da Introdução
- Justificativa
- Objetivos
- Materiais e Métodos
- Análise Estatística

<b>Endereço:</b> Rua Antenor Duarte Vilela, 1331	
<b>Bairro:</b> Dr. Paulo Prata	<b>CEP:</b> 14.784-400
<b>UF:</b> SP	<b>Município:</b> BARRETOS
<b>Telefone:</b> (17)3321-0347	<b>Fax:</b> (17)3321-6600
	<b>E-mail:</b> cep@hcancerbarretos.com.br



Continuação do Parecer: 3.821.503

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

Todos os termos foram adequadamente apresentados.

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

Sem óbices éticos.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Pio XII - Hospital de Câncer de Barretos analisou o(s) seguinte(s) documento(s) do projeto 1330/2017, e:

- Aprovou a emenda ao estudo, submetida em 20/12/2019;

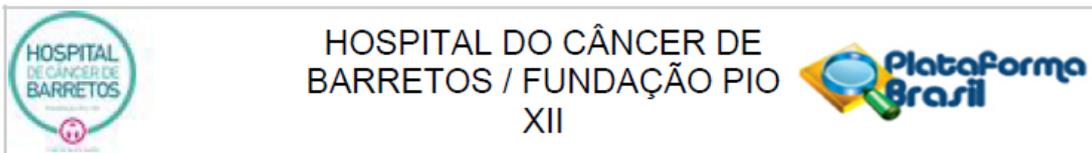
Após análise do(s) documento(s) supracitado(s), o Comitê faz a seguinte recomendação:

- O Estudo deve Continuar;
- O Estudo dever ser Interrompido;
- O Estudo está Finalizado;
- Solicita-se Esclarecimento;

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1188996_É3.pdf	20/12/2019 16:55:41		Aceito
Outros	Emenda_3.pdf	20/12/2019 16:53:38	DIOCÉSIO ALVES PINTO DE ANDRADE	Aceito
Outros	Emenda_3.docx	20/12/2019 16:51:19	DIOCÉSIO ALVES PINTO DE ANDRADE	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Doutorado_Definitivo1.docx	20/12/2019 16:49:53	DIOCÉSIO ALVES PINTO DE ANDRADE	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	20/12/2019 16:49:22	DIOCÉSIO ALVES PINTO DE ANDRADE	Aceito
Outros	Projeto_de_Doutorado_Baixo_Risco_enviado_ao_CEP_segunda_mudanca.doc	19/04/2018 15:18:15	DIOCÉSIO ALVES PINTO DE ANDRADE	Aceito

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331  
 Bairro: Dr. Paulo Prata CEP: 14.784-400  
 UF: SP Município: BARRETOS  
 Telefone: (17)3321-0347 Fax: (17)3321-6600 E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br



Continuação do Parecer: 3.821.503

Outros	Emenda_2.docx	19/04/2018 15:16:26	DIOCÉSIO ALVES PINTO DE ANDRADE	Aceito
Outros	Emenda_2.pdf	19/04/2018 15:14:09	DIOCÉSIO ALVES PINTO DE ANDRADE	Aceito
Outros	Emenda_oficial.pdf	24/11/2017 16:14:49	DIOCÉSIO ALVES PINTO DE ANDRADE	Aceito
Outros	Projeto_final.doc	24/11/2017 16:14:12	DIOCÉSIO ALVES PINTO DE ANDRADE	Aceito
Outros	Projeto_mudanca_final.doc	24/11/2017 16:12:25	DIOCÉSIO ALVES PINTO DE ANDRADE	Aceito
Outros	Carta_de_Resposta_pendencias.pdf	03/02/2017 11:40:36	DIOCÉSIO ALVES PINTO DE ANDRADE	Aceito
Outros	Carta_de_Resposta_pendencias.docx	03/02/2017 11:40:12	DIOCÉSIO ALVES PINTO DE ANDRADE	Aceito
Outros	Mabin.pdf	03/02/2017 08:03:59	DIOCÉSIO ALVES PINTO DE ANDRADE	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_Doutorado_Baixo_Risco_en viado_ao_CEP_definitivo.doc	26/01/2017 08:54:02	DIOCÉSIO ALVES PINTO DE ANDRADE	Aceito
Outros	Ciencia_Estudo.pdf	24/01/2017 12:40:01	DIOCÉSIO ALVES PINTO DE ANDRADE	Aceito
Outros	Responsabilidade_Pesquisador.pdf	24/01/2017 12:39:43	DIOCÉSIO ALVES PINTO DE ANDRADE	Aceito
Outros	Financiamento.pdf	24/01/2017 12:39:21	DIOCÉSIO ALVES PINTO DE ANDRADE	Aceito
Outros	Pesquisador_Externo.pdf	24/01/2017 12:38:57	DIOCÉSIO ALVES PINTO DE ANDRADE	Aceito
Brochura Pesquisa	Ficha_de_coleta_de_dados_enviado_ao _CEP.doc	16/01/2017 13:39:38	DIOCÉSIO ALVES PINTO DE ANDRADE	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331  
 Bairro: Dr. Paulo Prata CEP: 14.784-400  
 UF: SP Município: BARRETOS  
 Telefone: (17)3321-0347 Fax: (17)3321-6600 E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br



Continuação do Parecer: 3.821.503

Não

BARRETOS, 04 de Fevereiro de 2020

---

**Assinado por:**  
**Maicon Fernando Zanon da Silva**  
**(Coordenador(a))**

**Endereço:** Rua Antenor Duarte Vilela, 1331  
**Bairro:** Dr. Paulo Prata **CEP:** 14.784-400  
**UF:** SP **Município:** BARRETOS  
**Telefone:** (17)3321-0347 **Fax:** (17)3321-6600 **E-mail:** cep@hcancerbarretos.com.br

**ANEXO 2.** Ficha de coleta de dados clínicos, cirúrgicos e patológicos.**FICHA DE COLETA DE DADOS**

Número da Paciente na pesquisa:

Registro HCB:

 CASO     CONTROLE

Data de Nascimento: \_\_/\_\_/\_\_

Data da Primeira Consulta: \_\_/\_\_/\_\_

Data do diagnóstico: \_\_/\_\_/\_\_

Idade ao diagnóstico:

ECOG:

Raça:  Branca  Negra  Parda Outra: \_\_\_\_\_

Peso:        Kg

Altura:        cm

IMC (P/A\*A):

Cálculo:  Baixo Peso (17-18,5)  Normal (18,5-25)  Sobrepeso (25-30) Obesidade I (30-35)  Obesidade II (35-40)  Obesidade III (> 40)Estado hormonal: menacme  menopausa Paridade:  Não  Sim    G \_\_\_\_\_ P \_\_\_\_\_ A \_\_\_\_\_Tabagismo:  Fumante,  Ex-fumante,  Nunca fumouComorbidades Clínicas:  HAC  DM  Obesidade  Outros: \_\_\_\_\_

Data da Cirurgia: \_\_/\_\_/\_\_

**Estadiamento FIGO:** IA – menos que 50% de invasão do miométrioLocal da recidiva:  Pulmões  Fígado  SNC  Ossos  Peritônio Linfonodos  Vagina  Outros \_\_\_\_\_**Anátomo-patológico:**Localização do tumor:  fundo uterino  segmento uterino inferior

Tamanho do tumor (maior medida – mm):

Invasão da endocérvice:  Não  Sim

Subtipo histológico:

Grau histológico:  G1  G2  G3

Invasão miometrial

Sem Invasão    Invasão < 50%

Nº linfonodos dissecados:

Pélvico D:

Pélvico E:

Retroperitoneal:

Linfonodo Sentinela ( ) Não ( ) Sim

Se sim, (local e numero)

Pélvico D:

Pélvico E:

Linfonodos comprometidos ( ) Não ( ) Sim

Se sim, Numero e Local

Pélvico D:

Pélvico E:

Retroperitoneal:

Invasão angiolinfática: ( ) Sim ( ) Não

**Anátomo-patológico da revisão:**

Localização do tumor: ( ) fundo uterino ( ) segmento uterino inferior

Tamanho do tumor (maior medida – mm):

Invasão da endocérvice: ( ) Não ( ) Sim

Subtipo histológico:

Grau histológico: ( ) G1 ( ) G2 ( ) G3

Invasão miometrial

Sem Invasão    Invasão < 50%

Invasão angiolinfática: ( ) Sim ( ) Não

**Imunohistoquímica:**

Receptor de estrógeno: ( ) Sim ( ) Não \_\_\_\_\_ %

Receptor de progesterona: ( ) Sim ( ) Não \_\_\_\_\_ %

Expressão de L1CAM: ( ) Sim ( ) Não

Instabilidade microssatélite: ( ) Sim ( ) Não

**Tratamento:**

Tipo de cirurgia:

Via de Acesso: ( ) Laparotômica ( ) Laparoscópica ( ) Robótica ( )

Vaginal

Valor do CA 125 ao diagnóstico:

Data da recidiva: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_/

Local da recidiva:

Pélvica

Local (vaginal)

Fígado

Ossos

Peritoneo

Pulmão

Mediastino

Cérebro

Linfonodos pélvicos

Linfonodos retroperitoneais

Valor do CA 125 na recidiva:

Tratamento realizado para recidiva

Data da última avaliação:

Status da paciente na última avaliação:

( ) Viva sem doença ( ) Viva com doença ( ) Morte por doença ( ) Morte por qualquer causa

**Descrição genética (NANOSTRING)**

**ANEXO 3.** Tabela com vias de sinalização do *NanoString*.

<b>Via</b>	<b>Explicação</b>
<b>Notch</b>	Via de sinalização celular que atua principalmente no desenvolvimento de células embrionárias, coordenando diferenciação celular, proliferação celular e apoptose. Atua por um processo de inibição lateral competitiva possibilitando a diferenciação de determinadas células e garantindo que suas vizinhas não sigam o mesmo caminho.
<b>Wnt</b>	Regula diversos fenômenos e eventos durante o desenvolvimento embrionário (organogênese, diferenciação, polarização e migração celular). Tem duas vias: canônica (dependente do Wnt/Beta-Catenina) e não canônica.
<b>Hedgehog</b>	Responsável pelo desenvolvimento embrionário normal (crânio/caudal; direita/esquerda). Participa na regulação das células-tronco adultas envolvidas na manutenção e regeneração dos tecidos biológicos adultos.
<b>Alteração da Cromatina</b>	Envolvida na regulação do processo associado com alteração do DNA, proteínas ou RNA, influenciando na alteração da estrutura da cromatina.
<b>Regulação Transcricional</b>	Essa via é responsável pela regulação da conversão do DNA em RNA nas células.
<b>Reparo ao dano do DNA</b>	Responsável pela integridade do genoma celular (reparo por excisão de nucleotídeos; reparo por excisão por base; reparo por quebra de fita de DNA).
<b>TGF-beta</b>	Responsável pela proliferação, apoptose, diferenciação e migração celular através da secreção de citocinas.
<b>MAPK</b>	Via das proteínas quinases ativadas por mitógenos responsável pela proliferação, diferenciação e migração celular.
<b>JAK-STAT</b>	Regulada através de interações entre proteínas celulares envolvidas nos processos de imunidade, divisão celular, morte celular e formação tumoral.
<b>PI3K</b>	Importante na regulação do ciclo celular diretamente relacionada à transcrição, translação, proliferação, crescimento e sobrevivência.
<b>RAS</b>	Responsável com interruptores moleculares para as vias de sinalização regulando a proliferação, sobrevivência, crescimento, migração, diferenciação ou dinamismo celular.
<b>Ciclo celular</b>	responsável pelo controle do ciclo celular através de enzimas regulatórias chaves conhecidas com quinases dependentes de ciclinas (CDKs).
<b>Apoptose</b>	responsável pelo controle da morte celular regulando a homeostase do tecido, sendo compostas por vias extrínseca (Fas e membros da superfamília TNFr e ligantes) e intrínseca (associada à mitocôndria).

ANEXO 4. Artigo publicado relacionado à Tese.

**Artigo 1** – *Squamous differentiation portends poor prognosis in low and intermediate-risk endometrioid endometrial cancer.*



RESEARCH ARTICLE

## Squamous differentiation portends poor prognosis in low and intermediate-risk endometrioid endometrial cancer

Diocésio Alves Pinto de Andrade<sup>1,2\*†</sup>, Vinicius Duval da Silva<sup>3e</sup>, Graziela de Macedo Matsushita<sup>3†</sup>, Marcos Alves de Lima<sup>4†</sup>, Marcelo de Andrade Vieira<sup>5†</sup>, Carlos Eduardo Mattos Cunha Andrade<sup>5†</sup>, Ronaldo Luís Schmidt<sup>5†</sup>, Rui Manuel Reis<sup>2,6,7e</sup>, Ricardo dos Reis<sup>5e</sup>

**1** Department of Oncology, InORP ONCOCLÍNICAS Group (Oncology Institute of Ribeirão Preto), Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil, **2** Molecular Oncology Research Center, Barretos Cancer Hospital, Barretos, São Paulo, Brazil, **3** Department of Pathology, Barretos Cancer Hospital, Barretos, São Paulo, Brazil, **4** Epidemiology and Biostatistics Nucleus, Barretos Cancer Hospital, Barretos, São Paulo, Brazil, **5** Department of Gynecologic Oncology, Barretos Cancer Hospital, Barretos, São Paulo, Brazil, **6** Life and Health Sciences Research Institute (ICVS), School of Medicine, University of Minho, Braga, Portugal, **7** ICVS/3B's - PT Government Associate Laboratory, Braga/Guimarães, Portugal

✉ These authors contributed equally to this work.

‡ These authors also contributed equally to this work.

\* [diocesio@yahoo.com](mailto:diocesio@yahoo.com)



OPEN ACCESS

**Citation:** Andrade DAPd, da Silva VD, Matsushita GdM, de Lima MA, Vieira MdA, Andrade CEMC, et al. (2019) Squamous differentiation portends poor prognosis in low and intermediate-risk endometrioid endometrial cancer. PLoS ONE 14 (10): e0220086. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220086>

**Editor:** Nicola Silvestris, Cancer Institute, ITALY

**Received:** June 30, 2019

**Accepted:** September 23, 2019

**Published:** October 10, 2019

**Copyright:** © 2019 Andrade et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the manuscript and its Supporting Information files.

**Funding:** The author(s) received no specific funding for this work.

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

### Abstract

#### Background

Endometrial cancer presents well-defined risk factors: myometrial invasion, histological subtype, tumor grade, lymphovascular space invasion (LVSI). Some low and intermediate-risk endometrioid endometrial cancer patients exhibited unexpected outcomes. This study aimed to investigate other clinical-pathological factors that might influence the recurrence rates of patients diagnosed with low and intermediate-risk endometrioid endometrial cancer.

#### Methods

A case-control study from a cohort retrospective of 196 patients diagnosed with low and intermediate-risk endometrioid endometrial cancer at a single institution from 2009 to 2014 was conducted. Medical records were reviewed to compare clinical (race, smoking, menopause age, body mass index) and pathological (endometrioid vs endometrioid with squamous differentiation, tumor differentiation grade, tumor location, endocervical invasion, LVSI) features of patients with recurrence (case) and without recurrence (control) of disease. Three controls for each case were matched for age and staging.

#### Results

Twenty-one patients with recurrence were found (10.7%), of which 14 were stage IA, and 7 were stage IB. In accordance, 63 patients without recurrence were selected as controls. There were no significant differences in any clinical characteristics between cases and controls. Among pathological variables, presence of squamous differentiation (28.6% vs. 4.8%,

$p = 0.007$ ), tumor differentiation grade 2 or 3 (57.1% vs. 30.2%,  $p = 0.037$ ) and presence of endocervical invasion (28.6% vs. 12.7%,  $p = 0.103$ ) were associated with disease recurrence on a univariate analysis. On multivariable analysis, only squamous differentiation was a significant risk factor for recurrence ( $p = 0.031$ ).

## Conclusion

Our data suggest that squamous differentiation may be an adverse prognostic factor in patients with low and intermediate-risk endometrioid endometrial cancer, that showed a 5.6-fold increased risk for recurrence.

## Introduction

Endometrial cancer is the most prevalent gynecological neoplasia in women in the US, accounting for more than 63,000 cases/year and with a lethality rate close to 18%.<sup>[1]</sup> In Brazil, this tumor represents the second most common cause of gynecological cancer due to a high incidence of cervix tumors.<sup>[2]</sup> Despite knowledge advances related to genetic alterations of this neoplasia in the last few years, classification of endometrial cancer into type I (endometrioid) or type II (serous or clear cell) continues to be used in clinical practice, mainly to evaluate risk factors in tumor progression.<sup>[3]</sup>

As in other solid tumors, staging of endometrial cancer is important to define surgical extension, ranging from hysterectomy with bilateral salpingo-oophorectomy to a pelvic and/or para-aortic lymphadenectomy.<sup>[4]</sup> Risk stratification in stage I tumors aims to assess the risk of lymph node involvement, the recurrence pattern, patient's prognosis and the best adjuvant treatment to be performed.<sup>[5]</sup> Beyond myometrial tumor invasion depth, other clinical-pathological factors have been evaluated: age; histological subtype; tumor differentiation grade and lymphovascular space invasion (LVSI).<sup>[6,7]</sup> Besides these features, other immunohistochemistry markers, such as L1-cell adhesion molecule (L1CAM) and p53, are also associated with patient outcome for stage I endometrial cancer, but not yet incorporated in current classifications.<sup>[8,9]</sup>

Endometrial adenocarcinoma with squamous differentiation terminology was defined by Zaino and Kurman in 1988 to replace two previously used nomenclature for uterus neoplasms: adenoacanthoma and adenosquamous carcinoma.<sup>[10]</sup> Squamous differentiation consists of sheets of cells with intercellular bridges and prominent cell membranes with or without keratinization.<sup>[11]</sup> It is present in about 13–25% of endometrial adenocarcinomas.<sup>[10,12]</sup> The finding of squamous differentiation in the anatomopathological examination remains controversial as a risk factor for recurrence in patients with early-stage endometrial cancer.<sup>[13,14]</sup>

The aim of this study was to evaluate clinical-pathological features that influenced the recurrence of patients diagnosed with low and intermediate-risk endometrial cancer, according to the ESMO (European Society for Medical Oncology) criteria.<sup>[5]</sup>

## Patients and methods

A case-control study nested in a retrospective cohort of 196 patients diagnosed with low and intermediate-risk endometrial cancer undergoing surgery at Barretos Cancer Hospital from January 2009 to December 2014 was conducted. This study was held in accordance with the

principles of the Declaration of Helsinki and it was previously approved by the Ethical Review Board from Barretos Cancer Hospital in March 2017 (Reference 1.942.488). Cases were defined as patients who presented systemic or locoregional recurrence at any time of their follow-up. We defined three controls for each recurrence case, matching age ( $\pm 1$  year) and FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics) staging (IA and IB).

According to ESMO criteria[5], low-risk endometrial cancer is defined as endometrioid adenocarcinoma stage IA grade 1 or grade 2; intermediate-risk endometrial cancer is defined as endometrioid adenocarcinoma stage IA grade 3 or endometrioid adenocarcinoma stage IB grade 1 or grade 2. Three or more of the following four criteria need to be present to define squamous differentiation: sheet-like growth without glands or palisading, sharp cell margins, eosinophilic and thick of glassy cytoplasm, and decreased nuclear-to-cytoplasmic ratio compared with foci elsewhere in the same tumor.[11] The amount of squamous differentiation can vary and in a well-sampled carcinoma the squamous differentiation should comprise at least 10% of the neoplasia. The degree of nuclear atypia, if present, generally reflects that of the glandular cells.[15]

Clinical-pathological data were reviewed from medical records. The diagnoses of low and intermediate-risk endometrial cancer were confirmed by the surgical histopathologic report. Patients who did not perform definitive surgical treatment at the institution (for example, patients who underwent surgery at their region of origin and who were referred to a tertiary hospital only for adjuvant treatment) were excluded.

The following clinical-pathological criteria were evaluated: ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) scale of performance status (0–1 vs 2); race/ethnicity (white vs non-white); body mass index (BMI); hormonal status (menopause vs menacme); number of pregnancies; smoking (yes vs no); tumor differentiation grade (1, 2 or 3); histological characteristics (endometrioid vs endometrioid with squamous differentiation); tumor size; tumor location (uterine corpus vs lower uterine segment); endocervical invasion (yes vs no) and LVSI (yes vs no).

### Statistical analysis

Both the data collected and analyses were performed using IBM Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) database version 21.0 (SPSS, Chicago, IL). Descriptive statistical analysis used median, maximum and minimum value for quantitative variables and percentage for qualitative variables. Once the above variables were defined, univariate analysis was performed using Mann-Whitney's U-test or Fisher's exact test. Parameters with  $P < 0.2$  in univariate analyses were entered into the logistic regression analysis. Backward stepwise logistic regression models were constructed. The comparisons were considered statistically significant at  $P < 0.05$ . Study data were collected and managed using REDCap (Research Electronic Data Capture), electronic data capture tools hosted at Barretos Cancer Hospital.[16]

### Results

Of the 196 endometrial cancer patients described in this retrospective cohort, 21 patients (10.7%) presented recurrence during their evolution (cases), of which 2/3 were stage IA and 1/3 were stage IB, and 63 patients without recurrence were selected as controls (Table 1). The median age of both groups was 64 years and both groups also exhibit a similar fraction of IA staging. Moreover, the patient population was obese (median BMI above 30), white and non-smoker (Table 1). Almost all patients were already in menopause (11.2% of controls were still in menacme).

Standard hysterectomy with bilateral salpingo-oophorectomy was carried out in 44.4% of controls and 57.1% cases; pelvic systematic lymphadenectomy was done in 28.6% of controls

Table 1. Univariate analysis of predictive recurrence for low and intermediate-risk endometrioid endometrial cancer.

		Case (n = 21)	Control (n = 63)	P-value
Age (median) <sup>a</sup>		64 (46–77)	64 (46–78)	0.873
FIGO staging (%) <sup>b</sup>	IA	14 (66.7)	42 (66.7)	>0.99
	IB	7 (33.3)	21 (33.3)	
ECOG Performance Status (%) <sup>b</sup>	0–1	20 (95.2)	61 (96.8)	>0.99
	2	1 (4.8)	2 (3.2)	
Race/Ethnicity (%) <sup>b</sup>	White	18 (85.7)	45 (71.4)	0.251
	Non-white	3 (14.3)	18 (28.6)	
BMI (median) <sup>a</sup>		31.64 (19.78–48.62)	32.65 (21.93–52.71)	0.339
Smoking history <sup>b</sup>	Yes	2 (9.5)	4 (6.3)	0.637
	No	19 (90.5)	59 (93.7)	
Menopause (%) <sup>b</sup>	Yes	21	56 (88.8)	0.184
	No	0	7 (11.2)	
Number of pregnancies (median) <sup>a</sup>		4 (1–7)	4 (1–20)	0.725
Tumor differentiation grade <sup>b</sup>	Grade 1	9 (42.9)	44 (69.8)	0.037
	Grade 2 or 3	12 (57.1)	19 (30.2)	
Histological subtype (%) <sup>b</sup>	Endometrioid	15 (71.4)	60 (95.2)	0.007
	Endometrioid with squamous differentiation	6 (28.6)	3 (4.8)	
Tumor size (median–cm) <sup>a</sup>		4.0 (1.60–115.0)	4.0 (1.0–105.0)	0.597
Tumor localization <sup>b</sup>	Uterine corpus	14 (66.7)	47 (74.6)	0.574
	Lower uterine segment	7 (33.3)	16 (25.4)	
Endocervical invasion (%) <sup>b</sup>	Yes	6 (28.6)	8 (12.7)	0.103
	No	15 (71.4)	55 (87.3)	
LVSI (%) <sup>b</sup>	Yes	5 (23.8)	9 (14.3)	0.324
	No	16 (76.2)	54 (85.7)	

BMI—body mass index; ECOG—Eastern Cooperative Oncology Group; FIGO—International Federation of Gynecology and Obstetrics; LVSI—lymphovascular space invasion.

<sup>a</sup>—Mann-Whitney test;

<sup>b</sup>—Fisher's exact test

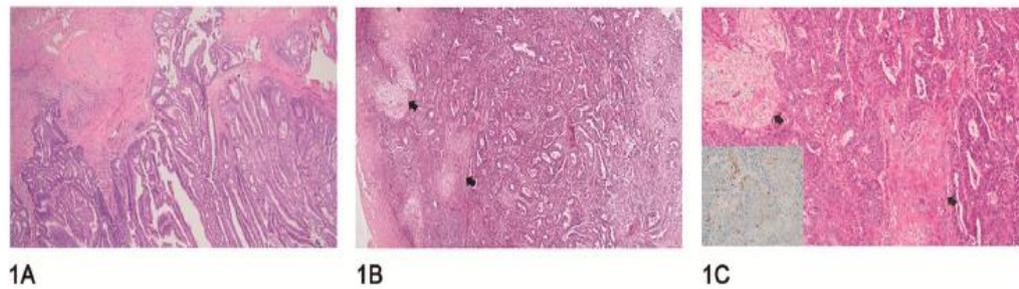
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220086.t001>

and 9.5% of cases; retroperitoneal and pelvic lymphadenectomy was performed in 22.2% of controls and 28.6% of cases, since there was no statistical difference between the groups ( $p$  0.38). Lymph node staging was performed in 52.4% of controls and 38.1% of cases, without a statistical difference ( $p$  0.26).

Adjuvant radiotherapy was performed in 85.7% of controls and 76.2% of cases. Of these, 76.2% of controls and 66.7% of cases received only brachytherapy, without a statistical difference ( $p$  0.68).

Squamous differentiation appears as solid areas in the middle of glandular tissue. These areas, although solid, cannot be considered as such for grading purpose (Fig 1a and 1b). A specific immunohistochemical marker used to evaluate squamous lineage is p63, as shown in the inset (Fig 1c). [17]

There were no significant differences regarding race/ethnicity, ECOG performance status, number of pregnancies, smoking history, tumor size, tumor localization and LVSI between the group of patients with recurrence (cases) and the group of patients without recurrence (controls) (Table 1).



**Fig 1. Histopathological difference between endometrioid adenocarcinoma with and without squamous transformation.** (A) Depicts an endometrioid adenocarcinoma without squamous transformation. (B) Shows a case with squamous transformation areas highlighted with arrows. (C) Highlights the squamous transformation areas at a higher magnification (arrows). The inset presents nuclear p63 positivity, a protein antibody used to demonstrate squamous differentiation by immunohistochemistry in a squamous transformation area.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220086.g001>

In the univariate analysis, four parameters with  $P < 0.2$  were chosen for the multivariate logistic regression analysis: hormonal status (menopause), tumor differentiation grade, histological characteristics and endocervical invasion (Table 1). The variable 'menopause' had to be withdrawn from this model since one of its categories did not present participants (no menopause in case group), resulting in a no data conversion to the odds ratio value. Using backward stepwise logistic regression technique, a new model was constructed with three parameters: histological subtype with squamous differentiation (28.6% vs. 4.8%,  $p = 0.007$ ), tumor differentiation grade 2 or 3 (57.1% vs. 30.2%,  $p = 0.037$ ) and presence of endocervical invasion (28.6% vs. 12.7%,  $p = 0.103$ ) (Table 1).

In multivariate analysis, only histological subtype (endometrioid vs endometrioid with squamous differentiation) was associated with recurrence ( $p = 0.031$ ) (Table 2). Women who presented squamous differentiation associated with classic endometrioid subtype had a 5.6-fold increased risk for recurrence when compared to the group that does not show this histological finding (Table 2).

## Discussion

This case-control study of low and intermediate-risk endometrial cancer demonstrated that patients with endometrioid squamous differentiation subtype had a greater chance of recurrence when compared to patients with typical endometrioid histological subtype. This finding in the anatomopathological examination remains controversial as a risk factor for recurrence as published in the international literature (Table 3).

**Table 2. Multivariate analysis of predictive recurrence for low and intermediate-risk endometrioid endometrial cancer.**

		Odds Ratio (IC- 95%)	P-value
Tumor differentiation grade	Grade 1	1	0.080
	Grade 2 or 3	2.66 (0.89–7.96)	
Tumor type	Endometrioid	1	0.031
	Endometrioid with squamous differentiation	5.65 (1.17–27.17)	
Endocervical invasion	No	1	0.168
	Yes	2.55 (0.67–9.66)	

Constant = -1.939 ( $P = 0.0001$ )

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220086.t002>

Table 3. Summary of squamous differentiation endometrioid endometrial cancer studies to predict recurrence.

References	Year	Country	N	Study design	Risk for recurrence
This study	2019	Brazil	84	Case-control	Yes
Misirlioglu <i>et al.</i> [13]	2012	Turkey	223	Case-control	Yes
Jiang <i>et al.</i> [21]	2017	China	630	Retrospective cohort	Yes
Zaino <i>et al.</i> [14]	1991	USA	631	Prospective cohort	No
Sturgeon <i>et al.</i> [22]	1998	USA	648	Case-control	No
Lax <i>et al.</i> [23]	1998	USA	77	Case series	Variable
Abeler <i>et al.</i> [12]	1992	Norway	255	Retrospective cohort	Variable

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220086.t003>

FIGO staging classifies endometrial cancer grade into three groups: grade 1 tumors are those in which less than 5% of the neoplasm is arranged as solid growth; grade 2 tumors are those in which 5% to 50% of the neoplasms are arranged in solid sheets, and grade 3 tumors are those in which greater than 50% of the neoplasm form solid masses.[18] The current FIGO grade system, primarily based on the relative proportion of solid and glandular areas, also considers nuclear atypia, and grading is increased by one if more than 50% severe nuclear atypia (grade 3 nuclei) is found in the neoplastic glands.[19] Currently, squamous differentiation does not enter into this classification, although it can mimic solid tumors areas. It can be found in all forms of endometrial hyperplasia, being more common in atypical endometrial proliferation.[15] The squamous and glandular components have the same PTEN mutations, which indicates that they are clonally related.[20]

Some studies showed that squamous differentiation is a risk factor for endometrial cancer recurrence.[13,21] A retrospective study of 223 patients with early-stage endometrial cancer, carried out by Misirlioglu *et al.*, similar to our study, regarding methodological structure, showed squamous differentiation as a risk factor for recurrence in early-stage endometrial cancer.[13] The authors reported 10.31% of recurrence (23 cases), very similar to that found in our study. Several risk factors were considered positive to increase the chance of recurrence (age, depth of myometrial tumor invasion, tumor differentiation grade, lymphovascular space invasion, tumor localization, tumor size), including squamous differentiation, as in our results.[13] Another retrospective cohort with 630 patients with stage I endometrioid endometrial cancer conducted by Jiang *et al.* evaluated possible risk factors for metastasis in this tumor. Beyond traditional factors such as tumor size and depth of myometrial invasion, squamous differentiation was also an independent risk factor for the development of pulmonary metastasis.[21]

On the other hand, there are some studies showing that squamous differentiation does not pose a worse prognosis. A large study (n = 631) conducted by Gynecologic Oncology Group (GOG) in the late 1970s and early 1980s, evaluated the prognosis role of the patients with or without histological squamous differentiation.[14] Five-years overall survival was 90% for patients with squamous differentiation *versus* 82% for patients without this differentiation with statistical significance.<sup>14</sup>[14] A case-control study with 640 patients carried out by Sturgeon *et al.* showed that squamous differentiation is not a poor prognostic factor for patients diagnosed with endometrioid endometrial cancer.[22]

On account of conflicting results for defining prognosis of tumors, it may be necessary to classify the squamous differentiation component into low or high degree. An immunohistochemistry study of 77 patients evaluated estrogen (ER) receptor, progesterone (PR) receptor, p53 and Ki-67, reported that tumors with high-grade squamous differentiation (lack of expression of ER and PR; high Ki-67 index and p53 expression) have a worse outcome.[23] This controversy about the prognosis of recurrence in endometrial cancer with squamous

differentiation may be related to subgroups of its classification. Abeler *et al.* published a cohort with 1985 cases with endometrioid endometrial carcinoma, of which 255 presented squamous differentiation.[12] In this study, the authors divided tumors with squamous differentiation into two groups formerly used: adenoacanthoma (for cytologically well-differentiated squamous differentiation) and adenosquamous carcinoma (for poorly-differentiated squamous differentiation). Five-year overall survival for all patients was 83.5%. Adenoacanthoma subgroup had 91.2% five-year overall survival and adenosquamous subgroup had 64.9%, showing different prognosis.[12]

Molecular analysis with the aim to discover a biomarker that correlates with squamous differentiation in endometrial cancer is even more unclear. Cdx2 is an important gene transcription factor in the carcinogenesis of colorectal cancer.[24] The expression of this biomarker can be present in up to 27% of endometrial cancer but it is never seen in the normal epithelium.[25] Wani *et al.* evaluated Cdx2 expression in endometrial cancer with or without squamous differentiation and the expression of the biomarker was more prevalent in patients with this differentiation.[25] Another biomarker that may be related to squamous differentiation in endometrial cancer is p16, a tumor suppression protein generally expressed in tumors caused by the human papillomavirus (HPV).[26,27]

The strengths of our study include the fact that all patients were treated at the oncogynecology department from a tertiary cancer hospital where protocols are followed closely. The pathology department is also divided into subspecialties, surgical specimens description, sampling and reporting are standardized, resulting in high reproducibility of the pathology reports. Furthermore, the methodology chosen was a well-matched case-control study by age and stage, without differences between groups.

Limitations of this study include its retrospective nature, though our rate of recurrence is consistent with previously published data for low and intermediate-risk stage I tumors.[13] Creasman *et al.* reported a relapse-free survival of 92.3% for surgical patients at five years in stage I.[28] Tumor differentiation grade and endocervical invasion were not statistically significant in the multivariate analysis model, probably due to this limitation. Other obstacles to this study were the fact that it has been carried out in a single institution with possible referral bias and that it did not collect any immunohistochemical data.

In conclusion, this case-control study provides evidence that squamous differentiation in low and intermediate-risk endometrial cancer had a 5.6-fold increased risk for recurrence. This finding demonstrates that more detailed histopathological information could contribute to the analysis of prognosis for the patients.

## Supporting information

S1 File. Database case and controls.  
(XLSX)

## Author Contributions

**Conceptualization:** Diocesio Alves Pinto de Andrade, Rui Manuel Reis, Ricardo dos Reis.

**Data curation:** Diocesio Alves Pinto de Andrade, Marcelo de Andrade Vieira, Carlos Eduardo Mattos Cunha Andrade, Ronaldo Luís Schmidt.

**Formal analysis:** Diocesio Alves Pinto de Andrade, Vinicius Duval da Silva, Graziela de Macedo Matsushita, Marcos Alves de Lima, Rui Manuel Reis, Ricardo dos Reis.

**Investigation:** Diocesio Alves Pinto de Andrade.

**Methodology:** Diocesio Alves Pinto de Andrade, Rui Manuel Reis, Ricardo dos Reis.

**Project administration:** Diocesio Alves Pinto de Andrade, Rui Manuel Reis, Ricardo dos Reis.

**Supervision:** Rui Manuel Reis, Ricardo dos Reis.

**Writing – original draft:** Diocesio Alves Pinto de Andrade, Vinicius Duval da Silva, Graziela de Macedo Matsushita, Marcos Alves de Lima, Marcelo de Andrade Vieira, Carlos Eduardo Mattos Cunha Andrade, Ronaldo Luís Schmidt, Rui Manuel Reis, Ricardo dos Reis.

**Writing – review & editing:** Diocesio Alves Pinto de Andrade, Vinicius Duval da Silva, Graziela de Macedo Matsushita, Marcos Alves de Lima, Marcelo de Andrade Vieira, Carlos Eduardo Mattos Cunha Andrade, Ronaldo Luís Schmidt, Rui Manuel Reis, Ricardo dos Reis.

## References

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. *Cancer statistics*, 2018. 2018; 68(1):7–30.
2. *Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil*. [Internet] Rio de Janeiro: INCA—Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva; 2018 [cited 10 Ago 2018]; [www.inca.gov.br/estimativa/2018/](http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/).
3. Bokhman JV. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 1983; 15(1):10–7. [https://doi.org/10.1016/0090-8258\(83\)90111-7](https://doi.org/10.1016/0090-8258(83)90111-7) PMID: 6822361
4. Kitchener H, Swart AM, Qian Q, Amos C, Parmar MK. Efficacy of systematic pelvic lymphadenectomy in endometrial cancer (MRC Astec trial): a randomised study. *Lancet* 2009; 373(9658):125–36. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)61766-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)61766-3) PMID: 19070889
5. Colombo N, Preti E, Landoni F, Carinelli S, Colombo A, Marini C, et al. Endometrial cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2013; 24 Suppl 6:vi33–8.
6. Creasman WT, Morrow CP, Bundy BN, Homesley HD, Graham JE, Heller PB. Surgical pathologic spread patterns of endometrial cancer. A Gynecologic Oncology Group Study. *Cancer*. 1987; 60(8 Suppl):2035–41. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19901015\)60:8+<2035::aid-cnrcr2820601515>3.0.co;2-8](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19901015)60:8+<2035::aid-cnrcr2820601515>3.0.co;2-8) PMID: 3652025
7. dos Reis R, Burzawa JK, Tsunoda AT, Hosaka M, Frumovitz M, Westin SN, et al. Lymphovascular Space Invasion Portends Poor Prognosis in Low-Risk Endometrial Cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2015; 25(7):1292–9. <https://doi.org/10.1097/IGC.0000000000000490> PMID: 26067863
8. AlHilli MM, Mariani A, Bakkum-Gamez JN, Dowdy SC, Weaver AL, Peethambaram PP, et al. Risk-scoring models for individualized prediction of overall survival in low-grade and high-grade endometrial cancer. *Gynecol Oncol*. 2014; 133(3):485–93. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2014.03.567> PMID: 24690476
9. Zeimet AG, Reimer D, Huszar M, Winterhoff B, Puistola U, Azim SA, et al. L1CAM in early-stage type I endometrial cancer: results of a large multicenter evaluation. *J Natl Cancer Inst*. 2013; 105(15):1142–50. <https://doi.org/10.1093/jnci/djt144> PMID: 23781004
10. Zaino RJ, Kurman RJ. Squamous differentiation in carcinoma of the endometrium: a critical appraisal of adenocarcinoma and adenosquamous carcinoma. *Semin Diagn Pathol*. 1988; 5(2):154–71. PMID: 3041509
11. Kurman RJ, Carcangiu ML, Herrington CS, Young RH. *Tumours of the uterine corpus. WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs*. 4th Edition ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC); 2014. p. 121–54.
12. Abeler VM, Kjørstad KE. Endometrial adenocarcinoma with squamous cell differentiation. *Cancer*. 1992; 69(2):488–95. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19920115\)69:2<488::aid-cnrcr2820690236>3.0.co;2-o](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19920115)69:2<488::aid-cnrcr2820690236>3.0.co;2-o) PMID: 1728379
13. Misirlioglu S, Guzel AB, Gulec UK, Gumurdulu D, Vardar MA. Prognostic factors determining recurrence in early-stage endometrial cancer. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2012; 33(6):610–4. PMID: 23327055
14. Zaino RJ, Kurman R, Herbold D, Gliedman J, Bundy BN, Voet R, et al. The significance of squamous differentiation in endometrial carcinoma. Data from a Gynecologic Oncology Group study. *Cancer*. 1991; 68(10):2293–302. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19911115\)68:10<2293::aid-cnrcr2820681032>3.0.co;2-v](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19911115)68:10<2293::aid-cnrcr2820681032>3.0.co;2-v) PMID: 1913465
15. Ellenson LH, Ronnett BM, Soslow RA, Zaino RJ, Kurman RJ. Endometrial Carcinoma. In: Kurman RJ, Ellenson LH, Ronnett BM, editors. *Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract*. Sixth Edition ed. New York: Springer; 2011. p. 393–452.

16. Harris PA, Taylor R, Thielke R, Payne J, Gonzalez N, Conde JG. Research electronic data capture (REDCap)—a metadata-driven methodology and workflow process for providing translational research informatics support. *J Biomed Inform.* 2009; 42(2):377–81. <https://doi.org/10.1016/j.jbi.2008.08.010> PMID: 18929686
17. Stefansson IM, Salvesen HB, Akslen LA. Loss of p63 and cytokeratin 5/6 expression is associated with more aggressive tumors in endometrial carcinoma patients. *Int J Cancer.* 2006; 118(5):1227–33. <https://doi.org/10.1002/ijc.21415> PMID: 16152605
18. Blanco LZ Jr., Heagley DE, Lee JC, Gown AM, Gattuso P, Rotmensch J, et al. Immunohistochemical characterization of squamous differentiation and morular metaplasia in uterine endometrioid adenocarcinoma. *Int J Gynecol Pathol.* 2013; 32(3):283–92. <https://doi.org/10.1097/PGP.0b013e31826129e1> PMID: 23518912
19. Zaino RJ. FIGO staging of endometrial adenocarcinoma: a critical review and proposal. *Int J Gynecol Pathol.* 2009; 28(1):1–9. <https://doi.org/10.1097/PGP.0b013e3181846c6d> PMID: 19047915
20. Hayes MP, Wang H, Espinal-Witter R, Douglas W, Solomon GJ, Baker SJ, et al. PIK3CA and PTEN mutations in uterine endometrioid carcinoma and complex atypical hyperplasia. *Clin Cancer Res.* 2006; 12(20 Pt 1):5932–5. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1375> PMID: 17062663
21. Jiang W, Chen J, Tao X, Huang F, Zhu M, Wang C, et al. Possible Risk Factors of Pulmonary Metastases in Patients With International Federation of Gynecology and Obstetrics Stage I Endometrioid-Type Endometrial Cancer. *Int J Gynecol Cancer.* 2017; 27(6):1206–15. <https://doi.org/10.1097/IGC.0000000000001002> PMID: 28448305
22. Sturgeon SR, Sherman ME, Kurman RJ, Berman ML, Mortel R, Twigg LB, et al. Analysis of histopathological features of endometrioid uterine carcinomas and epidemiologic risk factors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1998; 7(3):231–5. PMID: 9521439
23. Lax SF, Pizer ES, Ronnett BM, Kurman RJ. Comparison of estrogen and progesterone receptor, Ki-67, and p53 immunoreactivity in uterine endometrioid carcinoma and endometrioid carcinoma with squamous, mucinous, secretory, and ciliated cell differentiation. *Hum Pathol.* 1998; 29(9):924–31. [https://doi.org/10.1016/s0046-8177\(98\)90197-6](https://doi.org/10.1016/s0046-8177(98)90197-6) PMID: 9744308
24. Silberg DG, Swain GP, Suh ER, Traber PG. Cdx1 and cdx2 expression during intestinal development. *Gastroenterology.* 2000; 119(4):961–71. <https://doi.org/10.1053/gast.2000.18142> PMID: 11040183
25. Wani Y, Notohara K, Saegusa M, Tsukayama C. Aberrant Cdx2 expression in endometrial lesions with squamous differentiation: important role of Cdx2 in squamous morula formation. *Hum Pathol.* 2008; 39(7):1072–9. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2007.07.019> PMID: 18495206
26. Caponio MA, Addati T, Popescu O, Petroni S, Rubini V, Centrone M, et al. P16(INK4a) protein expression in endocervical, endometrial and metastatic adenocarcinomas of extra-uterine origin: diagnostic and clinical considerations. *Cancer Biomark.* 2014; 14(2–3):169–75. <https://doi.org/10.3233/CBM-130326> PMID: 24878818
27. Chew I, Post MD, Carinelli SG, Campbell S, Di Y, Soslow RA, et al. p16 expression in squamous and trophoblastic lesions of the upper female genital tract. *Int J Gynecol Pathol.* 2010; 29(6):513–22. <https://doi.org/10.1097/PGP.0b013e3181e2fe70> PMID: 20881863
28. Creasman WT, Odicino F, Maisonneuve P, Quinn MA, Beller U, Benedet JL, et al. Carcinoma of the corpus uteri. FIGO 26th Annual Report on the Results of Treatment in Gynecological Cancer. *Int J Gynecol Obstet.* 2006; 95 Suppl 1:S105–43.

Artigo 2 – A 4-gene signature associated with recurrence in low- and intermediate-risk endometrial cancer.



## A 4-Gene Signature Associated With Recurrence in Low- and Intermediate-Risk Endometrial Cancer

Diocésio Alves Pinto de Andrade<sup>1,2\*</sup>, Luciane Sussuchi da Silva<sup>2</sup>, Ana Carolina Laus<sup>2</sup>, Marcos Alves de Lima<sup>3</sup>, Gustavo Nóríz Berardinelli<sup>2</sup>, Vinicius Duval da Silva<sup>4</sup>, Graziela de Macedo Matsushita<sup>4</sup>, Murilo Bonatelli<sup>2</sup>, Aline Larissa Virginio da Silva<sup>2</sup>, Adriane Feijó Evangelista<sup>2</sup>, Jesus Paula Carvalho<sup>5</sup>, Rui Manuel Reis<sup>2,6,7</sup> and Ricardo dos Reis<sup>8</sup>

<sup>1</sup> InORP ONCOCLÍNICAS Group, Oncology Institute of Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, Brazil, <sup>2</sup> Molecular Oncology Research Center, Barretos Cancer Hospital, Barretos, Brazil, <sup>3</sup> Epidemiology and Biostatistics Nucleus, Barretos Cancer Hospital, Barretos, Brazil, <sup>4</sup> Department of Pathology, Barretos Cancer Hospital, Barretos, Brazil, <sup>5</sup> Discipline of Gynecology, Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP), Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, <sup>6</sup> Life and Health Sciences Research Institute (ICVS), School of Medicine, University of Minho, Braga, Portugal, <sup>7</sup> ICVS/3B's - PT Government Associate Laboratory, Braga/Guimarães, Portugal, <sup>8</sup> Department of Gynecologic Oncology, Barretos Cancer Hospital, Barretos, Brazil

### OPEN ACCESS

#### Edited by:

Jian-Jun Wei,  
Northwestern University,  
United States

#### Reviewed by:

Enes Tayan,  
Mount Sinai Hospital, United States  
Julio de la Torre-Montero,  
Comillas Pontifical University, Spain

#### \*Correspondence:

Diocésio Alves Pinto de Andrade  
diocesio@yahoo.com

#### Specialty section:

This article was submitted to  
Gynecological Oncology,  
a section of the journal  
Frontiers in Oncology

Received: 22 June 2021

Accepted: 30 July 2021

Published: 17 August 2021

#### Citation:

de Andrade DAP, da Silva LS,  
Laus AC, de Lima MA,  
Berardinelli GN, da Silva VD,  
Matsushita GM, Bonatelli M,  
da Silva ALV, Evangelista AF,  
Carvalho JP, Reis RM and  
dos Reis R (2021) A 4-Gene  
Signature Associated  
With Recurrence in Low-  
and Intermediate-Risk  
Endometrial Cancer.  
Front. Oncol. 11:729219.  
doi: 10.3389/fonc.2021.729219

**Background:** The molecular profile of endometrial cancer has become an important tool in determining patient prognosis and their optimal adjuvant treatment. In addition to The Cancer Genome Atlas (TCGA), simpler tools have been developed, such as the Proactive Molecular Risk Classifier for Endometrial Cancer (ProMisE). We attempted to determine a genetic signature to build a recurrence risk score in patients diagnosed with low- and intermediate-risk endometrial cancer.

**Methods:** A case-control study was conducted. The eligible patients were women diagnosed with recurrence low- and intermediate-risk endometrial cancer between January 2009 and December 2014 at a single institution; the recurrence patients were matched to two nonrecurrence patients with the same diagnosis by age and surgical staging. Following RNA isolation of 51 cases, 17 recurrence and 34 nonrecurrence patients, the expression profile was determined using the *nCounter*<sup>®</sup> *PanCancer Pathways Panel*, which contains 770 genes.

**Results:** The expression profile was successfully characterized in 49/51 (96.1%) cases. We identified 12 genes differentially expressed between the recurrence and nonrecurrence groups. The ROC curve for each gene was generated, and all had AUCs higher than 0.7. After backward stepwise logistic regression, four genes were highlighted: *FN1*, *DUSP4*, *LEF1*, and *SMAD9*. The recurrence risk score was calculated, leading to a ROC curve of the 4-gene model with an AUC of 0.93, sensitivity of 100%, and specificity of 72.7%.

**Conclusion:** We identified a four-gene signature that may be associated with recurrence in patients with low- and intermediate-risk endometrial cancer. This finding suggests a new prognostic factor in this poorly explored group of patients with endometrial cancer.

**Keywords:** low- and intermediate-risk endometrioid endometrial carcinoma, genetic signature, recurrence risk score, biomarkers, Brazil

## INTRODUCTION

Endometrial cancer is the most prevalent gynecological tumor in developed countries, such as the USA and members of the European Union (1). The number of cases in the last decade have increased, possibly due to the increase in obesity in these countries (2). In Brazil, endometrial cancer is the eighth most commonly diagnosed cancer in women, with 6,540 new cases in 2020 (3). When diagnosed at an early stage, these patients have an excellent prognosis. Countless risk stratifications associate staging with other variables, such as tumor grade, lymphovascular space invasion (LVSI) and histology, to define sequential adjuvant treatments (4).

Traditionally, it has been considered two distinct diseases since Bokhman's publication in the early 1980s (low-grade endometrioid adenocarcinomas (type I, "well-differentiated") and nonendometrioid carcinomas (type II, "poorly differentiated") (5). Recently, The Cancer Genome Atlas (TCGA) project changed the understanding of the carcinogenesis of this tumor, leading to four molecular subgroups with different prognoses (DNA polymerase epsilon (*POLE*) ultramutated, microsatellite instability (MSI) hypermutated, copy number (CN) low, and CN high) (6). Due to the complexity (whole genome sequencing, exome sequencing, microsatellite assays, and CN aberration analysis), costs, and need for ideally frozen tissue for reproducibility of this classification in clinical practice, new methodologies have been developed. The two most currently used are the Proactive Molecular Risk Classifier for Endometrial Cancer (ProMisE) and Leiden/TransPORTEC classification, in which the four groups with different prognoses are also described (7, 8). Immunohistochemistry was used to detect the presence/absence of mismatch repair (MMR) proteins and to evaluate *TP53* mutations, and only one step used genetic sequencing (next-generation or Sanger sequencing) to identify *POLE* hotspot exonuclease domain mutations (7, 8).

Using the TCGA consortium database, some studies have built prognostic models of endometrial cancer recurrence according to genetic signatures or evaluated RNA expression (9, 10). Furthermore, other studies correlate potential genetic signatures with histopathological markers such as tumor-infiltrating immune cells (11, 12).

The aim of this study was to determine a genetic signature of recurrence risk in patients diagnosed with low- and intermediate-risk endometrial cancer in routine formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue using a large panel of 770 genes covering 13 key cancer-related pathways by NanoString, a highly sensitive and robust methodology for RNA expression of FFPE samples.

## MATERIAL AND METHODS

### Patients and Specimens

From a retrospective cohort of 195 patients diagnosed with low- and intermediate-risk endometrial cancer between January 2009 and December 2014 at Barretos Cancer Hospital (BCH), two pathologists with oncogynecologic expertise reviewed the initial report of all patients to confirm their diagnosis. Clinical and pathological features were obtained from the medical records.

Of the 22 patients who initially presented recurrence, the diagnosis remained low- and intermediate-risk endometrial cancer for 17 patients. We define low- and intermediate-risk endometrial cancer according to the European Society of Medical Oncology (ESMO)-modified criteria (4). Based on these results, a case-control study was carried out. Nonrecurrence patients with the same histopathological diagnosis were matched to recurrence cases in a 2:1 ratio by age and FIGO (International Federation of Gynecologic and Obstetrics) staging (IA and IB). Overall, 51 patients (17 recurrence and 34 non-recurrence) were analyzed.

This study was conducted following the ethical principles of the Declaration of Helsinki, and the BCH Ethical Review Board approved it in March 2017 (Reference number 1.942.488).

### DNA and RNA Isolation

DNA and RNA were isolated from 10  $\mu$ m-thick formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tumor samples sectioned on slides, as previously reported (13). One slide was stained with hematoxylin and eosin (H&E) and evaluated by experienced pathologists for identification, sample adequacy assessment, and selection of the tumor tissue area (minimum of 60% tumor area). DNA and RNA were isolated using the QiaAmp DNA Micro kit (Qiagen, Hilden, Germany) and the RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation kit (Ambion by Life Technologies, Austin, TX, USA), respectively. The quality and concentration of DNA and RNA were measured by both a NanoDrop ND-200 spectrophotometer (NanoDrop Products, Wilmington, DE, USA) and Qubit Fluorometric Quantitation (Thermo Fisher Scientific, USA). The samples were stored at -80°C until molecular analysis.

### ProMisE Evaluation

The ProMisE assessment was performed using molecular methodologies, namely, molecular evaluation of MSI, *TP53* mutation analyses by next-generation sequencing, and *POLE* hotspot mutations by Sanger sequencing.

To define MSI, we performed hexaplex PCR with six monomorphic mononucleotide markers (NR21, NR24, NR27, BAT25, BAT26, and HSP110), followed by fragment analysis in a 3500XL Genetic Analyzer sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), as previously described by our group (14). The presence of two or more markers with instability classified the cases as high microsatellite instability (MSI-H), the presence of one marker with instability was classified as low MSI (MSI-L), and the absence of any marker with instability as microsatellite stable (MSS). Presence of MSI was determined only for MSI-H cases.

To evaluate *POLE* mutations, we used direct Sanger sequencing, as described by Britton et al. PCR was performed using targeted primers for the exonuclease domain (exons 9-14) of *POLE* (15). The purified samples were subjected to capillary electrophoresis in a 3500XL Genetic Analyzer sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), and the results were analyzed with SegScape v2.7 software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

*TP53* mutations were detected with an NGS-based assay using the Illumina TruSight Tumor 15 (TST15) on the MiSeq instrument (Illumina, San Diego, CA, USA) according to the manufacturer's instructions, as previously reported (16). The TST15 panel assesses

all coding sequences of the *TP53* gene. Read alignment and variant calling were performed with BaseSpace BWA Enrichment version 2.1 (Illumina, San Diego, CA, USA) and Sophia DDM<sup>®</sup> software version 5.7.3 (Sophia Genetics SA, Switzerland). The identification of pathogenic variants occurred after the application of filters to remove low-quality variants. Variants with < 500X read depth, VAF < 10%, and intronic, intergenic, 3' UTR, and synonymous variants were excluded. Thereafter, the variants that presented as polymorphisms, within a frequency > 1% in the GnomAD database, were removed (those that had no population frequency information followed in the analyses). Finally, the pathogenicity of variants was checked in the databases ClinVar, IARC TP53, COSMIC, and CGI.

### NanoString nCounter Analysis

Samples were processed for analysis on the NanoString nCounter Flex system using the 770 gene nCounter<sup>®</sup> PanCancer Pathways Panel (NanoString Technologies, Inc., Seattle, WA, USA), as previously reported (17). This panel assesses 13 cancer-associated canonical pathways related to basic cancer biology (Notch, Wnt, Hedgehog, Chromatin modification, Transcriptional regulation, DNA damage control, TGF- $\beta$ , MAPK, STAT, PI3K, RAS, Cell cycle, Apoptosis). Briefly, 100 ng of total RNA, quantified by a Qubit Fluorometric System (Thermo Fisher Scientific, USA), from each sample was hybridized for 21 hours at 65°C, followed by purification and RNA/probe complex immobilization in nCounter PrepStation (NanoString Technologies, Inc., Seattle, WA, USA) and cartridge scanning in a digital analyzer (NanoString Technologies, Inc., Seattle, WA, USA), according to the manufacturer's protocol. Reading with 280 field-of-views (FOVs) was used in the study samples.

### Bioinformatics and Statistical Analysis

We used nSolver<sup>™</sup> Analysis Software, version 4.0 (NanoString Technologies, Inc., Seattle, WA, USA) to assess the quality control parameters of all samples. Further analyses were performed using the R language and environment for statistical computing (R-project (v3.6.3); The R Foundation, Vienna, Austria) (18). The *quantro* package (v1.18.0) was applied for cartridge evaluation and to assist in choosing the normalization method. The gene expression data were normalized by the quantile method implemented in the NanoStringNorm package and transformed into a  $\log_2$  scale. RNA differential expression was evaluated in the NanoStringNorm package considering two different groups (recurrent vs. nonrecurrent low- and intermediate-risk endometrial cancer) with a significance level of  $p \leq 0.01$  and fold change of 2.0 (19). Heatmaps and hierarchical clustering of differentially expressed genes were built with the ComplexHeatmap package (v2.0.0) (20). The STRING database was applied to predict interaction networks from differentially expressed genes (21).

Through the ROC curves, we evaluated the sensitivity and specificity of differential RNA expression by comparing patients with recurrence with those who did not have recurrence using the pROC package (22). An area under the curve (AUC) above 0.7 was considered acceptable for further gene evaluation. We used the backward stepwise logistic regression technique within

the MASS package (version 7.3.53) to build a recurrence risk model according to the RNA expression of the samples.

Data analysis was performed using IBM Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) database version 27.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). Descriptive statistical analysis for quantitative variables used mean, maximum, and minimum and for qualitative variables used percentage. Once the variables were defined, univariate analysis was performed using the chi-square test and Mann-Whitney's U-test. Variables with a  $p$  value < 0.2 in univariate analyses were entered into the logistic regression analysis. The threshold for statistical significance was 5%. Study data were collected and managed using REDCap (Research Electronic Data Capture) electronic data capture tools hosted at BCH (23).

## RESULTS

### Patient Features

The clinical and pathological information of the two groups is summarized in Table 1. More than 96% of patients are ECOG 0-1. In the recurrence group, we had four patients diagnosed with endometrial adenocarcinoma with squamous differentiation, whereas in the nonrecurrence group, we did not have any diagnosis of this histological subtype ( $p = 0.01$ ). There was a higher prevalence of white patients in the recurrence group (94.1%) than in the nonrecurrence group (70.6%) ( $p = 0.075$ ). Other clinical and pathological features were well balanced between the two groups.

Of the 51 samples that were sequenced for ProMisE, we observed a high frequency of inconclusive results due to the poor quality of the DNA obtained, hampering meaningful analysis. The assessment of MSI was inconclusive in one case, and among the other 50 cases, 12 (24%) were MSI-H. Of the 39 remaining samples for *POLE* sequencing, 18 were inconclusive, and only one (4.8%) was mutated [exon 9 – c.857C>G; p. (Pro286Arg)]. Concerning the 38 samples for *TP53* mutation analysis, 10 cases (66.7%) were wild-type, and five (33.3%) were mutated (Supplementary Table 1). There was no difference between the four groups of the ProMisE methodology and the increased chance of recurrence ( $p = 0.823$ ).

### Gene Expression

Concerning the gene expression profile, 49 of the 51 cases (96%) were conclusive, leading to 16 recurrence and 33 nonrecurrence samples for further analysis. Two samples were excluded due to low-quality RNA. The expression profile based on unsupervised clustering showed 12 genes with differential RNA expression between the two groups studied (Figure 1). The *LEF1*, *PLA2G4A*, *DKK1*, *BMP4*, *FGF19*, *FNI*, *SMAD9*, and *DUSP4* genes showed increased RNA expression in the recurrence group, while *HIST1H3G*, *SIX1*, *TNF*, and *IL8* were downregulated compared to nonrecurrence group.

We next generated a ROC curve for each of the 12 genes described above to assess the performance of each gene to discriminate between the recurrence and nonrecurrence groups (Table 2). All 12 genes presented an AUC higher than 0.7.

**TABLE 1** | Clinical and pathological characteristics of patients with low- and intermediate-risk endometrial cancer.

		Recurrence (n=17)	Nonrecurrence (n=34)	p value
Age (mean) <sup>a</sup>		62.4 (46-77)	62,8 (51-88)	0.779
FIGO staging (%) <sup>b</sup>	IA	11 (64.7)	22 (64.7)	1.00
	IB	6 (35.3)	12 (35.3)	
ECOG Performance Status (%) <sup>b</sup>	0-1	16 (94.1)	33 (97.0)	1.00
	2	1 (5.9)	1 (3.0)	
Ethnicity (%) <sup>b</sup>	White	16 (94.1)	24 (70.6)	<b>0.075</b>
	Nonwhite	1 (5.9)	10 (29.4)	
BMI (mean) <sup>a</sup>		31.42 (19.78-43.29)	33.03 (18.67-52.71)	0.873
Smoking history <sup>b</sup>	Yes	3 (17.6)	4 (11.8)	0.673
	No	14 (82.4)	30 (88.2)	
Surgery	With lymphadenectomy	6 (35.3)	16 (47.1)	0.424
	Without lymphadenectomy	11 (64.7)	18 (52.9)	
Surgical route	Laparotomic	8 (47.1)	10 (29.4)	0.233
	Laparoscopic	9 (52.9)	24 (70.6)	
Tumor differentiation grade <sup>b</sup>	Grade 1	9 (52.9)	16 (47.1)	0.417
	Grade 2	8 (47.1)	12 (35.3)	
Histological subtype (%) <sup>b</sup>	Endometrioid	13 (76.5)	34 (100)	<b>0.010</b>
	Endometrioid with squamous differentiation	4 (23.5)	0 (0.0)	
Tumor size (mean – cm) <sup>a</sup>		4.5 (2.2-11.5)	3.8 (1.0-7.0)	0.219
Endocervical invasion (%) <sup>b</sup>	Yes	4 (23.5)	7 (20.6)	1.00
	No	13 (76.5)	27 (79.4)	
LVSI (%) <sup>b</sup>	Yes	3 (17.6)	3 (8.8)	0.387
	No	14 (82.4)	31 (91.2)	

BMI, body mass index; ECOG, Eastern Cooperative Oncology Group; FIGO, International Federation of Gynecology and Obstetrics; LVSI, lymphovascular space invasion.

<sup>a</sup>Mann-Whitney test.

<sup>b</sup>Fisher's exact test.

Bold, significant values.

To understand the crosstalk among the 12 genes, an interaction network was constructed and is depicted in **Figure 2**. Except for the *DUSP4* and *HIST1H3G* genes, interactions are known among the differentially expressed genes.

### Recurrence Risk Score

Based on the 12 differentially expressed genes, we applied logistic regression to build a recurrence risk score (RRS) and improve predictive performance. Through the backward stepwise logistic regression model, four genes with the best performance were selected: *FNI*, *DUSP4*, *LEF1*, and *SMAD9* (increased RNA expression in the recurrence cases). The RRS was calculated as the logit from the logistic regression as follows:  $RRS = -21.14 + 1.02 * FNI + 1.07 * DUSP4 + 0.6211 * LEF1 + 0.8832 * SMAD9$  (**Supplementary Table 2**).

Univariate analysis was performed to calculate the odds ratio (OR) for each gene and for the final score (**Table 3**). Cases with overexpression of the *FNI* gene had an OR of 3.3 for recurrence compared to cases without overexpression. In addition, the final gene score showed an OR of 2.7 for recurrence.

Moreover, the combination of the expression of the four genes showed an AUC of 0.93, a sensitivity of 100%, and a specificity of 72.7% to identify low- and intermediate-risk endometrial cancer with recurrence through the RNA expression (**Figure 3**).

We performed a logistic regression analysis with the four differentially expressed genes score and two significant clinicopathological variables (ethnicity and histological subtype). The histological subtype variable was withdrawn from this model since one of its categories did not contain subjects (no endometrioid with squamous differentiation in the nonrecurrence group), resulting in no data conversion to the odds ratio value. Using a backward

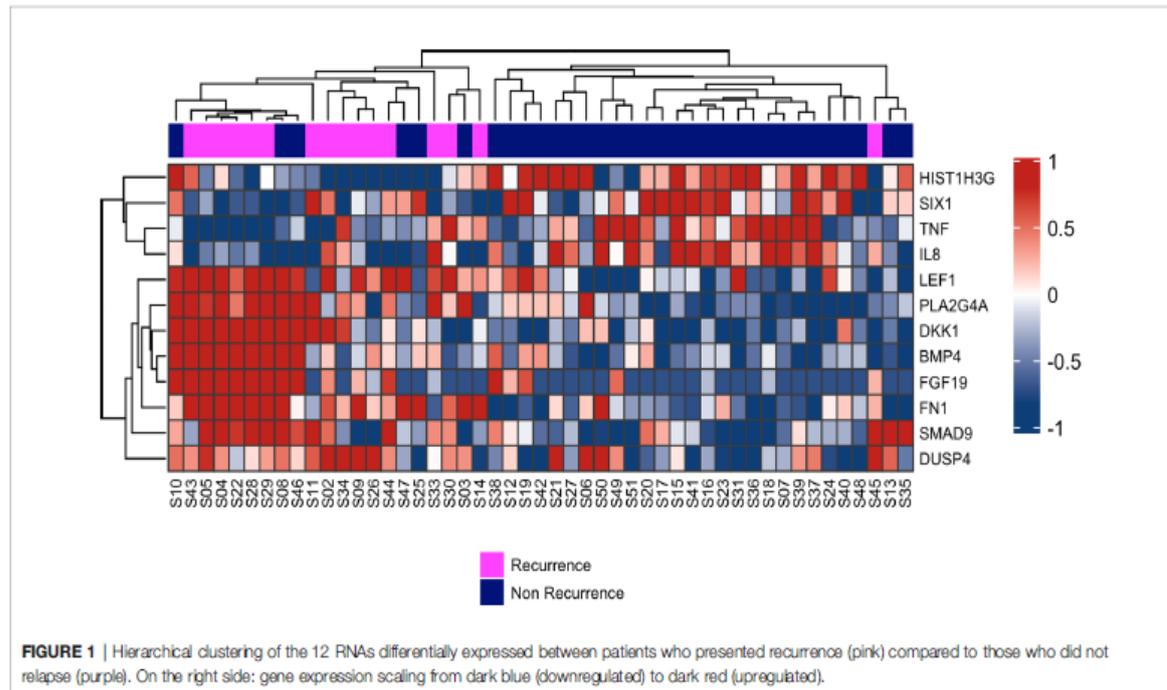
stepwise logistic regression technique, a new model was constructed with two parameters: four differentially expressed genes score (OR: 2.616;  $p = 0.001$ ) and white ethnicity (OR: 0.299;  $p = 0.342$ ).

### DISCUSSION

In this study, we characterized the expression profile of two distinct groups (recurrence and nonrecurrence) of low- and intermediate-risk endometrial cancer. Twelve genes were differentially expressed. After performed a logistic regression, four genes remained to define a possible RRS model, exhibiting an impressive AUC of 0.93, with a sensitivity of 100% and a specificity of 73%. To the best of our knowledge, this is the first study to identify a gene signature associated with recurrence in low- and intermediate-risk endometrial cancer.

The four genes are associated with important cancer pathways, namely, the MAPK/PI3K pathways (*FNI* and *DUSP4*), the Wnt pathway (*LEF1*), and the TGF pathway (*SMAD9*).

The Wnt/beta-catenin signaling pathway plays an essential role in tumorigenesis and recurrence in endometrial cancer. Two studies demonstrated the role of the beta-catenin/*CTNNB1* gene as a poor prognostic factor in low-risk endometrial cancer (24, 25). First, in a large study with 342 patients with low-grade and early-stage endometrial cancer through next-generation sequencing, the worst recurrence-free and overall survival was demonstrated in patients with *CTNNB1* and *TP53* mutations (24). In a case-control study similar to ours with recurrent stage I and grade I endometrioid endometrial cancers, Moroney et al. showed that *CTNNB1* mutations are present at higher rates in recurrent patients (25).



**FIGURE 1** | Hierarchical clustering of the 12 RNAs differentially expressed between patients who presented recurrence (pink) compared to those who did not relapse (purple). On the right side: gene expression scaling from dark blue (downregulated) to dark red (upregulated).

**TABLE 2** | Differentially expressed genes between the recurrence and nonrecurrence groups.

Genes	Fold Change	Sensitivity <sup>1</sup>	Specificity <sup>1</sup>	AUC <sup>2</sup>
<b>HIST1H3G</b>	-2.6	0.7575	0.8125	0.8219
<b>TNF</b>	-2.1	0.7272	0.6875	0.7613
<b>SIX1</b>	-2.1	0.7272	0.75	0.7575
<b>IL8</b>	-2.5	0.6363	0.6875	0.7045
<b>FN1</b>	3.0	0.8125	0.8181	0.8532
<b>DKK1</b>	5.3	0.6875	0.7575	0.7821
<b>DUSP4</b>	2.3	0.75	0.6969	0.7784
<b>PLA2G4A</b>	2.3	0.6875	0.8484	0.7575
<b>LEF1</b>	2.1	0.8125	0.7272	0.7547
<b>FGF19</b>	3.7	0.75	0.7272	0.7537
<b>SMAD9</b>	2.1	0.6875	0.8181	0.7348
<b>BMP4</b>	3.0	0.75	0.6363	0.7121

<sup>1</sup>Sensitivity and specificity were determined by the Youden index.

<sup>2</sup>AUC, area under the curve.

*LEF1* (lymphoid enhancer factor) is a nuclear transcription factor that interacts with beta-catenin to activate the Wnt pathway (26). The role of *LEF1* protein overexpression in the carcinogenesis of endometrial cancer may be related to the modulation of cell surface adhesion proteins, influencing the prognosis of this tumor (27). A study with *LEF1* knockout mice demonstrated its importance in endometrial cancer carcinogenesis. The *LEF1* protein is essential in uterine glandular formation, and its overexpression possibly influences the disordered growth of glandular cells and the development of cancer (28).

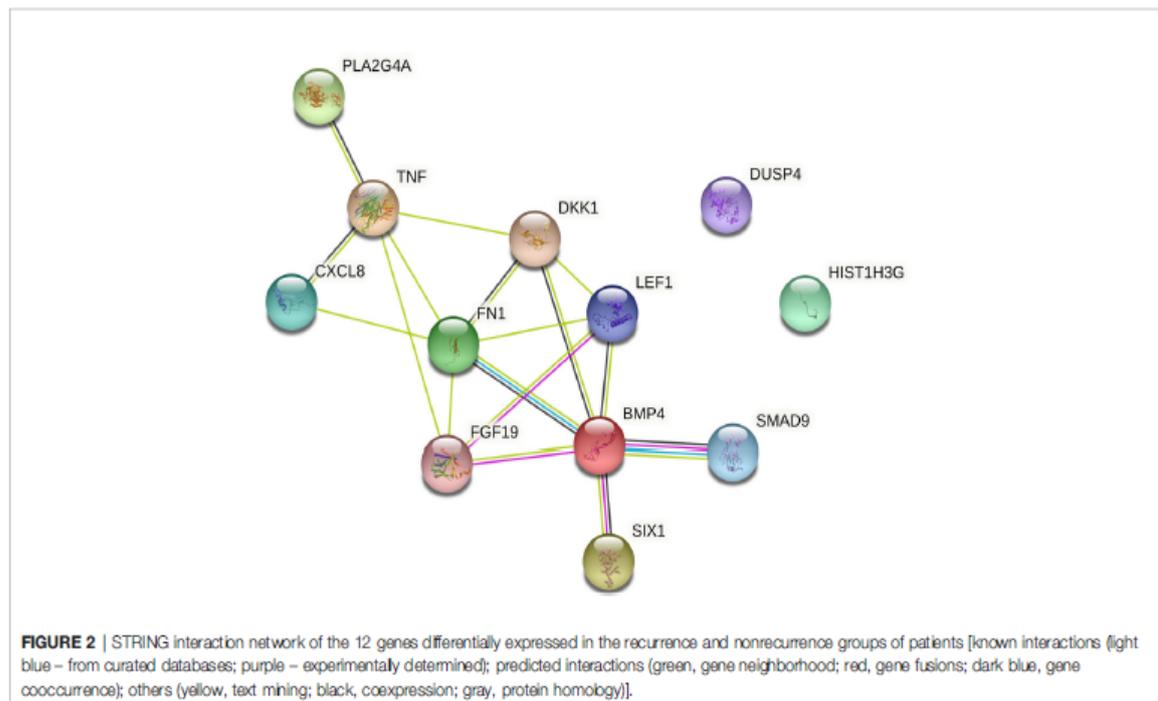
The MAPK/PI3K pathway is a central pathway in the tumorigenesis of several tumors, and it is even a target in breast cancer treatment (29). The role of *FN1*, which encodes fibronectin, and *DUSP4*, which encodes dual-specificity protein phosphatase 4,

in endometrial cancer is not well understood. A recent study by Raglan et al. evaluated the TCGA proteomic data of 560 endometrial cancers and demonstrated that obese patients without cancer had upregulation of several proteins, including *DUSP4* (30). Another recent study evaluated the predictive model of lymph node involvement in endometrial cancer using a combined proteomic and transcriptomic approach. The authors reported that high protein expression of fibronectin, cyclin D1, and tumor grade were associated with lymph node involvement. Moreover, overexpression of both *FN1* and *CCND1* (cyclin D1 encoded gene) genes correlated with greater potential for mesenchymal invasion (31).

The third pathway identified was TGF- $\beta$  through the overexpression of the *SMAD9* gene. This gene belongs to the SMAD superfamily (*Drosophila* mothers against decapentaplegic protein) made up of important cytokines in the TGF- $\beta$  family (32). *SMAD9* overexpression is associated with the prevalence of hamartomatous polyposis and is a prognostic factor for lung cancer (33, 34). So far, no studies have addressed its impact in endometrial cancer.

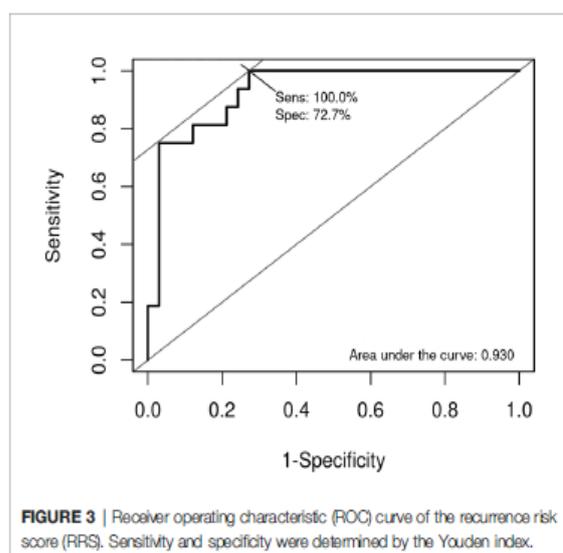
Analyzing the clinical and pathological features of this case-control study, having squamous differentiation in the histopathological diagnosis could be a risk factor for recurrence in this population, according to previously published studies (35, 36). Related to ethnicity, some studies have already shown less medical access in the nonwhite population in the USA impacting oncologic outcomes (37); however, demonstrated a risk due to ethnicity itself. In this study, there was a higher prevalence of white patients in the recurrence group.

Despite these notable findings, our study has some limitations, such as having a small sample size and a retrospective nature. The small number of cases can be explained by the excellent prognosis



**TABLE 3** | Selected genes predicting recurrence in low- and intermediate-risk endometrial cancer.

Genes	Estimates	OR	95% CI		<i>p</i> value
			Lower	Upper	
<b><i>FN1</i></b>	1.195	3.303	1.628	6.704	0.001
<b><i>DUSP4</i></b>	0.960	2.613	1.302	5.241	0.007
<b><i>LEF1</i></b>	0.818	2.266	1.187	4.325	0.013
<b><i>SMAD9</i></b>	0.831	2.295	1.223	4.309	0.010
<b>Score</b>	1.000	2.718	1.545	4.784	0.001



and low risk of recurrence in low- and intermediate-risk endometrial cancer patients. Therefore, validation of this 4-gene signature in a larger cohort is needed to confirm its predictive value. Moreover, it would be interesting to validate these 4 biomarkers by other methodologies, such as immunohistochemistry. On the other hand, our study has several strengths. First, the robustness of the NanoString methodology proved to be effective for gene expression evaluation in routine samples, even after many years of storage, up to 10 years in our study (38). Second, we evaluated a restricted subpopulation of endometrial cancer to detect risk factors for recurrence in this population. As this is a retrospective study, all patients who relapsed and their matched controls had their pathological reports reviewed by expert gynecologic oncology pathologists to minimize selection bias. Some studies have shown that gynecologic oncology has one of the highest rates of disagreement in the expert pathologist's report compared to the nonspecialized report (39, 40). In addition, this case-control study represents the experience of a reference cancer center hospital where well-defined treatment protocols minimize possible sample heterogeneity.

## CONCLUSION

For the first time, we identified a four-gene signature associated with recurrence in low and intermediate endometrial cancer. Additionally, the four genes (*FN1*, *DUSP4*, *LEF1*, and *SMAD9*) identified can shed light on the mechanisms of recurrence in endometrial cancer. This study can pave the way for personalized approaches of low- and intermediate-risk endometrial cancer.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s) can be found below: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>, GSE178671.

## ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by BCH Ethical Review Board in March 2017. Written informed consent for participation was not required for this study in accordance with the national legislation and the institutional requirements.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conception and design: DA, RMR, and RdR. Development of methodology: DA, RMR, and RdR. Acquisition of data: DA.

## REFERENCES

1. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer Statistics, 2021. *CA: Cancer J Clin* (2021) 71(1):7–33. doi: 10.3322/caac.21654
2. Smrz SA, Calo C, Fisher JL, Salani R. An Ecological Evaluation of the Increasing Incidence of Endometrial Cancer and the Obesity Epidemic. *Am J Obstet Gynecol* (2021) 224(5):506.e1–e8. doi: 10.1016/j.ajog.2020.10.042
3. *Estimativa 2020: Incidência De Câncer No Brasil Rio De Janeiro. INCA - Instituto Nacional De Câncer José Alencar Gomes Da Silva* (2020). Available at: [www.inca.gov.br/estimativa/2020/](http://www.inca.gov.br/estimativa/2020/).
4. Bendifallah S, Canlorbe G, Raimond E, Hudry D, Coutant C, Graesslin O, et al. A Clue Towards Improving the European Society of Medical Oncology Risk Group Classification in Apparent Early Stage Endometrial Cancer? Impact of Lymphovascular Space Invasion. *Br J Cancer* (2014) 110(11):2640–6. doi: 10.1038/bjc.2014.237
5. Bokhman JV. Two Pathogenetic Types of Endometrial Carcinoma. *Gynecol Oncol* (1983) 15(1):10–7. doi: 10.1016/0090-8258(83)90111-7
6. Kandath C, Schultz N, Cherniack AD, Akbani R, Liu Y, Shen H, et al. Integrated Genomic Characterization of Endometrial Carcinoma. *Nature* (2013) 497(7447):67–73. doi: 10.1038/nature12113
7. Talhouk A, McConechy MK, Leung S, Li-Chang HH, Kwon JS, Melnyk N, et al. A Clinically Applicable Molecular-Based Classification for Endometrial Cancers. *Br J Cancer* (2015) 113(2):299–310. doi: 10.1038/bjc.2015.190
8. Stelloo E, Nout RA, Osse EM, Jüngenliemk-Schulz IJ, Jobsen JJ, Lutgens LC, et al. Improved Risk Assessment by Integrating Molecular and Clinicopathological Factors in Early-Stage Endometrial Cancer—Combined Analysis of the PORTEC Cohorts. *Clin Cancer Res* (2016) 22(16):4215–24. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2878
9. Deng F, Mu J, Qu C, Yang F, Liu X, Zeng X, et al. A Novel Prognostic Model of Endometrial Carcinoma Based on Clinical Variables and Oncogenomic Gene Signature. *Front Mol Biosci* (2020) 7:587822. doi: 10.3389/fmolb.2020.587822
10. Wang Z, Zhang J, Liu Y, Zhao R, Zhou X, Wang H. An Integrated Autophagy-Related Long Noncoding RNA Signature as a Prognostic Biomarker for Human Endometrial Cancer: A Bioinformatics-Based Approach. *BioMed Res Int* (2020) 2020:5717498. doi: 10.1155/2020/5717498
11. Chen B, Wang D, Li J, Hou Y, Qiao C. Screening and Identification of Prognostic Tumor-Infiltrating Immune Cells and Genes of Endometrioid Endometrial Adenocarcinoma: Based on the Cancer Genome Atlas Database and Bioinformatics. *Front Oncol* (2020) 10:554214. doi: 10.3389/fonc.2020.554214
12. Horeweg N, de Bruyn M, Nout RA. Prognostic Integrated Image-Based Immune and Molecular Profiling in Early-Stage Endometrial Cancer. *Cancer Immunol Res* (2020) 8(12):1508–19. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-20-0149
13. Gomes I, Moreno DA, Dos Reis MB, da Silva LS, Leal LF, Gonçalves GM, et al. Low MGMT Digital Expression Is Associated With a Better Outcome of IDH1 Wildtype Glioblastomas Treated With Temozolomide. *J Neuro-Oncol* (2021) 151(2):135–44. doi: 10.1007/s11060-020-03675-6
14. Berardinelli GN, Scapulatempo-Neto C, Durães R, Antônio de Oliveira M, Guimarães D, Reis RM. Advantage of HSP110 (T17) Marker Inclusion for Microsatellite Instability (MSI) Detection in Colorectal Cancer Patients. *Oncotarget* (2018) 9(47):28691–701. doi: 10.18632/oncotarget.25611
15. Britton H, Huang L, Lum A, Leung S, Shum K, Kale M, et al. Molecular Classification Defines Outcomes and Opportunities in Young Women With Endometrial Carcinoma. *Gynecol Oncol* (2019) 153(3):487–95. doi: 10.1016/j.ygyno.2019.03.098
16. Campanella NC, Silva EC, Dix G, de Lima Vazquez F, Escrimim de Paula F, Berardinelli GN, et al. Mutational Profiling of Driver Tumor Suppressor and Oncogenic Genes in Brazilian Malignant Pleural Mesotheliomas. *Pathobiology* (2020) 87(3):208–16. doi: 10.1159/000507373
17. Rosa MN, Evangelista AF, Leal LF, De Oliveira CM, Silva VAO, Munari CC, et al. Establishment, Molecular and Biological Characterization of HCB-514: A Novel Human Cervical Cancer Cell Line. *Sci Rep* (2019) 9(1):1913. doi: 10.1038/s41598-018-38315-7
18. Team RC. *R: A Language and Environment for Statistical Computing* (2019). Available at: <https://www.R-project.org/> (Accessed 06 February 2021).
19. Waggott D, Chu K, Yin S, Wouters BG, Liu FF, Boutros PC. Nanostringnorm: An Extensible R Package for the Pre-Processing of Nanostring mRNA and miRNA Data. *Bioinf (Oxf Engl)* (2012) 28(11):1546–8. doi: 10.1093/bioinformatics/bts188
20. Gu Z, Eils R, Schlesner M. Complex Heatmaps Reveal Patterns and Correlations in Multidimensional Genomic Data. *Bioinf (Oxf Engl)* (2016) 32(18):2847–9. doi: 10.1093/bioinformatics/btw313
21. Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta-Cepas J, et al. STRING V11: Protein-Protein Association Networks With Increased Coverage, Supporting Functional Discovery in Genome-Wide Experimental Datasets. *Nucleic Acids Res* (2019) 47(D1):D607–d13. doi: 10.1093/nar/gky1131
22. Robin X, Turck N, Hainard A, Tiberti N, Lisacek F, Sanchez JC, et al. Proc: An Open-Source Package for R and *s+* to Analyze and Compare ROC Curves. *BMC Bioinf* (2011) 12:77. doi: 10.1186/1471-2105-12-77
23. Harris PA, Taylor R, Thielke R, Payne J, Gonzalez N, Conde JG. Research Electronic Data Capture (Redcap)—a Metadata-Driven Methodology and Workflow Process for Providing Translational Research Informatics Support. *J Biomed Inf* (2009) 42(2):377–81. doi: 10.1016/j.jbi.2008.08.010
24. Kurmit KC, Kim GN, Fellman BM, Urbauer DL, Mills GB, Zhang W, et al. CTNNB1 (Beta-Catenin) Mutation Identifies Low Grade, Early Stage

- Endometrial Cancer Patients at Increased Risk of Recurrence. *Modern Pathol* (2017) 30(7):1032–41. doi: 10.1038/modpathol.2017.15
25. Moroney MR, Davies KD, Wilberger AC, Sheeder J, Post MD, Berning AA, et al. Molecular Markers in Recurrent Stage I, Grade 1 Endometrioid Endometrial Cancers. *Gynecol Oncol* (2019) 153(3):517–20. doi: 10.1016/j.ygyo.2019.03.100
  26. McMellen A, Woodruff ER, Corr BR, Bitler BG, Moroney MR. Wnt Signaling in Gynecologic Malignancies. *Int J Mol Sci* (2020) 21(12):4272. doi: 10.3390/ijms21124272
  27. Hsu YT, Osmulski P, Wang Y, Huang YW, Liu L, Ruan J, et al. Epcam-Regulated Transcription Exerts Influences on Nanomechanical Properties of Endometrial Cancer Cells That Promote Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Cancer Res* (2016) 76(21):6171–82. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0752
  28. Shilton DN, Fornalik H, Neff T, Park SY, Bender D, DeGeest K, et al. The Role of LEF1 in Endometrial Gland Formation and Carcinogenesis. *PLoS One* (2012) 7(7):e40312. doi: 10.1371/journal.pone.0040312
  29. André F, Ciruelos EM, Juric D, Loibl S, Campone M, Mayer IA, et al. Alpelisib Plus Fulvestrant for PIK3CA-Mutated, Hormone Receptor-Positive, Human Epidermal Growth Factor Receptor-2-Negative Advanced Breast Cancer: Final Overall Survival Results From SOLAR-1. *Ann Oncol* (2021) 32(2):208–17. doi: 10.1016/j.annonc.2020.11.011
  30. Raglan O, Assi N, Nautiyal J, Lu H, Gabra H, Gunter MJ, et al. Proteomic Analysis of Malignant and Benign Endometrium According to Obesity and Insulin-Resistance Status Using Reverse Phase Protein Array. *Trans Res* (2020) 218:57–72. doi: 10.1016/j.trsl.2019.12.003
  31. Berg HF, Ju Z, Myrvold M, Fasmer KE, Halle MK, Hoivik EA, et al. Development of Prediction Models for Lymph Node Metastasis in Endometrioid Endometrial Carcinoma. *Br J Cancer* (2020) 122(7):1014–22. doi: 10.1038/s41416-020-0745-6
  32. Dai ZT, Wang J, Zhao K, Xiang Y, Li JP, Zhang HM, et al. Integrated TCGA and GEO Analysis Showed That SMAD7 Is an Independent Prognostic Factor for Lung Adenocarcinoma. *Medicine* (2020) 99(44):e22861. doi: 10.1097/MD.00000000000022861
  33. Ngeow J, Yu W, Yehia L, Niazi F, Chen J, Tang X, et al. Exome Sequencing Reveals Germline SMAD9 Mutation That Reduces Phosphatase and Tensin Homolog Expression and is Associated With Hamartomatous Polyposis and Gastrointestinal Ganglioneuromas. *Gastroenterology* (2015) 149(4):886–9.e5. doi: 10.1053/j.gastro.2015.06.027
  34. Gao L, Tian Q, Wu T, Shi S, Yin X, Liu L, et al. Reduction of MiR-744 Delivered by NSCLC Cell-Derived Extracellular Vesicles Upregulates SUV39H1 to Promote NSCLC Progression via Activation of the Smad9/BMP9 Axis. *J Trans Med* (2021) 19(1):37. doi: 10.1186/s12967-020-02654-9
  35. Andrade DAP, da Silva VD, Matsushita GM, de Lima MA, Vieira MA, Andrade C, et al. Squamous Differentiation Portends Poor Prognosis in Low and Intermediate-Risk Endometrioid Endometrial Cancer. *PLoS One* (2019) 14(10):e0220086. doi: 10.1371/journal.pone.0220086
  36. Misirlioglu S, Guzel AB, Gulec UK, Gumurdulu D, Vardar MA. Prognostic Factors Determining Recurrence in Early-Stage Endometrial Cancer. *Eur J Gynaecol Oncol* (2012) 33(6):610–4.
  37. Kaspers M, Llamocca E, Quick A, Dholakia J, Salani R, Felix AS. Black and Hispanic Women are Less Likely Than White Women to Receive Guideline-Concordant Endometrial Cancer Treatment. *Am J Obstetrics Gynecol* (2020) 223(3):398.e1–e18. doi: 10.1016/j.ajog.2020.02.041
  38. Leal LF, Evangalista AF, de Paula FE, Caravina Almeida G, Carloni AC, Saggiaro F, et al. Reproducibility of the Nanostring 22-Gene Molecular Subgroup Assay for Improved Prognostic Prediction of Medulloblastoma. *Neuropathol Off J Jpn Soc Neuropathol* (2018) 38(5):475–83. doi: 10.1111/ncup.12508
  39. Manion E, Cohen MB, Weydert J. Mandatory Second Opinion in Surgical Pathology Referral Material: Clinical Consequences of Major Disagreements. *Am J Surg Pathol* (2008) 32(5):732–7. doi: 10.1097/PAS.0b013e31815a04f5
  40. de Boer SM, Wortman BG, Bosse T, Powell ME, Singh N, Hollema H, et al. Clinical Consequences of Upfront Pathology Review in the Randomised PORTEC-3 Trial for High-Risk Endometrial Cancer. *Ann Oncol* (2018) 29(2):A24–30. doi: 10.1093/annonc/mdx753

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

**Publisher's Note:** All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2021 de Andrade, da Silva, Laus, de Lima, Berardinelli, da Silva, Matsushita, Bonatelli, da Silva, Evangalista, Carvalho, Reis and dos Reis. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

ANEXO 5. Artigos publicados em conjunto com o orientador não relacionados à Tese.

**Artigo 1** – *Early removal of indwelling urinary catheter after radical surgery for early-stage cervical cancer – A cohort study.*

Received: 15 December 2019 | Accepted: 31 July 2020

DOI: 10.1002/jsr.26167



RESEARCH ARTICLE

JOURNAL OF SURGICAL ONCOLOGY WILEY

## Early removal of indwelling urinary catheter after radical surgery for early-stage cervical cancer—A cohort study

Mariana F. Mengatto RN<sup>1</sup> | Beatriz G. R. Castro MD<sup>2</sup> |  
 Leandro Nobrega MSc, MD<sup>1</sup> | Marcelo A. Vieira MSc, MD<sup>1</sup> |  
 Carlos E. M. C. Andrade MSc, MD<sup>1</sup> | Audrey T. Tsunoda MD, PhD<sup>3</sup> |  
 Diocésio A. P. de Andrade MSc, MD<sup>4</sup> | Ricardo dos Reis MD, PhD<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Gynecologic Oncology, Barretos Cancer Hospital, Barretos, São Paulo, Brazil

<sup>2</sup>Barretos School of Health Sciences, Dr. Paulo Prata—FACISB, Barretos, Brazil

<sup>3</sup>Department of Gynecologic Oncology, Erasto Gaertner Hospital, Curitiba, Brazil

<sup>4</sup>InORP Oncoclínicas Group, Oncology Institute of Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, Brazil

### Correspondence

Ricardo dos Reis, MD, PhD, Department of Gynecologic Oncology, Barretos Cancer Hospital, Dr. Paulo Prata, Rua Antenor Duarte Vilela, 1331, Barretos, SP 14784-400, Brazil. Email: drricardoreis@gmail.com

### Funding information

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Grant/Award Number: No. 2017/20777-0

### Abstract

**Objective:** To evaluate the difference between early and delayed removal of indwelling urinary catheter after radical hysterectomy (RH) or radical trachelectomy (RT).

**Methods:** An ambispective study was conducted in early-stage cervical cancer patients who underwent RH or RT. Delayed indwelling urinary catheter removal occurred on a postoperative day (POD) 7 in the retrospective group (January 2012–November 2013), and early removal occurred on POD 1 in the prospective group (May 2014–June 2017). The postvoid residual (PVR) test was performed after indwelling catheter removal in both groups.

**Results:** Our sample included 47 patients in the delayed group and 48 in the early one. There was no difference in age, body mass index, tumor size, histology, stage, surgical approach, and intraoperative and postoperative complications. Indwelling urinary catheter reinsertion was needed in 16 (34%) patients in the delayed group and 12 (25%) in the early group ( $P = .37$ ), with no statistical difference between the median PVR volumes –82.5 and 45 mL ( $P = .06$ ), respectively. Seven (14.9%) patients in the delayed group presented with 30-day urinary tract infection vs two (4.2%) in the early group ( $P = .09$ ).

**Conclusions:** Early indwelling urinary catheter removal, in regard to the rate of catheter reinsertion and PVR volume, does not differ from delayed removal.

### KEYWORDS

cervical cancer, radical hysterectomy, urinary catheter, urinary retention

## 1 | INTRODUCTION

Radical hysterectomy (RH) is the standard treatment for early-stage cervical cancer.<sup>1,2</sup> The most frequent postoperative complication in RH involves the urinary tract.<sup>3</sup> Cervical cancer survivors can present different lower urinary tract dysfunctions according to their treatment modality. While storage dysfunction is more prevalent after concurrent chemoradiation, voiding disorders seem to be higher following RH.<sup>4</sup>

Some studies confirmed bladder dysfunction after RH by analyzing questionnaires, objective urodynamic study parameters, or both.<sup>5–7</sup> Chen et al<sup>5</sup> reported postoperative detrusor dysfunction and altered bladder sensation, capacity, and compliance, which persisted beyond 6 months after surgery. RH with a non-nerve-sparing technique, adjuvant radiation therapy, and voiding with abdominal straining 3 months after surgery were found to be predictive factors of persistent low bladder compliance.<sup>8</sup>

The duration of postoperative catheterization comprises the period between the date of surgery and the first postvoid residual (PVR) test. Urinary catheterization is useful to assess bladder function recovery after RH; however, the mean duration of postoperative catheterization varies in the literature.<sup>9-11</sup> Chamberlain et al<sup>11</sup> showed that early removal of indwelling urinary catheter after RH presented a shorter median duration of postoperative catheterization compared to the historical control group (6 vs 30 days) with no increase in postoperative complications. Furthermore, prolonged postoperative catheterization was associated with urinary tract infection and more extended hospital stay, which can impact postoperative outcomes, and, consequently, the patient's quality of life.<sup>12</sup>

This study aims to evaluate whether early removal of indwelling catheter on the first postoperative day (POD) differs from delayed removal after radical surgery for early-stage cervical cancer.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

An ambispective study was conducted in early-stage cervical cancer patients after ethical approval from the institutional review board. They underwent open or minimally invasive nerve-sparing RH (type B or type C1, according to Querleu-Morrow classification) or radical trachelectomy (RT) at the Department of Gynecologic Oncology.<sup>13</sup> All patients were clinically staged using the International Federation of Gynecology and Obstetrics staging system.<sup>14</sup> Patients with stage IA1 with lymph-vascular space invasion, IA2, IB1, or IB2, and with squamous or adenocarcinoma histology were included. The exclusion criteria were patients whose data were missing, RH for endometrial cancer, patients whose RH was aborted, and patients who had been treated in another oncological center. Data were collected to obtain patient demographics, surgical data, and clinical outcomes. REDCap was used for storing patient data.<sup>15</sup>

The sample was divided into two groups. The retrospective group was based on a consecutive sample conducted between January 2012 and November 2013. Patients in this group were discharged with a Foley catheter, and indwelling urinary catheter removal occurred, on average, on POD 7, in an outpatient clinic (delayed removal—historical control). These women were instructed to ingest liquids for 3 to 6 hours, and, right after spontaneous voiding or in the absence of voiding, a PVR test (test 1—POD 7) was performed, using an intermittent urinary catheter to measure the PVR volume. If the PVR volume was less than 100 mL, the voiding function was considered satisfactory,<sup>10,16-21</sup> and the patient remained without an indwelling catheter. If the patient was not able to spontaneously void or if the PVR volume was greater than 100 mL, an indwelling catheter was reinserted, and additional PVR tests were subsequently performed at weekly intervals.

The prospective group included patients treated from May 2014 to June 2017 who had indwelling urinary catheter removal on the POD 1 (early removal—intervention group). Women were instructed to ingest liquids for 3 to 6 hours, and, after spontaneous voiding or in the absence of voiding, a PVR test (test 1—POD 1) was performed,

using an intermittent urinary catheter to measure the PVR volume. If PVR volume was less than 100 mL, voiding function was considered satisfactory.<sup>10,16-21</sup> These women were discharged without an indwelling urinary catheter. Another test (test 2) was performed on POD 7 at a gynecologic oncology clinic by the same nurse to confirm whether the urinary residual volume remained less than 100 mL. For patients who were not able to spontaneously void or had PVR volume greater than 100 mL, an indwelling urinary catheter was reinserted and subsequent attempts to remove the catheter with PVR testing were performed at weekly intervals.

In both groups, weekly evaluations were performed for four consecutive weeks in patients presenting PVR volume greater than 100 mL. If PVR volume remained greater than 100 mL after this period, a urodynamic study was indicated to evaluate the necessity of using clean intermittent catheterization.

### 2.1 | Statistical analysis

The sample was characterized using the median, minimum, and maximum values for quantitative variables and cross tables for qualitative ones. Univariate analysis was performed using the Mann-Whitney,  $\chi^2$ , and Fisher exact tests. In multivariate analysis, a logistic regression model was adjusted to estimate indwelling urinary catheter reinsertion predictors, through which we estimated the corrected relative risk (RR) and the respective 95% confidence interval (95% CI). The analyses were performed using IBM-SPSS software v.21.0. A 5% significance level was assumed, and two-tailed values of *P* were considered throughout the statistical analysis.

## 3 | RESULTS

A total of 95 women were included in this study: 47 (49.5%) in the delayed removal and 48 (50.5%) in the early removal group. Details of demographic, clinical, and perioperative characteristics according to the moment of indwelling urinary catheter removal are shown in Table 1. The median age in the delayed removal group was 44 (29-64) years old, while it was 40 (27-72) in the early removal cohort (*P* = .08). The duration of postoperative catheterization for the delayed removal group was 168 hours (96-336), whereas for the early removal group it was 18 hours (12-24) (*P* < .001). There was no significant difference between the groups regarding body mass index, tumor size, histology, stage, surgical approach, intraoperative and postoperative complications, or urinary complications (urinary tract infection and urinary incontinence).

Regarding PVR volume, there was no significant statistical difference between the delayed removal and the early removal groups. The PVR volume in test 1 was 80 (0-900) and 45 mL (0-800), respectively (*P* = .06) (Table 2). The PVR volume in test 2 was 60 mL (0-1200) in the early removal group.

Details of indwelling urinary catheter reinsertion and urodynamic evaluation in both groups are described in Table 3. At least one

**TABLE 1** Demographic, clinical, and perioperative characteristics according to the moment of indwelling urinary catheter removal

Variable	Delayed (47) Median (min-max) N (%)	Early (48) Median (min-max) N (%)	P
Age, y	44 (29-64)	40 (27-72)	.08
BMI (kg/m <sup>2</sup> ) <sup>a</sup>	25.43 (18.67-37.86)	26.63 (20.24-46.34)	.41
Duration of postoperative catheterization, h	168 (96-336)	18 (12-24)	<.001
Tumor size, mm	16 (2-45)	12 (2-50)	.37
Previous perineal surgery <sup>a</sup>			.99
No	45 (95.7%)	46 (97.9%)	
Yes	2 (4.3%)	1 (2.1%)	
Histology			.1
Squamous	24 (51.1%)	33 (68.8%)	
Adenocarcinoma	23 (48.9%)	15 (31.3%)	
Stage			.69
IA1	1 (2.1%)	3 (6.3%)	
IA2	6 (12.8%)	7 (14.6%)	
IB1	39 (83.0%)	36 (75.0%)	
IB2	1 (2.1%)	2 (4.1%)	
Type of procedure			.62
Radical hysterectomy	46 (97.9%)	45 (93.8%)	
Radical trachelectomy	1 (2.1%)	3 (6.3%)	
Surgical technique <sup>a</sup>			.22
Type B	27 (57.4%)	20 (42.6%)	
Type C1	20 (42.6%)	27 (57.4%)	
Surgical approach			.47
Laparoscopy	35 (74.5%)	39 (81.2%)	
Laparotomy	12 (25.5%)	9 (18.8%)	
Intraoperative complication			.99
No	46 (97.9%)	47 (97.9%)	
Yes	1 (2.1%)	1 (2.1%)	
Type of intraoperative complication			...*
Bladder lesion	1 (100.0%)	0 (0.0%)	
Blood transfusion	0 (0.0%)	1 (100.0%)	
Early postoperative complication (<30 d)			.12
No	39 (83.0%)	45 (93.8%)	
Yes	8 (17.0%)	3 (6.3%)	
Urinary tract infection (<30 d)			.09
No	40 (85.1%)	46 (95.8%)	
Yes	7 (14.9%)	2 (4.2%)	
Urinary incontinence (<30 d)			.99
No	46 (97.9%)	47 (97.9%)	
Yes	1 (2.1%)	1 (2.1%)	

Abbreviations: BMI, body mass index; max, maximum; min, minimum; mm, millimeters; N, number.

<sup>a</sup>One missing data in prospective group.

\*Test not performed due to data distribution.

**TABLE 2** Comparison of PVR volume between groups

Median (min-max)	Postvoid residual volume, mL		P
	Delayed Median (min-max)	Early	
Test 1 n	41 <sup>a</sup> 80 (0-900)	48 45 (0-800)	.06
Test 2 n	16 <sup>b</sup> 80 (5-250)	46 <sup>b</sup> 60 (0-1200)	.09
Test 3 n	6 <sup>c</sup> 95 (10-300)	8 55 (0-120)	.17
Test 4 n	2 <sup>c</sup> 115 (110-120)	2 145 (40-250)	... <sup>a</sup>
Test 5 n	1 400 (400-400)	1 100 (100-100)	... <sup>a</sup>

Abbreviations: max, maximum; min, minimum; mL, milliliters; PVR, postvoid residual.

<sup>a</sup>Missing data six.

<sup>b</sup>Missing data two.

<sup>c</sup>Missing data one.

\*Test not performed due to data distribution.

indwelling catheter reinsertion was required in 16 (34.0%) patients from the delayed removal group and in 14 (29.2%) from the early removal group ( $P = .66$ ). Catheter reinsertion after the first PVR test (test 1) was required in 16 (34.0%) patients in the delayed removal group vs 12 (25.0%) in the early removal group ( $P = .37$ ). The reinsertion for two or more times of indwelling catheter occurred in seven (14.9%) and four (8.3%) patients in the delayed removal and early removal groups, respectively ( $P = .63$ ). A total of 24 (51.1%) patients in the delayed removal group required urodynamic evaluation, while it was necessary in only 12 (25.0%) patients in the early removal group ( $P = .011$ ).

No predictor of indwelling urinary catheter reinsertion was found in the delayed removal group's demographic, clinical, and surgical factors (Table 4). On the logistic regression model, only age was included, but it remained without statistical significance on the multivariate analysis (RR: 0.957; 95% CI: 0.91-1.005;  $P = .08$ ). Also, in the early removal, the same demographic, clinical, and surgical factors were analyzed, and no predictor of indwelling catheter reinsertion was found (Table 5). As there was no variable with  $P < .2$ , it was not possible to perform the multivariate analysis.

## 4 | DISCUSSION

This is, to the best of our knowledge, the first study to evaluate the feasibility of removing indwelling urinary catheter on POD 1 compared to delayed removal after radical surgery for cervical cancer, in regard to PVR volume, the need for catheter reinsertion, and post-operative outcomes. The results presented here demonstrate that PVR volume had no significant statistical difference comparing the delayed and early catheter removal groups. However, absolute PVR volume was lower in patients whose catheter removal occurred on POD 1 in almost all tests. We did not find any difference in PVR volume on POD 7, comparing delayed and early urinary catheter removal groups. Indwelling urinary catheter reinsertion rate did not differ in either group, and there were no predictive factors for catheter reinsertion. Nevertheless, the need for urodynamic evaluation was significantly higher in the delayed catheter removal group.

The normal volume of urine left in the bladder at the completion of micturition varies in the medical literature. However, most authors consider a PVR of 50 to 100 mL to be normal, greater than 200 mL to be abnormal, and between 100 and 200 mL to require clinical assessment.<sup>22,23</sup> Roh et al<sup>24</sup> conducted a prospective randomized

**TABLE 3** Comparison between indwelling urinary catheter reinsertion in both groups

Variable	Category	Group				P
		Delayed		Early		
		n	%	n	%	
At least one reinsertion	No	31	66.0%	34	70.8%	.66
	Yes	16	34.0%	14	29.2%	
Reinsertion after test 1	No	31	66.0%	36	75.0%	.37
	Yes	16	34.0%	12	25.0%	
Number of reinsertions	0	31	66.0%	34	70.8%	.63
	1	9	19.1%	10	20.8%	
	≥2	7	14.9%	4	8.3%	
Urodynamic evaluation	No	23	48.9%	36	75.0%	.011
	Yes	24	51.1%	12	25.0%	
Urodynamic result	Normal	11	45.8%	10	83.3%	.13
	Overflow incontinence	1	4.2%	0	0.0%	
	Stress incontinence	5	20.8%	0	0.0%	
	Urinary retention	7	29.2%	2	16.7%	

**TABLE 4** Predictive factors of indwelling urinary catheter (IUC) reinsertion in delayed removal group

Delayed removal group			
Variable	IUC reinsertion		P
	No (31) Median (min-max) N (%)	Yes (16) Median (min-max) N (%)	
Age, y	45 (32-64)	40 (29-64)	.07
BMI, kg/m <sup>2</sup>	25.43 (19.29-37.86)	25.68 (18.67-35.84)	.68
Parity	2 (0-12)	2 (0-5)	.43
C-section	0 (0-3)	1 (0-3)	.82
Abortions	0 (0-3)	0 (0-4)	.81
Operative time, min	223 (75-410)	210 (160-360)	.61
Tumor size, mm	13 (2-45)	22 (3-40)	.05
Previous perineal surgery			.99
No	30 (96.8%)	15 (93.8%)	
Yes	1 (3.2%)	1 (6.3%)	
Histology			.76
Squamous carcinoma	15 (48.4%)	9 (56.3%)	
Adenocarcinoma	16 (51.6%)	7 (43.8%)	
Stage			.74
IA1	1 (3.2%)	0 (0.0%)	
IA2	5 (16.1%)	1 (6.3%)	
IB1	24 (77.5%)	15 (93.8%)	
IB2	1 (3.2%)	0 (0.0%)	
Type of procedure			.99
Radical hysterectomy	30 (96.8%)	16 (100.0%)	
Radical trachelectomy	1 (3.2%)	0 (0.0%)	
Surgical technique			.54
Type B	19 (61.3%)	8 (50.0%)	
Type C1	12 (38.7%)	8 (50.0%)	
Surgical approach			.99
Laparoscopy	23 (74.2%)	12 (75.0%)	
Laparotomy	8 (25.8%)	4 (25.0%)	
Intraoperative complication			.99
No	30 (96.8%)	16 (100.0%)	
Yes	1 (3.2%)	0 (0.0%)	

Abbreviations: BMI, body mass index; max, maximum; min, minimum; mm, millimeters; N, number.

controlled trial involving patients with cervical cancer who underwent conventional or nerve-sparing RH, in which they considered bladder recovery when PVR volume was less than 50 mL. Among patients from the nerve-sparing RH group, the median time taken to obtain a PVR volume of less than 50 mL was 11 days, while in the conventional RH group, it took 18 days.<sup>24</sup> Also, in Liang et al's<sup>25</sup> study, PVR volume was less than 50 mL, on average, on POD 7 in nerve-sparing RH and on POD 6 in conventional RH. In another study, it was necessary 14 days, on average, after nerve-sparing RH, to achieve a PVR volume of less than 50 mL.<sup>26</sup> Kavallaris et al<sup>27</sup> evaluated 32 early-stage cervical cancer patients after laparoscopic nerve-sparing RH with pelvic lymphadenectomy. In their study, all

patients were able to void spontaneously on POD 3, with a median PVR volume of less than 50 mL.<sup>27</sup> Our study considered voiding function as satisfactory when PVR volume was less than 100 mL, as in many other papers published before.<sup>10,16-21</sup> In our retrospective group (delayed indwelling urinary catheter removal), test 1 was performed, on average, on POD 7 with PVR volume less than 100 mL in 66.0% of patients, whereas in the prospective group (early indwelling catheter removal), it was performed on POD 1 with PVR volume less than 100 mL in 75.0% of patients.

Regarding PVR volume on POD 7, Yin et al<sup>28</sup> evaluated 27 early-stage cervical cancer patients, with PVR volume of less than 50 mL in 66.6%, and greater than 200 mL only in 7.4% of patients.<sup>28</sup> A study

**TABLE 5** Predictive factors of indwelling urinary catheter (IUC) reinsertion in early removal group

Early removal group			
Variable	IUC reinsertion		P
	No (34) Median (min-max) N (%)	Yes (14) Median (min-max) N (%)	
Age, y	40 (27-72)	40 (34-60)	.59
BMI (kg/m <sup>2</sup> ) <sup>a</sup>	26.46 (20.31-46.34)	27.31 (20.24-36.25)	.83
Parity	3 (0-7)	3 (0-5)	.28
C-section	1 (0-3)	0 (0-3)	.62
Abortions	0 (0-2)	0 (0-3)	.79
Operative time, min	237.50 (105.0-360.0)	255.0 (150.0-325.0)	.89
Tumor size, mm	12.0 (3.0-50.0)	14.5 (2.0-34.0)	.71
Previous perineal surgery <sup>b</sup>			.99
No	33 (97.1%)	13 (100.0%)	
Yes	1 (2.9%)	0 (0.0%)	
Histology			.74
Squamous carcinoma	24 (70.6%)	9 (64.3%)	
Adenocarcinoma	10 (29.4%)	5 (35.7%)	
Stage			.80
IA1	2 (5.9%)	1 (7.1%)	
IA2	6 (17.6%)	1 (7.1%)	
IB1	24 (70.6%)	12 (85.8%)	
IB2	2 (5.9%)	0 (0.0%)	
Type of procedure			.99
Radical hysterectomy	32 (94.1%)	13 (92.9%)	
Radical trachelectomy	2 (5.9%)	1 (7.1%)	
Surgical technique <sup>b</sup>			.99
Type B	14 (41.2%)	6 (46.2%)	
Type C1	20 (58.8%)	7 (53.8%)	
Surgical approach			.99
Laparoscopy	28 (82.4%)	11 (78.6%)	
Laparotomy	6 (17.6%)	3 (21.4%)	
Intraoperative complication			.99
No	33 (97.1%)	14 (100.0%)	
Yes	1 (2.9%)	0 (0.0%)	

Abbreviations: BMI, body mass index; max, maximum; min, minimum; mm, millimeters; N, number.

<sup>a</sup>Missing data one in the group without IUC reinsertion.

<sup>b</sup>Missing data one in the group with IUC reinsertion.

published by Nantasupha and Charoenkwan<sup>19</sup> voiding function was considered as adequate when PVR volume became less than 100 mL at least two times consecutively after RH in early-stage cervical cancer patients. Therefore, PVR volume on POD 7 was 48.2 and 296 mL in patients with and without adequate voiding function, respectively.<sup>19</sup> Yin et al<sup>28</sup> considered voiding function as satisfactory when PVR volume was less than 50 mL. This study was conducted in two parts: on the first one, indwelling urinary catheter removal was performed in 27 patients on POD 7; however, due to better results

than expected, on the second part, indwelling catheter removal was performed in 150 patients on POD 4. Reinsertion was necessary for 14.8% of patients from the first group, and all of them had a successful catheter removal on POD 14. On the other hand, reinsertion was required in 26.7% of patients from the second group, 85.0% from whom the indwelling catheter was successfully removed on POD 14. The other six patients needed longer catheterization.<sup>28</sup> In our findings, there was no difference in the indwelling urinary catheter reinsertion rate between both groups. In delayed catheter removal

group (on POD 7), its reinsertion was necessary for 34.0%, whereas it occurred in 29.2% of patients who had it removed on POD 1.

Raspagliesi et al<sup>17</sup> reported a 26% postoperative complication rate in nerve-sparing Piver III RH with pelvic lymphadenectomy for cervical cancer treatment. Two (9%) patients were discharged with self-catheterization and one recovered voiding function at the first postoperative visit.<sup>17</sup> In our study, we evaluated only early postoperative complications (within 30 days after surgery). In the delayed indwelling urinary catheter removal group, 17.0% of patients presented early postoperative complications (seven urinary tract infections and one urinary incontinence). In contrast, in the early indwelling catheter removal group, it occurred in 6.3% of patients (two urinary tract infections and one urinary incontinence). It is important to emphasize that although the difference between the two cohorts was not statistically significant, the 30-day urinary tract infection rate in the delayed indwelling urinary catheter removal group was nearly three times more frequent than in the early catheter removal group.

Nantasupha and Charoenkwan<sup>19</sup> demonstrated that, in early-stage cervical cancer patients, treated with RH, the predictive factors related to inadequate voiding function on POD 7 were tumor size, tumor appearance (gross vs microscopic), stage, preoperative chemotherapy, postoperative urinary tract infection, primary surgeon, prior conization, length of vaginal and parametrial resection, and parametrial margin. Oda et al<sup>8</sup> reported that non-nerve-sparing RH, adjuvant radiotherapy, and voiding with abdominal pressure at 3 months after surgery were predictive factors for persistent low bladder compliance after RH. In our analysis, there were no risk factors for inadequate voiding function nor the necessity of indwelling urinary catheter reinsertion in any group.

Our study's major weakness is its retrospective nature in the group with delayed indwelling urinary catheter removal. Bias in data collection can be implied, since some information may have been omitted in medical records. Even though absolute data seem to favor POD 1 catheter removal, nonstatistical differences can be due to the limited cohort number. The strengths of our study include the fact that the early urinary catheter removal group was prospective. Although many studies compare the voiding function between nerve-sparing and non-nerve-sparing RH, all RH were nerve-sparing in this cohort. Also, this is the first study to include RT in the analyses. Besides that our results are consistent because they originate from a single reference cancer institution in Brazil, which maintains standard protocols and routines in patient management.

## 5 | CONCLUSION

Our study found that indwelling urinary catheter removal can be accomplished on POD 1 without compromising catheter reinsertion rate, PVR volume, and 30-day urinary postoperative complications. Hence, there might be lower cost, less pain, shorter hospital stay, and less postoperative comorbidities, such as urinary tract infection and antibiotic use. Besides that, the early removal group was associated with less need for urodynamic assessment. The possible complications and comorbidities described above can impair patients' quality

of life. Considering early-stage cervical cancer overall survival rates, therefore, it is crucial to minimize morbidity related to RH.

## ACKNOWLEDGMENT

This study was supported by the State of São Paulo Research Foundation (No. 2017/20777-0).

## CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare that there are no conflict of interests.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets generated and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

## ORCID

Beatriz G. R. Castro  <http://orcid.org/0000-0003-4965-0373>

Leandro Nobrega  <http://orcid.org/0000-0001-9006-8823>

Ricardo dos Reis  <http://orcid.org/0000-0002-8271-3690>

## REFERENCES

- Meirovitz M, Sade S, Dreier J, Shaco-Levy R. Is radical hysterectomy necessary in early cervical cancer? *Gynecol Obstet Invest.* 2013;76: 158-162.
- Nam EJ, Kim SW, Kim S, et al. A case-control study of robotic radical hysterectomy and pelvic lymphadenectomy using 3 robotic arms compared with abdominal radical hysterectomy in cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer.* 2010;20:1284-1289.
- Ayhan A, Tuncer ZS, Yarali H. Complications of radical hysterectomy in women with early stage cervical cancer: clinical analysis of 270 cases. *Eur J Surg Oncol.* 1991;17:492-494.
- Katepratoom C, Manchana T, Amornwichee N. Lower urinary tract dysfunction and quality of life in cervical cancer survivors after concurrent chemoradiation versus radical hysterectomy. *Int Urogynecol J.* 2014;25:91-96.
- Chen GD, Lin LY, Wang PH, Lee HS. Urinary tract dysfunction after radical hysterectomy for cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 2002;85: 292-297.
- Manchana T, Prasartsakulchai C, Santingamkun A. Long-term lower urinary tract dysfunction after radical hysterectomy in patients with early postoperative voiding dysfunction. *Int Urogynecol J.* 2010;21: 95-101.
- Sekido N, Kawai K, Akaza H. Lower urinary tract dysfunction as persistent complication of radical hysterectomy. *Int J Urol.* 1997;4: 259-264.
- Oda Y, Todo Y, Hanley S, et al. Risk factors for persistent low bladder compliance after radical hysterectomy. *Int J Gynecol Cancer.* 2011; 21:167-172.
- Charoenkwan K. A simplified technique for nerve-sparing type III radical hysterectomy: by reorganizing their surgical sequence, surgeons could more easily identify key nerves. *Am J Obstet Gynecol.* 2010;203:600.e1-600.e6.
- Chen L, Zhang WN, Zhang SM, Yang ZH, Zhang P. Effect of laparoscopic nerve-sparing radical hysterectomy on bladder function, intestinal function recovery and quality of sexual life in patients with cervical carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014;15: 10971-10975.
- Chamberlain DH, Hopkins MP, Roberts JA, McGuire EJ, Morley GW, Wang CC. The effects of early removal of indwelling urinary catheter after radical hysterectomy. *Gynecol Oncol.* 1991;43:98-102.

12. Ahmed MR, Sayed Ahmed WA, Atwa KA, Metwally L. Timing of urinary catheter removal after uncomplicated total abdominal hysterectomy: a prospective randomized trial. *Eur J Obstet Gynaecol Reprod Biol.* 2014;176:60-63.
13. Cibula D, Abu-Rustum NR, Benedetti-Panici P, et al. New classification system of radical hysterectomy: emphasis on a three-dimensional anatomic template for parametrial resection. *Gynecol Oncol.* 2011;122:264-268.
14. Pecorelli S. Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, and endometrium. *Int J Gynaecol Obstet.* 2009;105:103-104.
15. Harris PA, Taylor R, Thielke R, Payne J, Gonzalez N, Conde JG. Research electronic data capture (REDCap)—a metadata-driven methodology and workflow process for providing translational research informatics support. *J Biomed Inf.* 2009;42:377-381.
16. Oh JK, Park NH, Oh SJ. Effect of the systematised critical pathway protocol on emptying failure as a secondary complication of radical hysterectomy due to uterine cervix cancer. *J Clin Nurs.* 2014;23:1702-1707.
17. Raspagliesi F, Ditto A, Fontanelli R, et al. Nerve-sparing radical hysterectomy: a surgical technique for preserving the autonomic hypogastric nerve. *Gynecol Oncol.* 2004;93:307-314.
18. Raspagliesi F, Ditto A, Fontanelli R, et al. Type II versus type III nerve-sparing radical hysterectomy: comparison of lower urinary tract dysfunctions. *Gynecol Oncol.* 2006;102:256-262.
19. Nantasupha C, Charoenkwan K. Predicting factors for resumption of spontaneous voiding following nerve-sparing radical hysterectomy. *J Gynecol Oncol.* 2018;29:e59.
20. Espino-Strebel EE, Luna JT, Domingo EJ. A comparison of the feasibility and safety of nerve-sparing radical hysterectomy with the conventional radical hysterectomy. *Int J Gynecol Cancer.* 2010;20:1274-1283.
21. Wu J, Liu X, Hua K, Hu C, Chen X, Lu X. Effect of nerve-sparing radical hysterectomy on bladder function recovery and quality of life in patients with cervical carcinoma. *Int J Gynecol Cancer.* 2010;20:905-909.
22. Gehrich A, Stany MP, Fischer JR, Buller J, Zahn CM. Establishing a mean postvoid residual volume in asymptomatic perimenopausal and postmenopausal women. *Obstet Gynecol.* 2007;110(4):827-832.
23. Haylen BT, Lee J, Logan V, Husseelbee S, Zhou J, Law M. Immediate postvoid residual volumes in women with symptoms of pelvic floor dysfunction. *Obstet Gynecol.* 2008;111(6):1305-1312.
24. Roh JW, Lee DO, Suh DH, et al. Efficacy and oncologic safety of nerve-sparing radical hysterectomy for cervical cancer: a randomized controlled trial. *J Gynecol Oncol.* 2015;26:90-99.
25. Liang Z, Chen Y, Xu H, Li Y, Wang D. Laparoscopic nerve-sparing radical hysterectomy with fascia space dissection technique for cervical cancer: description of technique and outcomes. *Gynecol Oncol.* 2010;119:202-207.
26. Fujii S, Takakura K, Matsumura N, et al. Anatomic identification and functional outcomes of the nerve sparing Okabayashi radical hysterectomy. *Gynecol Oncol.* 2007;107:4-13.
27. Kavallaris A, Hornemann A, Chalvatzas N, Luedders D, Diedrich K, Bohlmann MK. Laparoscopic nerve-sparing radical hysterectomy: description of the technique and patients' outcome. *Gynecol Oncol.* 2010;119:198-201.
28. Yin S, Ma SN, Zhang YQ, et al. Surgical and oncological outcomes of an improved nerve-sparing radical hysterectomy technique: 6 years of experience at two centres. *Surg Oncol.* 2018;27:380-386.

**How to cite this article:** Mengatto MF, Castro BGR, Nobrega L, et al. Early removal of indwelling urinary catheter after radical surgery for early-stage cervical cancer—A cohort study. *J Surg Oncol.* 2020;1-8.  
<https://doi.org/10.1002/jso.26167>

**Artigo 2 – Accuracy of MRI for diagnosing pelvic and para-aortic lymph node metastasis in cervical cancer.**

ONCOLOGY REPORTS 45: 100, 2021

## Accuracy of MRI for diagnosing pelvic and para-aortic lymph node metastasis in cervical cancer

TAMIRIS DEZEN<sup>1</sup>, RODRIGO RIBEIRO ROSSINI<sup>2</sup>, MARCELO DIMAS SPADIN<sup>2</sup>,  
CARLOS EDUARDO MATTOS DA CUNHA ANDRADE<sup>3</sup>, RONALDO SCHIMIDT<sup>3</sup>, MARCELO A. VIEIRA<sup>3</sup>,  
MARCOS A. LIMA<sup>4</sup>, DIOCÉSIO ALVES PINTO DE ANDRADE<sup>5</sup> and RICARDO DOS REIS<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Barretos Health Sciences Faculty Dr. Paulo Prata, Barretos, São Paulo 14785002; Departments of <sup>2</sup>Radiology, <sup>3</sup>Gynecologic Oncology and <sup>4</sup>Epidemiology and Biostatistics at Barretos Cancer Hospital, Barretos, São Paulo 14784400; <sup>5</sup>InORP ONCOCLÍNICAS Group (Oncology Institute of Ribeirão Preto), Ribeirão Preto, São Paulo 14025270, Brazil

Received May 9, 2019; Accepted March 12, 2020

DOI: 10.3892/or.2021.8051

**Abstract.** The current study aimed to evaluate the accuracy of diffusion-weighted imaging and morphological aspects at 3 Tesla (T) and 1.5T MRI for diagnosing metastatic lymph nodes (LN) in cervical cancer. A retrospective study was conducted at the Barretos Cancer Hospital. A total of 45 patients with cervical cancer who underwent MRI examination and pelvic and/or para-aortic lymphadenectomy as part of surgical procedure were included. Data regarding LN images included size (short-axis diameters), morphology (usual, rounded or amorphous), appearance (homogeneous or heterogeneous), limits (regular, irregular or imprecise), presence or absence of necrosis, diffusion (normal or greater restriction than expected for normal tissue) and aspect (suspected, undetermined or normal). These findings were compared with histopathological results. According to histology results, among the 45 patients, 14 (31.1%) LNs were tested positive for metastasis and 31 (68.9%) LNs were tested negative. A total of 41 metastatic positive LNs were detected from a total of 976 resected nodes. Twelve patients from the 45 (26.7%) had LN classified as metastatic by histology and suspected by MRI, 26 (57.8%) as negative in both evaluations, 2 (4.4%) as positive by histology and negative by MRI and five (11.1%) as negative by histology and positive by MRI. Based on these results, sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV) and accuracy were 85.7, 83.9, 70.6, 92.9 and 84.4%, respectively. The Cohen's  $\kappa$  test exposed a general outcome of 0.657 ( $P < 0.05$ ), demonstrating that the two variables (histology and MRI) have substantial concordance. The  $\kappa$  test results between histological and MRI data

for paraaortic and pelvic LNs were found to be 1 and 0.657, respectively. Finally, short axis  $>10$  mm, T2 hypointensity, rounded morphology and greater restriction than expected for normal tissues are the four most common MRI findings associated with metastatic LN. The concordance between MRI and histology was substantial, indicating that this method using MRI for diagnosing suspected LN metastasis is reliable. The results of the current study revealed that the most important aspects to be evaluated in MRI include: Short axis  $>10$  mm, T2 hypointensity, rounded morphology and greater restriction than expected for normal tissues. If these four characteristics are present in MRI, histological evaluation is likely to reveal positive lymph node metastasis.

### Introduction

According to the American Cancer Society, 13,240 new cases of cervical cancer were registered in the United States in 2018 (1). When regional or distant metastases are detected, survival rates within four years are 57 and 17%, respectively (1). The involvement of the lymphatic system is one of the most important predictors of poor prognosis (2) and the standard method used to determine the presence of lymph node (LN) involvement with precision is histological examination (3). MRI was subsequently developed for pre-operative evaluation and post-operative follow-up. Through morphological and functional tools, LN metastasis can be detected, categorized and staged using MRI (4,5).

An important tool in MRI is diffusion-weighted imaging (DWI), which randomizes molecular movement and provides insight into how tumors behave in the tissue environment (6). DWI uses the apparent diffusion coefficient (ADC) to analyze the magnitude of diffusion by measuring the diffusion of water molecules inside the tissue (5). In cancer tissues, ADC is normally low due to the high cancer cellularity and abundance of membranes (2,7-9). As the size, shape, extension of tumor outside the tissue and presence of necrosis can impact directly on treatment, these aspects must be evaluated to detect the existence of metastatic LNs (10,11).

Therefore, it is important to discriminate which LN has a higher chance of being metastatic, based on its morphological

---

*Correspondence to:* Miss Tamiris Dezen, Barretos Health Sciences Faculty Dr. Paulo Prata, 68 Avenida Loja Maçônica Renovadora, Barretos, São Paulo 14785002, Brazil  
E-mail: tata.dezen@yahoo.com.br

**Key words:** cervical cancer, MRI, lymph node, lymph node metastasis

and functional aspects, to avoid complications of lymphadenectomy as well as to define an optimal radiotherapy plan, without having to irradiate healthy tissue unnecessarily (12).

The current study evaluated morphological characteristics and DWI results of pelvic and paraaortic LNs using MRI in patients with cervical cancer and compared these results to histological analysis. To the best of the authors' knowledge, previous studies did not successfully compare imaging examinations of metastatic LNs in detail. The current study was designed to identify metastatic LNs with a higher precision compared with histopathological findings, and obtain more specific and sensitive results. The aim of the present study was to evaluate the accuracy of DWI and morphological features at 3 Tesla (T) and 1.5T MRI for diagnosing metastatic LNs in cervical cancer.

## Materials and methods

**Patient data.** The present study was entirely based on the review of patients' medical records, and no human samples were used. Approval was obtained from the Ethics Committee of Barretos Cancer Hospital (approval no. 1150/2016; Barretos, Brazil). All patients consented to the use of their medical records in the current study. Medical records of patients with cervical cancer who attended the Gynecologic Oncology Department between January 2013 and December 2016 were retrospectively reviewed to obtain patient demographics, imaging findings, surgical-pathological data and follow-up information after treatment. The present study included 45 female patients (age range, 26-74 years) with stage IA1 to IVB who also had lymph vascular space invasion, who had an MRI examination for primary local tumor staging. This group of patients belong to a group that underwent pelvic and/or paraaortic lymphadenectomy as part of surgical staging or primary treatment. Patients who did not undergo MRI examination or pelvic and/or paraaortic lymphadenectomy were excluded from this study. These patients were followed up after treatment until December 2019.

Recently, the International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) staging systems for cervical cancer have been revised and two new sub-categories were included to classify the stage by LN involvement, including IIIC1 (pelvic LN metastasis) and IIIC2 (para-aortic LN metastasis) (13). Since the information for the current study was collected before the update, patients were reclassified according to the new FIGO recommendations.

**Histological analyses.** Histological analyses were made on LNs resected in pelvic and/or paraaortic chains. All the LNs were cut into 3-mm thickness before they were embedded into paraffin cubes and cut using microtomes. The final thickness measured 4  $\mu$ m and the LNs were visualized using an optical microscope.

**Image analyses.** At the Barretos Cancer Hospital the inferior abdomen of patients with cervical cancer is evaluated through MRI scans, since the analysis of tumor and its relation to adjacent structures using MRI can yield superior visualization compared with that by abdominal CT. When evaluating pelvis and its structures, including those of suspected LNs, MRI

scans exhibit superior accuracy compared with CT. However, renal veins are evaluated using contrasted CT at the Barretos Cancer Hospital. The public health system in Brazil does not cover positron emission tomography-CT (PET-CT) analyses in patients with cervical and endometrial cancer. In addition, since the Barretos Cancer Hospital is a public institution, CT technology was not available between January 2013 and December 2016.

The standard protocol performed at The Radiology Department of Barretos Cancer Hospital to obtain the pelvic MRI images for cervical cancer included T2-weighted images (WI) in different planes (axial, sagittal and coronal) and T1-WI (slice thickness, 3 mm; slice gap, 0.3-mm). Images were acquired from the superior portion of the antero-superior iliac spine to the inferior portion of inferior pubic branches. High resolution T2-WI sequences were taken of the axial plane at 3 mm slice thickness, which were adjusted by sagittal and coronal planes (acquired in the same exam), with 3 mm slice thickness and no gap. The diffusion weighted sequence is acquired by using the same axial plane and slice thickness in the T2-weighted sequence with high resolution. This protocol also includes an additional T2-weighted sequence, with slice thickness of 3 and 0.3 mm gaps, which were acquired from the left renal vein until the lower pubic branches. Although these MRI images were captured to visualize pelvic LNs, the final sequence in the T2-WI aforementioned, which were taken using the same protocols, was also used to evaluate paraaortic LNs, since this sequence has higher cutting thickness and possible artifacts imaging (for instance intestinal gases and movement), which could reduce the analysis accuracy of the paraaortic LN.

Lymph node status was classified by the impression of the radiologists (R.R.S and M.D.S), according to the chain removed, including right pelvic (RP), left pelvic (LP) and paraaortic (PA) and its quality: Diagnostic and non-diagnostic samples were classified according to the subjective impression of the radiologists. Non-diagnostic samples were excluded from the analysis. All images were captured at baseline assessment using Achieva 3.0T (Philips Healthcare) or a Signa™ 1.5T HDxT (GE Healthcare). PACS software (version 3.3.36) inside packages with PixViewer and Viewer MPR (year 2019; version 19.9.0; Pixeon Medical Systems SA) was used to visualize the images.

The MRI images were analyzed before surgery by two experienced radiologists (RRR and MDS) in a blinded manner. The final report was through consensual analyzes and each LN was classified as normal or suspect. For correct distribution, all statistical analyses considered the following criteria for assessing the signal sequences of the MRI: i) Appearance, homogenous or heterogenous; ii) presence of necrosis, yes or no; and iii) T2 intensity, low broadcast, areas with low signal or normal signal. For assessing the morphological aspects using the conventional sequences of MRI, for following criteria were used: i) Size, short-axis diameter >10 mm; ii) morphology, usual, rounded or amorphous, iii) limits, regular, irregular or imprecise; iv) diffusion, normal or greater restriction than expected for normal tissue; and v) aspect, suspected or normal. Patients with  $\geq 1$  LN classified as suspect using MRI were considered positive, since the chain analyzed in MRI was the same chain that was removed in posterior surgery and then identified as positive by histology.

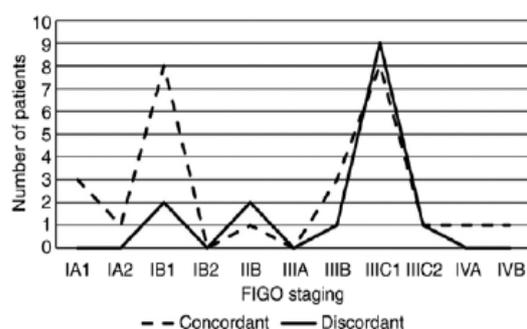


Figure 1. Number of patients exhibiting concordance and discordance according to FIGO staging and the presumed FIGO staging by MRI analysis.

**Statistical analysis.** Statistical analyses were performed using the SPSS software (version 21; IBM Corp.). Quantitative criteria (symmetric and non-symmetric) were presented as the mean  $\pm$  standard deviation and categorical data were presented as n (%). The  $\kappa$  and concordance test were used to evaluate if the variable MRI had a link with histopathology results, where values closer to 1 was considered to indicate higher degrees of concordance between the MRI and histopathology data.  $P < 0.05$  was considered to indicate a statistically significant difference. Sensitivity (S), specificity (E), positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) were used to determine the accuracy of MRI images. Study data will be collected and managed using Redcap software version 9.5.14 (Research Electronic Data Capture) electronic data capture tools hosted at MD Anderson (Texas) (14).

## Results

**General results.** A total of 45 patients with cervical cancer who underwent pelvic and/or paraaortic lymphadenectomy were included in the current study. The median age was 50 years (age range, 26-74). Among these 45 patients, 34 (75.6%) had squamous carcinoma, 8 (17.8%) had adenocarcinoma and 3 (6.6%) had other histological subtypes. According to the revised FIGO staging system 4 patients (8.9%) were categorized as IA1, 1 (2.2%) as IA2, 10 (22.2%) as IB1, 8 (18.8%) as IIB, 1 (2.2%) as IIIA, 3 (6.7%) as IIIB, 9 (20.0%) as IIIC1, 5 (11.1%) as IIIC2, 1 (2.2%) as IVA and 3 (6.7%) as IVB. In addition, FIGO stage diagnoses obtained by physical examination were compared with the FIGO stage prediction made using MRI before surgery. A total of 27 patients (60%) were concordant and 18 patients (40%) were discordant comparing histological FIGO stage and presumed FIGO stage by MRI, respectively. The number of concordant and discordant patients was determined at each FIGO stage (IA1-IVB; Fig. 1).

The MRI evaluated was before surgery (median, 43 days; range, 3-163 days). Among 45 patients, 14 (31.1%) and 31 (68.9%) had metastatic and negative LNs by histology, respectively. Among these 14 metastatic patients, 9 (64.3%) had positive LNs in both pelvic (RP and LP) and PA chains, 4 (28.6%) in PA and 1 (7.1%) in RP and PA. Among the 14 (31.1%) patients with positive LNs, 8 (57.2%) had no recurrence after treatment at the Barretos Cancer Hospital. However, recurrence was recorded in 6 (42.8%) patients.

These recurrences were diagnosed by MRI. Two patients (33.3%) had recurrence in pelvic organs, 2 (33.3%) in the abdomen, 1 (16.7%) in pelvic LNs and 1 (16.7%) pelvic LNs and lungs. Recurrence in the same lymphatic chain that had prior lymphadenectomy was observed in 3 patients (50%). Among the 31 patients with negative LNs, 26 (83.8%) had no recurrence, whereas 5 (16.2%) had recurrence. A total of 4 (80%) of these patients were diagnosed only by MRI and one (20%) by MRI and tomography. Among the 5 patients with recurrence, 3 (60%) were in the abdomen, 1 (20%) in liver and lungs, and 1 (20%) in pelvic organs.

**Comparison between data obtained using histology and MRI.** Comparing between histology and MRI findings, 12 patients (26.7%) had suspected LN metastasis by MRI and were tested positive by histological analysis, 26 (57.8%) were tested negative for LN metastasis by both MRI and histology, five (11.1%) were tested negative by histology and positive by MRI and two (4.4%) were tested positive by histology and negative by MRI (Table I). Based on these results, further analysis revealed the sensitivity, specificity, PPV, NPV and accuracy to be 85.7, 83.9, 70.6, 92.9 and 84.4%, respectively. The  $\kappa$  test exposed a general outcome of 0.657 ( $P < 0.05$ ), suggesting that the data obtained using histology and MRI have substantial concordance. According to the  $\kappa$  test, the value for data obtained using histology and MRI was calculated to be 1 for paraaortic LN and 0.657 for pelvic LN (both  $P < 0.05$ ).

To identify possible errors, the false negative and false positive cases were analyzed further to verify the concordance between data obtained by histological and MRI examinations. A total of two false negative cases were found, of which one (50%) did not reveal suspected LN metastasis by MRI and was subsequently admitted for pelvic and paraaortic lymphadenectomy. This patient had an important difference in the short axis diameter by pre-operative MRI (6 mm) compared with that revealed by histological analysis (23 mm), possibly due to the 41-day gap between MRI to surgery. The other false negative case had suspected LN metastasis in the bilateral pelvic chains as revealed by MRI and was admitted for paraaortic lymphadenectomy 15 days after MRI. Among the five false positive cases, three (60%) had suspected bilateral pelvic LN metastasis as revealed by MRI, one (20%) metastasis was detected in the right pelvic LN and one (20%) in the left pelvic LN. All five patients were admitted for pelvic and paraaortic lymphadenectomy. The MRI method used to analyze paraaortic LN is a one-sequence scan that was performed without good resolution and therefore could be the reason for underdiagnosis. The medical records of the five false positive cases were reviewed to examine the follow up status up until October 2019. In total, four (80%) patients were alive without disease and one (20%) died in 2015 as a result of cervical cancer.

Among the 12 true positive cases, four (33.3%) had suspected bilateral pelvic LN metastasis by MRI and were admitted for pelvic and paraaortic surgery, three (25.0%) had suspected right pelvic LN metastasis and received pelvic and paraaortic surgery, two (16.7%) had suspected bilateral pelvic and paraaortic LN metastasis and received paraaortic surgery, one (8.3%) had suspected right pelvic LN metastasis and was admitted for right pelvic and paraaortic surgery, one (8.3%) had suspected left pelvic LN metastasis and received pelvic

Table I. Patients with suspect and non-suspect lymph nodes by MRI comparing to histopathological results.

MRI	Positive by histological analysis N (%)	Negative by histological analysis N (%)	Total N (%)
Positive for suspected metastasis	12 (26.7)	5 (11.1)	17 (37.8)
Negative for suspected metastasis	2 (4.4)	26 (57.8)	28 (62.2)
Total	14 (31.1)	31 (68.9)	45 (100)

Table II. Distribution of number of analysis regarding number of lymph nodes encountered, according to lymphadenectomy performed and pre-operative MRI evaluation.

Chain	MRI=histology N (%)	MRI > histology N (%)	MRI < histology N (%)	Total N (%)
<b>False positive</b>				
LP	1 (6.7)	4 (26.7)	0 (0.0)	5 (33.3)
RP	1 (6.7)	4 (26.7)	0 (0.0)	5 (33.3)
PA	4 (26.7)	0 (0.0)	1 (6.7)	5 (33.3)
Sub. Total	6 (40.0)	8 (53.3)	1 (6.7)	15 (100.0)
<b>False negative</b>				
LP	0 (0.0)	1 (16.7)	1 (16.7)	2 (33.3)
RP	1 (16.7)	1 (16.7)	0 (0.0)	2 (33.3)
PA	1 (16.7)	0 (0.0)	1 (16.7)	2 (33.3)
Sub. Total	2 (33.3)	2 (33.3)	2 (33.3)	6 (100.0)
<b>True positive</b>				
LP	9 (25.0)	3 (8.3)	0 (0.0)	12 (33.3)
RP	5 (13.9)	4 (11.1)	3 (8.3)	12 (33.3)
PA	8 (22.2)	0 (0.0)	4 (11.1)	12 (33.3)
Sub. Total	22 (61.1)	7 (19.4)	7 (19.4)	36 (100.0)
Total	30 (52.6)	17 (29.8)	10 (17.5)	57 (100)

LP, left pelvic; RP, right pelvic; PA, paraaorta; MRI=histology, number of analyses equal in both evaluations; MRI > histology, number of analyses higher in MRI than histology; MRI < histology, number of analyses smaller in MRI than histology.

and paraaortic surgery, one (8.3%) had suspected paraaortic LN metastasis and had paraaortic surgery.

As aforementioned, five cases (11.1%) were considered false positive, two (4.4%) as false negative and 12 (26.7%) as true positive, totaling 19 patients. These 19 patients had three possible outcomes comparing both MRI and histological analyses: i) The number of LN metastases encountered by MRI were equal to that by histology; ii) MRI revealed more LN metastases compared with histology; and iii) MRI encountered less LN metastases compared with histology. Therefore, a total of 57 possible analytical combinations were found for these 19 patients. This combination was subsequently divided according to the three groups as listed above and to the associated lymphadenectomy chains (LP, RP and PA). Of the 57 possible combinations, there were 30 (52.6%) cases in which had MRI and histology revealed an equal number of metastatic LNs, 17 (29.8%) cases where MRI diagnosed a greater number of LN metastases and 10 (17.5%) cases in which MRI diagnosed a lower number of LN metastases compared with histology (Table II).

Among all lymphadenectomies (pelvic and/or para-aortic) performed, a total of 976 LNs were resected. Of these, 41 (4.2%) were confirmed to be positive by histological analysis for metastasis whilst 935 (95.8%) were considered negative by histology. Further analysis revealed that from the 41 positive LNs, three (7.3%) were encountered in the LP, 10 (24.4%) in the RP, 18 (43.9%) in the PA, four (9.8%) in both LP and RP and six (14.6%) in pelvic (LP and/or RP) and PA.

*MRI analyses.* In terms of exam quality, examination of all 45 patients (100%) resulted in a successful diagnosis. A total of 44 LNs were analyzed using MRI, of which 42 (95.5%) were suspected to be metastatic by MRI and two (4.5%) were considered to be negative for metastasis. Among the 44 cases, two (4.5%) were found in the LP, eight (18.2%) in the RP, two (4.5%) in the PA, 19 (43.2%) in both LP and RP, and 13 (29.5%) in pelvic (left and/or right) and PA.

The morphological characteristics of the 42 (95.5%) suspected LN metastases as determined by DWI in MRIs were then compared against their corresponding histology

Table III. Association between suspect lymph nodes in morphological and functional features revealed using MRI that were subsequently found to be positive for metastasis by histological analysis.

MRI finding	Metastasis-positive lymph nodes by histology N (%)
Short-axis >10 mm	38 (90.5)
T2 hypointensity	34 (81.0)
Rounded morphology	33 (78.6)
Greater restriction than one would expect	32 (76.2)
Heterogeneous appearance	29 (69.0)
Presence of necrosis	20 (47.6)
Irregular limits	17 (40.5)

data, which is considered to be the golden-standard. It was found that those with short axes >10 mm had a major impact in determining the probability of an LN being metastatic in subsequent histological analyses, as 90.5% of the metastatic LNs found using MRI that were >10 mm were subsequently found to be metastatic in histological analysis. LN metastases with T2 hypointensities had an association of 81.0%, rounded morphology had an association of 78.6%, greater restriction than one would expect for this tissue had an association of 76.2%, heterogenous appearance had an association of 69%, presence of necrosis had an association of 47.6% whilst LN metastases with irregular limits had an association of 40.5% (Table III). When investigating the smallest diameter of the short axis in suspected metastases in LNs using MRI, it was concluded that the median size of all suspected metastases in LNs was 16.8 mm (5-50 mm), with a standard deviation of 0.96.

A representative case of a true positive patient with a metastatic LN as diagnosed by MRI and histological analysis, both in the RP chain is shown in Fig. 2. Morphological and functional characteristics that were associated with metastatic status were short-axis diameter measuring 21 mm, presence of necrosis associated with liquid level, areas with greater restriction than would be expected for this tissue, presence of round morphology and heterogenous appearance and irregular limits. For comparative purposes, a representative case of a false positive exam was also shown (Fig. 3). This patient was tested positive for LN metastasis in the RP by MRI and but negative by histological analysis. The morphological and functional characteristics that were associated with this image are short-axis diameter measuring 14 mm, areas with greater restriction than one would expect, rounded morphology, homogenous appearance and regular limits.

## Discussion

In the present study the accuracy of MRI in diagnosing LN metastasis in patients with cervical cancer was compared against that of histological analysis, with emphasis on common morphological and functional (DWI) characteristics. By analyzing the combined morphological and functional

characteristics of LN metastases, it was found that a substantial concordance between the data obtained using pre-operative MRI and histology can be achieved with high sensitivity and specificity. In addition, it was found that short axis >10 mm, T2 hypointensity, rounded morphology and greater restriction than one would expect were the most common characteristics encountered in metastatic LNs, which can be used as a diagnostic tool. A technical pelvic exam, performed in all steps with proper technique by a trained specialist, can also be used to predict FIGO staging, since the majority of the patients included in the present study exhibited concordant results between those obtained by physical and MRI examinations, especially for the presence of pelvic and para-aortic LN metastasis. Additionally, MRI was able to correctly identify the number of suspected LN metastases, specifically in >50% of the possible candidates for lymphadenectomy. These results potentially underline the important role of MRI in diagnosing LN metastasis, especially in the presence of the features aforementioned.

When comparing the number of patients tested positively for suspected LN using MRI, the present study revealed a sensitivity of 85.7% and NPV of 92.9%, when other previous studies (3,15,16) yielded 92, 86 and 92.1% for sensitivity and 98.2, 84 and 100% for NPV, respectively. Previous studies (2,17) also compared the importance of MRI images using DWI for diagnosing metastatic LN, resulting in values of 83.3 and 95.7% being deduced for sensitivity and 74.7 and 96.5% for specificity, respectively. Although the total number of patients in the present study was considered low, concordance with the current literature exist in terms of outcomes, as 85.7% was found for sensitivity and 83.9% was found for specificity in the present study. A previous meta-analysis performed by Liu *et al* (18) compared 67 studies which investigated MRI performance in diagnosing suspected LN metastasis in cervical cancer. The average of sensitivity and specificity were found to be 54 and 93%, respectively. Chou *et al* (19) showed that the moderate false-negative and false-positive rates found for MRI is due to some patients being staged as IA2-IIA, which can explain some lower sensitivities observed (19,20). Therefore, it is essential do use the ADC maps to address this issue (21-24).

It is generally considered that MRI exhibits higher degrees of diagnostic accuracy in patients with advanced disease, since the associated LNs are larger in size and has clearer defined features such as necrosis (25). Therefore, patients with early stage metastatic disease may be underdiagnosed using this method (25). This aspect may be considered to be a limitation in the results from the present study, combined with the low resolution in the paraaortic sequences.

Lymph node metastasis is one of the most important features to be categorized in cervical cancer, which serves as an important prognostic factor for patients with this disease. Therefore, it is important to differentiate healthy LNs from suspected metastatic LNs. Generally, healthy LNs tend to be ovoid in shape, homogenous in appearance, with intermediate signals in T2-weighted sequences and high signals in DWI sequences (26). In the present study, it was found that the four most common morphological and functional characteristics associated with the higher risk of malignancy in pelvic and/or para-aortic LN metastasis as diagnosed by MRI are, in decreasing order, short axis >10 mm, T2 hypointensity,

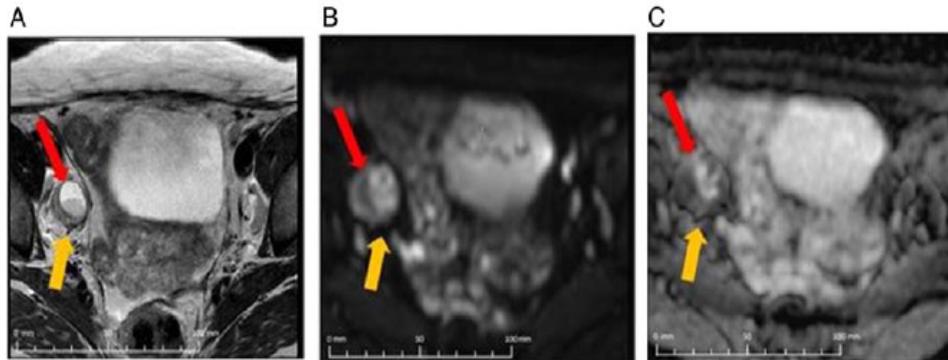


Figure 2. Representative images of a 39-year-old patient with squamous cell cervical cancer, at FIGO stage IA1 and grade II of differentiation. One histological lymph node metastasis was found in the right pelvic chain. MRI images with (A) T2-weighted imaging, (B) diffusion weighted imaging and (C) the apparent diffusion coefficient map are shown. The short-axis diameter was measured 21 mm. Red arrows indicate the location of the right pelvic LN with presence of necrosis associated with liquid level and areas with greater restriction than one would expect for this tissue. In addition, a round morphology and heterogenous appearance was noted. Yellow arrows indicate the location of irregular limits in the posterior edge.

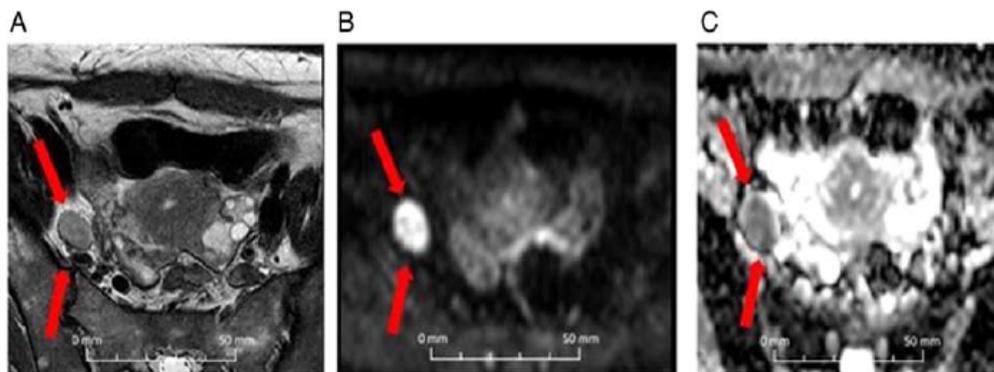


Figure 3. Representative images of a 39-year-old patient with squamous cell carcinoma, at FIGO stage IVA and grade III of differentiation. No lymph nodes metastases were found. MRI images with (A) T2-weighted imaging, (B) diffusion weighted imaging and (C) the apparent diffusion coefficient map are shown. The short-axis diameter measured 14 mm. Red arrows the location of the right pelvic LN with the short axis >10 mm, areas with greater restriction than one would expect for this tissue, a rounded morphology, homogenous appearance with regular limits.

rounded morphology followed by greater restriction than one would expect. It became clear that the combination of these features using MRI can predict suspected LN metastasis with high probability. These findings highlight the benefit of having a protocol to ensure the early and safe diagnosis of metastasis in lymph nodes.

Exner *et al* (4) hypothesized that the most important predictor for the probability of malignancy is the size of the LN. By contrast, Hawnaur *et al* (27) demonstrated a LN to be malignant when the short-axis was calculated to be >10 mm. However, other authors claimed that size alone is not a sufficiently adequate prognostic indicator whilst highlighting the necessity for including morphological data into the analysis, including limits, morphology and the presence of necrosis (11,12,28); all of which were included in the present study in addition to functional aspects (DWI). Indeed, diagnostic accuracy can be improved by combining morphological and functional data found using MRI, especially short axis >10 mm, T2 hypointensity, rounded morphology and greater restriction than one would expect. However, when patients are exposed to radiation and/or

chemotherapy, morphology and diffusion can alter the tumor tissue, increasing the difficulty in obtaining parameters of the tissue itself without any interference. Liyanage *et al* (29) previously confirmed that when the specificity and sensitivity for the standard criteria as aforementioned is low (29-86%), the difficulty in detecting micro-metastases in normal sized LNs increases.

The importance of using PET-CT for pre-operative examinations of potential LN metastases to detect anatomical and metabolic deviations from healthy LNs should also be recognized (30). Lin *et al* (31) evaluated the use of PET-CT in pre-operative assessments of patients with squamous cervical cancer associated with positive pelvic LN metastasis, which showed the sensitivity, specificity, PPV and NPV to be 44, 99, 95 and 78%, respectively. A meta-analysis performed by Yu *et al* (32) investigated sensitivity and specificity for patients with cervical cancer and positive for para-aortic LN, which were found to be 71 and 95%, respectively. The present study yielded the sensitivity, specificity, PPV and NPV for using MRI obtained for diagnosing pelvic and para-aortic LN metastasis to be similar to those obtained from PET-CT

analysis in previous studies: 85.7, 83.9, 70.6, 92.9 and 84.4%, respectively. Therefore, focusing on short axis >10 mm, T2 hypointensity, rounded morphology and greater restriction than one would expect using MRI can increase the accuracy of early diagnosis. Some of these aspects were mentioned in previous studies with PET-CT (30) and the present study demonstrated that these same aspects can also be applied in MRI examinations without compromising accuracy.

The strength of the present study was that the morphological features of the LN metastases obtained using MRI were evaluated in several categories, which were then analyzed in association with DWI and histopathological results. The limitation of the present study is the low sample number of patients. However, the patients included in this study required nodal commitment and were admitted to receive systematic lymphadenectomy. In addition, it should be recognized that MRI alone is insufficient for providing correct evaluations of metastasis in the paraaortic chain. Novel studies to confirm the results obtained from the present study is strongly encouraged. However, since the results performed in the present study were concordant with the current literature, it can serve as a template that can be replicated in a subsequent study involving larger cohorts of patients.

In conclusion, to the best of the authors' knowledge, the present study was the first to evaluate LN metastasis by using a number of morphological and functional categories. It was found that the most important features found in LN metastases using MRI are short axis >10 mm, T2 hypointensity, rounded morphology and greater restriction than one would expect. If these four categories are combined in MRI, the likelihood of the LN in question harboring a metastatic tumor by subsequent histological examination is high. This can potentially guide the decision-making process in the types of surgery or even types of therapeutic intervention required. If PET-CT is not available, the use of DWI to obtain morphological data in defining LN metastasis is recommended for pre-operative examinations.

#### Acknowledgements

Not applicable.

#### Funding

The present study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

#### Availability of data and materials

The datasets generated and/or analyzed during the current study are available in the [Figshare] repository (<https://figshare.com/s/878e54ea121d972aa408>).

#### Authors' contributions

TD reviewed and collected patient data from patient charts, participated in statistical analyses and was the main writer. RRR and MDS reviewed and analyzed the MRI images, and participated in paper construction and provided final approval of the version to be published. CEMDCA, RS and MAV

collected data from patients, participated in paper construction and final approval of the version to be published. MAL performed statistical analyses and participated in paper construction. DAPDA contributed to the discussion of results and participated in paper construction and final approval of the version to be published. RDR collected data from patients in consults in our hospital, reviewed and oriented all steps in the study, including reviewing the paper in all phases, participated in paper construction and designed the study. All authors read and approved the final version of this manuscript.

#### Ethics approval and consent to participate

Approval for the present study was obtained from The Ethical Committee of Barretos Cancer Hospital (approval no. 1150/2016; Barretos, Brazil). All patients consented to the use of their medical records in the current study.

#### Patient consent for publication

Not applicable.

#### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

#### References

1. American Cancer Society. Cancer Facts and Figures, 2018 2018 Available from: <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2018/cancer-facts-and-figures-2018.pdf>.
2. Liu Y, Liu H, Bai X, Ye Z, Sun H, Bai R and Wang D: Differentiation of metastatic from non-metastatic lymph-nodes in patients with uterine cervical cancer using diffusion-weighted imaging. *Gynecol Oncol* 122: 19-24, 2011.
3. Klerkx W, Veldhuis W, Spijkerboer A, van den Bosch MA, Mali WP, Heintz AP, Bipat S, Sie-Go DM, van der Velden J, Schreuder HW, *et al*: The value of 3.0Tesla diffusion-weighted MRI for pelvic nodal staging in patients with early stage cervical cancer. *Eur J Cancer* 48: 3414-3421, 2012.
4. Exner M, Kühn A, Stumpp P, Höckel M, Horn LC, Kahn T and Brandmaier P: Value diffusion-weighted MRI in diagnosis of uterine cervical cancer: A prospective study evaluating the benefits of DWI compared to conventional MR sequences in a 3T environment. *Acta Radiol* 57: 869-877, 2016.
5. Seber T, Çağlar E, Uğlar T, Karaman N, Aktas E and Arıbas BK: Diagnostic value of diffusion-weighted magnetic resonance imaging: Differentiation of benign and malignant lymph nodes in different regions of the body. *Clin Imaging* 39: 856-862, 2015.
6. Vandecaveye V, Dresen R and De Keyser F: Novel imaging techniques in gynecological cancer. *Curr Opin Oncol* 29: 335-342, 2017.
7. Nakai G, Matsuki M, Inada Y, Tatsugami F, Tanikake M, Narabayashi I and Yamada T: Detection and evaluation of pelvic lymph nodes in patients with gynecologic malignancies using body diffusion-weighted magnetic resonance imaging. *J Comput Assist Tomogr* 32: 764-768, 2008.
8. He XQ and Wei LN: Diagnostic value of lymph node metastasis by diffusion-weighted magnetic resonance imaging in cervical cancer. *J Cancer Res Ther* 12: 77-83, 2016.
9. Lin G, Ho KC, Wang JJ, Ng KK, Wai YY, Chen YT, Chang CJ, Ng SH, Lai CH and Yen TC: Detection of lymph node metastasis in cervical and uterine cancers by diffusion-weighted magnetic resonance imaging at 3T. *J Magn Reson Imaging* 28: 128-135, 2008.
10. Fenell J, Scholber J, Grosu AL, Volegova-Neher N, Henne K, Langer M, Meyer PT, Gitsch G and Bartl N: MRI and FDG-PET/CT imaging in gynecological malignancies: The radiation oncology perspective. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 60: 117-123.

11. Yang WT, Lam WW, Yu MY, Cheung TH and Metreweli C: Comparison of dynamic helical CT and dynamic MR imaging in the evaluation of pelvic lymph nodes in cervical carcinoma. *ARJ Am J Roentgenol* 175: 759-766, 2000.
12. Jung W, Park KR, Lee KJ, Kim K, Lee J, Jeong S, Kim YJ, Kim J, Yoon HJ, Kang BC, *et al.*: Value of imaging study in predicting pelvic lymph node metastasis of uterine cervical cancer. *Radiat Oncol J* 35: 340-348, 2017.
13. Bathala N, Berek J, Fredes M, Denny LA, Grenman S, Karunaratne K, Kehoe ST, Konishi I, Olawaiye AB, Prat J, *et al.*: Cancer of the corpus uteri. *Int J Gynecol Obstet*: 145: 129-135, 2019.
14. Harris PA, Taylor R, Thielke R, Payne J, Gonzalez N and Conde JG: Research electronic data capture (REDCap)-a meta-data-driven methodology and workflow process for providing translational research informatics support. *J Biomed Inform* 42: 377-381, 2009.
15. Shen G, Zhou H, Jia Z and Deng H: Diagnostic performance of diffusion-weighted MRI for detection of pelvic metastatic lymph nodes in patients with cervical cancer: A systematic review and meta-analysis. *Br J Radiol* 88: 20150063, 2015.
16. Lucas R, Dias J and Cunha TM: Added value of diffusion-weighted MRI in detection of cervical cancer recurrence: Comparison with morphological and dynamic contrast-enhanced MRI sequences. *Diagn Interv Radiol* 21: 368-375, 2015.
17. Chen YB, Liao J, Xie R, Chen GL and Chen G: Discrimination of metastatic from hyperplastic pelvic lymph nodes in patients with cervical cancer by diffusion-weighted magnetic resonance imaging. *Abdom Imaging* 36: 102-109, 2011.
18. Liu B, Gao S and Li S: A Comprehensive Comparison of CT, MRI, Positron Emission tomography or positron emission Tomography/CT, and diffusion weighted Imaging-MRI for detecting the lymph nodes metastases in patients with cervical cancer: A meta-analysis based on 67 studies. *Gynecol Obstet Invest* 82: 209-222, 2017.
19. Chou HH, Chang TC, Yen TC, Ng KK, Hsueh S, Ma SY, Chang CJ, Huang HJ, Chao A, Wu TI, *et al.*: Low value of [18F]-fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography in primary staging of early-stage cervical cancer before radical hysterectomy. *J Clin Oncol* 24: 123-128, 2006.
20. Driscoll DO, Halpenny D, Johnston C, Sheehy N and Keogan M: 18-F-FDG-PET-CT is of limited value in primary staging of early stage cervical cancer. *Abdom Imaging* 40: 127-133, 2015.
21. Schieda N, Malone SC, Al Dandan O, Ramchandani P and Siegelman ES: Multi-modality organ-based approach to expected imaging findings, complications and recurrent tumour in the genitourinary tract after radiotherapy. *Insights Imaging* 5: 25-40, 2014.
22. Vincens E, Balleyguier C, Rey A, Uzan C, Zareski E, Gouy S, Pautier P, Duvillard P, Haie-Meder C and Morice P: Accuracy of magnetic resonance imaging in predicting residual disease in patients treated for stage IB2/II cervical carcinoma with chemoradiation therapy: Correlation of radiologic findings with surgicopathologic results. *Cancer* 113: 2158-2165, 2008.
23. Levy A, Caramella C, Chargari C, Medjhouli A, Rey A, Zareski E, Boulet B, Bidault F, Dromain C and Balleyguier C: Accuracy of diffusion-weighted echo-planar MR imaging and ADC mapping in the evaluation of residual cervical carcinoma after radiation therapy. *Gynecol Oncol* 123: 110-115, 2011.
24. Harry VN, Semple SI, Gilbert FJ and Parkin DE: Diffusion-weighted magnetic resonance imaging in the early detection of response to chemoradiation in cervical cancer. *Gynecol Oncol* 111: 213-220, 2008.
25. Song J, Hu Q, Huang J, Ma Z and Chen T: Combining tumor size and diffusion-weighted imaging to diagnose normal-sized metastatic pelvic lymph nodes in cervical cancers. *Acta Radiol* 60: 388-395, 2019.
26. Bourgiot C, Chatoupis K and Mouloupoulos L: Current imaging strategies for the evaluation of uterine cervical cancer. *World J Radiol* 8: 342-354, 2016.
27. Hawnaur JM, Carrington BM, Hunter RD and Isherwood I: Treatment response in carcinoma of the uterine cervix: Evaluation by magnetic resonance imaging. In: *Tumor Response Monitoring and Treatment Planning*. Breit A, Heuck A, Lukas P, Kneschaurek P and Mayr M (eds). Springer, Heidelberg, 1992.
28. Choi HJ, Kim SH, Seo SS, Kang S, Lee S, Kim JY, Kim YH, Lee JS, Chung HH, Lee JH and Park SY: MRI for pretreatment lymph node staging in uterine cervical cancer. *Am J Roentgenol* 187: W538-W543, 2006.
29. Liyanage SH, Roberts CA and Rockall AG: MRI and PET scans for primary staging and detection of cervical cancer recurrence. *Womens Health (Lond)* 6: 251-269, 2010.
30. Li K, Sun H and Guo Q: Combinative evaluation of primary tumor and lymph nodes in predicting pelvic lymphatic metastasis in early-stage cervical cancer: A multiparametric PET-CT study. *Eur J Radiol* 113: 153-157, 2019.
31. Lin AJ, Wright JD, Dehdashti F, Siegel BA, Markovina S, Schwarz J, Thaker PH, Mutch DG, Powell MA and Grigsby PW: Impact of tumor histology on detection of pelvic and para-aortic nodal metastasis with <sup>18</sup>F-fluorodeoxyglucose-positron emission tomography in stage IB cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer* 29: 1351-1354, 2019.
32. Yu W, Kou C, Bai W, Yu X, Duan R, Zhu B, Li Y, Hua W, Ren X and Yang Y: The diagnostic performance of PET/CT scans for the detection of para-aortic metastatic lymph nodes in patients with cervical cancer: A meta-analysis. *PLoS One* 14: e0220080, 2019.

## Artigo 3 – Ovarian Sertoli-Leydig Cell Tumors: Epidemiological, Clinical and Prognostic Factors.

Published online: 2019-07-25

440 Original Article



# Ovarian Sertoli-Leydig Cell Tumors: Epidemiological, Clinical and Prognostic Factors

## *Tumores de células de Sertoli-Leydig ovarianos: fatores epidemiológicos, clínicos e prognósticos*

Beatriz Guerreiro Ruiz Castro<sup>1</sup>  Cristiano de Pádua Souza<sup>2</sup> Carlos Eduardo Mattos da Cunha Andrade<sup>3</sup>  
Marcelo de Andrade Vieira<sup>3</sup> Diocésio Alves Pinto de Andrade<sup>4</sup> Ricardo dos Reis<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Faculdade de Ciências da Saúde de Barretos Dr. Paulo Prata, Barretos, SP, Brazil

<sup>2</sup> Gynecologic Clinical Oncology Department, Hospital do Câncer de Barretos, Barretos, SP, Brazil

<sup>3</sup> Gynecologic Oncology Department, Hospital do Câncer de Barretos, Barretos, SP, Brazil

<sup>4</sup> InORP ONCOCLÍNICAS Group (Instituto Oncológico de Ribeirão Preto), Ribeirão Preto, SP, Brazil

Address for correspondence: Beatriz Guerreiro Ruiz Castro, Avenida Loja Maçônica Renovadora 68, 100, SP, 14785-002, Barretos, SP, Brazil (e-mail: biagrcastro@gmail.com).

Rev Bras Ginecol Obstet 2019;41:440–448.

### Abstract

**Objective** To describe a series of cases of ovarian Sertoli-Leydig cell tumors (SLCTs).

**Methods** Retrospective review of 12 cases of SLCT treated at the Hospital do Câncer de Barretos, Barretos, state of São Paulo, Brazil, between October 2009 and August 2017.

**Results** The median age of the patients was 31 years old (15–71 years old). A total of 9 patients (75.0%) presented symptoms: 8 (66.7%) presented with abdominal pain, 5 (41.7%) presented with abdominal enlargement, 2 (16.7%) presented with virilizing signs, 2 (16.7%) presented with abnormal uterine bleeding, 1 (8.3%) presented with dyspareunia, and 1 (8.3%) presented with weight loss. The median preoperative lactate dehydrogenase (LDH) was 504.5 U/L (138–569 U/L), alpha-fetoprotein (AFP) was 2.0 ng/ml (1.1–11.3 ng/ml), human chorionic gonadotropin ( $\beta$ -hCG) was 0.6 mIU/ml (0.0–2.3 mIU/ml), carcinoembryonic antigen (CEA) was 0.9 ng/ml (0.7–3.4 ng/ml), and cancer antigen 125 (CA-125) was 26.0 U/ml (19.1–147.0 U/ml). All of the tumors were unilateral and surgically treated. Lymphadenectomy was performed in 3 (25.0%) patients, but none of the three patients submitted to lymphadenectomy presented lymph node involvement. In the anatomopathological exam, 1 (8.3%) tumor was well-differentiated, 8 (66.7%) were moderately differentiated, and 3 (25.0%) were poorly differentiated. A total of 5 (55.6%) tumors were solid-cystic, 2 (22.2%) were purely cystic, 1 (11.1%) was cystic with vegetations, and 1 (11.1%) was purely solid, but for 3 patients this information was not available. The median lesion size was 14.2 cm (3.2–23.5 cm). All of the tumors were at stage IA of the 2014 classification of the International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO). A total of

### Keywords

- ▶ ovarian neoplasms
- ▶ Sertoli-Leydig cell tumor
- ▶ oncologic prognosis

 Beatriz Guerreiro Ruiz Castro's ORCID is <https://orcid.org/0000-0003-4965-0373>.

received  
February 5, 2019  
accepted  
May 28, 2019

DOI <https://doi.org/10.1055/s-0039-1693056>.  
ISSN 0100-7203.

Copyright © 2019 by Thieme Revinter  
Publicações Ltda, Rio de Janeiro, Brazil

License terms



2 (16.7%) patients received adjuvant treatment; 1 of them underwent 3 cycles of paclitaxel and carboplatin every 21 days, and the other underwent 4 cycles of ifosfamide, cisplatin and etoposide every 21 days. None of all of the patients had recurrence, and one death related to complications after surgical staging occurred.

**Conclusion** Abdominal pain was the most frequent presentation. There was no ultrasonographic pattern. All of the SLCTs were at stage IA, and most of them were moderately differentiated. Relapses did not occur, but one death related to the surgical staging occurred.

## Resumo

**Objetivo** Descrever uma série de casos de tumores de células de Sertoli-Leydig (TCSLs) ovarianos.

**Métodos** Revisão retrospectiva de 12 casos de TCSL tratados no Hospital de Câncer de Barretos entre outubro de 2009 e agosto de 2017.

**Resultados** A mediana de idade foi 31 anos (15–71 anos). Um total de 9 pacientes (75,0%) apresentaram sintomas: 8 (66,7%) apresentaram dor abdominal, 5 (41,7%) apresentaram aumento abdominal, 2 (16,7%) apresentaram virilização, 2 (16,7%) apresentaram sangramento uterino anormal, 1 (8,3%) apresentou dispareunia, e 1 (8,3%) apresentou emagrecimento. A mediana de desidrogenase láctica (DHL) foi 504,5 U/L (138–569 U/L), alfafetoproteína (AFP) foi 2,0 ng/ml (1,1–11,3 ng/ml), gonadotrofina coriônica humana ( $\beta$ -hCG) foi 0,6 mUI/ml (0,0–2,3 mUI/ml), antígeno carcinoembrionário (CEA) foi 0,9 ng/ml (0,7–3,4) ng/ml, e antígeno cancerígeno 125 (CA-125) foi 26,0 U/ml (19,1–147,0 U/ml), todos pré-operatórios. Todos os tumores foram unilaterais e tratados cirurgicamente. Realizou-se linfadenectomia em 3 (25,0%) pacientes, porém, nenhuma das três apresentou acometimento linfonodal. No exame anatomopatológico, 1 tumor (8,3%) era bem diferenciado, 8 (66,7%) eram moderadamente diferenciados, e 3 (25,0%) eram pouco diferenciados. Um total de 5 (55,6%) tumores eram sólido-císticos, 2 (22,2%) eram puramente císticos, 1 (11,1%) era cístico com vegetações, e 1 (11,1%) era puramente sólido, mas para 3 pacientes estas informações não estavam disponíveis. A mediana da dimensão da lesão foi 14,2 cm (3,2–23,5 cm). Todos os tumores eram estágio IA de acordo com a classificação de 2014 da Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO, na sigla em inglês). Duas (16,7%) pacientes receberam adjuvância; uma realizou 3 ciclos de paclitaxel e carboplatina a cada 21 dias, e a outra 4 ciclos de ifosfamida, cisplatina e etoposide a cada 21 dias. Dentre todas as pacientes, nenhuma apresentou recidiva e houve um óbito relacionado a complicações após estadiamento cirúrgico.

**Conclusão** Dor abdominal foi a apresentação mais frequente. Todos os TCSLs eram estágio IA e a maioria era moderadamente diferenciada. Não ocorreram recidivas, mas ocorreu um óbito relacionado ao estadiamento cirúrgico.

## Palavras-chave

- ▶ neoplasias ovarianas
- ▶ tumor de células de Sertoli-Leydig
- ▶ prognóstico oncológico

## Introduction

Ovarian Sertoli-Leydig cell tumors (SLCTs) are part of the sexual cord neoplasms and represent < 0.5% of all ovarian tumors.<sup>1</sup> This type of tumor predominates in the 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> decades of life and usually presents with hormonal changes, including signs of virilization, such as amenorrhea, hirsutism, acne, and male pattern of pilification.<sup>2–8</sup> These characteristics are due to an increase in androgen production by tumor cells. In rare cases, signs of hyperestrogenism may also occur, such as postmenopausal bleeding and endometrial hyperplasia.<sup>8,9</sup> This increase in estrogen levels may be due to secretion of the

hormone by tumor cells or to the peripheral conversion of testosterone produced by the tumor to estrogen through the action of aromatase. In patients without hormonal manifestations, the typical presentation of the disease consists of abdominal pain and increased abdominal circumference, usually with a palpable adnexal mass at physical examination.<sup>10</sup> Some authors suggest that the preoperative diagnosis in patients without association of signs of virilization and palpable abdominal mass would be practically impossible.<sup>2</sup>

Microscopically, SLCTs can be divided into well-, moderately, and poorly differentiated, with or without heterologous

elements and/or retiform pattern.<sup>3,11</sup> Along with staging, the degree of histological differentiation represents some of the prognostic factors described in the literature.<sup>12</sup> The malignant potential in well-differentiated tumors is practically null and increases substantially in those with lower degrees of differentiation.<sup>3,13</sup> Bhat et al<sup>6</sup> reported a relationship between staging and degree of histological differentiation. In the present study, 85.7% and 75.0%, respectively, of the well- and moderately differentiated tumors corresponded to stage IA, whereas, of the poorly differentiated, > 50.0% of the cases were stage IC or more advanced.<sup>6</sup>

Most of the ovarian SLCTs are unilateral, and their treatment is preferably surgical.<sup>3,8,14,15</sup> Unilateral salpingo-oophorectomy is the procedure of choice for patients that want to preserve their fertility.<sup>5,7,8,11</sup> For patients without fertility preservation, as well as in advanced stages, total hysterectomy and bilateral salpingo-oophorectomy (BSO) or cytoreductive surgery should be recommended.<sup>4,7</sup> As lymph node metastases are rare in ovarian SLCTs, lymphadenectomy can be omitted as part of the surgical staging in these patients.<sup>16,17</sup> In addition, relapse is uncommon in SLCTs, and adjuvant chemotherapy should be reserved for patients with risk factors such as moderately or poorly differentiated tumors, patients with advanced stages, or in recurrence.<sup>4,14</sup>

The low incidence of this type of ovarian neoplasia explains the paucity of data about the clinical behavior of SLCTs and their oncology outcomes. Thus, the purpose of the present study is to describe a series of ovarian SLCT cases managed in a tertiary cancer center.

## Methods

### Research Design

After approval from the institutional review board of the Pio XII Foundation – Hospital do Câncer de Barretos (HCB) number 1511/2017, an observational retrospective study was conducted based on the analysis of a convenience sample of all of the patients diagnosed with ovarian SLCTs treated at the Department of Gynecology Oncology of the HCB between October 2009 and August 2017.

### Population

All of the patients with a diagnosis of ovarian SLCT treated at the Department of Gynecology Oncology of the HCB between October 2009 and August 2017 were included. There were no exclusion criteria, because we included a series of cases within the time frame.

### Research Variables

In the present study, we evaluated epidemiological, clinical, and prognostic data related to ovarian SLCTs. The data were collected through the review of the medical records of patients with ovarian SLCTs, including age, date of birth, signs and symptoms, comorbidities, hormonal profile, serum tumor markers, imaging examination, type of surgery performed, degree of histological differentiation, staging, adjuvant treatment, length of follow-up, and occurrence of relapses or deaths. Tumor staging was based on the Interna-

tional Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) classification of 2014.<sup>18</sup> The length of follow-up was calculated from the date of the first surgery until the date of the last medical record information.

### Statistical Analysis

Descriptive statistics were used to characterize the sample. Initially, quantitative variables were described by mean and standard deviation (SD) or median and 25–75 percentiles according to their distribution. Then, qualitative variables were described using absolute and relative frequencies. To collect data, Research Electronic Data Capture (REDCap; Vanderbilt University, Nashville, TN, USA) was used, and IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) was used for the analyses.<sup>19</sup>

## Results

### Sample Characterization and Clinical Features

A total of 12 ovarian SLCT patients were treated or referred to the HCB between October 2009 and August 2017. The median age was 31 (15–71) years old at diagnosis, while the median body mass index (BMI) was 26.7 (14.9–35.9) kg/m<sup>2</sup>. A total of 3 (25.0%) patients were asymptomatic; however, 8 (66.7%) patients reported abdominal pain, 5 (41.7%) presented with abdominal distention, 2 (16.7%) presented with signs of virilization, 2 (16.7%) presented with abnormal uterine bleeding during the menacme, 1 (8.3%) presented with dyspareunia, and 1 (8.3%) presented with weight loss. It is important to note that some patients presented > 1 symptom at admission to the HCB, as detailed in ►Table 1. The only sign of virilization reported in the present sample was hirsutism, with no cases of clitoromegaly, of voice alteration, or of weight gain. Amenorrhea occurred in 3 (25.0%) patients; however, this classification did not apply to 4 patients, because at the time of diagnosis 2 of them were pregnant, and 2 were already at menopause. Thus, regarding the hormonal profile, 10 (83.3%) patients were in the menacme, and 2 (16.7%) in the menopause. A total of 4 (33.3%) patients used hormonal contraceptives, and 1 (8.3%) had hormone replacement therapy. One (8.3%) patient was a smoker; however, there were no alcoholics in the sample. Two (16.7%) patients had a family history of gynecological cancer. Seven (58.3%) patients had physical exam abnormalities, which were: 5 (41.7%) with palpable abdominal mass, 1 (8.3%) with hirsutism, and 1 (8.3%) with acne.

### Preoperative Tumor Markers

Preoperative tumor markers were measured in 6 patients (►Table 2). The median dose of lactate dehydrogenase (LDH) was 504.5 U/L (138.0–569.0 U/L), alpha-fetoprotein (AFP) was 2.0 ng/ml (1.2–11.4 ng/ml), human chorionic gonadotropin ( $\beta$ -hCG) was 0.6 mUI/ml (0.0–2.4 mUI/ml), carcinoembryonic antigen (CEA) was 0.9 ng/ml (0.8–3.4 ng/ml), cancer antigen 125 (CA-125) was 26.0 U/ml (19.1–147.0 U/ml), total testosterone was 3.5 ng/ml (3.5–3.5 ng/ml) and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) was 224.0  $\mu$ g/dl (224.0–224.0  $\mu$ g/dl).

**Table 1** Clinical features of 12 patients diagnosed with ovarian Sertoli-Leydig cell tumors

N°	Age (years old)	Complaints at admission				Physical examination							
		Asymptomatic	Abdominal pain	Virilization	AUB	Abdominal distension	Dyspareunia	Amenorrhea	Weight loss	Normal	Palpable abdominal mass	Hirsutism	Acne
1	24	N	Y	N	Y	N	N	N	N	N	Y	N	N
2	17	N	Y	N	N	Y	N	Y	Y	Y	Y	N	N
3	28	N	Y	N	N	N	Y	Y	N	Y	Y	N	N
4	63	N	N	Y	N	N	N	N/A	N	Y	N	N	N
5	16	Y	N	N	N	N	N	N/A	N	Y	N	N	N
6	33	N	Y	N	N	N	N	N/A	N	Y	N	N	N
7	15	N	Y	N	N	Y	N	N	N	N	Y	N	N
8	15	N	Y	Y	N	Y	N	Y	N	Y	Y	Y	Y
9	71	Y	N	N	N	N	N	N/A	N	N	Y	N	N
10	44	N	Y	N	N	Y	N	N	N	Y	Y	N	N
11	34	N	Y	N	Y	Y	N	N	N	Y	Y	N	N
12	40	Y	N	N	N	N	N	N/A	N	Y	N	N	N

Abbreviations: AUB, abnormal uterine bleeding; N, No; N/A, Not applicable; Y, Yes.

**Table 2** Preoperative exams of 12 patients diagnosed with ovarian Sertoli-Leydig cell tumors

N°	Preoperative serum tumor markers							Preoperative imaging examination				
	LDH (U/L)	AFP (ng/ml)	β-hCG (mIU/ml)	CEA (ng/ml)	CA-125 (U/ml)	Total testosterone (ng/ml)	DHEAS (µg/dl)	Lesion size (cm)	Laterality	Morphology	Suspicious lymph nodes	
1	138.00	1.16	0.00	0.77	-	-	-	6.50	Left	Solid	No	
2	-	-	0.00	1.00	42.00	-	-	-	-	-	-	
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
6	-	-	-	-	-	-	-	11.70	Right	Solid-cystic	No	
7	-	-	-	-	-	-	-	-	Left	-	-	
8	465.00	11.38	0.00	0.79	26.01	3.55	224.00	20.00	Left	Solid-cystic	No	
9	569.00	6.02	1.27	3.45	24.50	-	-	4.00	Right	Solid	No	
10	-	2.05	2.39	2.15	19.10	-	-	13.00	Right	Cystic	No	
11	544.00	1.61	2.39	0.93	147.00	-	-	24.00	Left	Cystic	No	
12	-	-	-	-	-	-	-	23.10	Left	Cystic	-	

Abbreviations: AFP, alpha-fetoprotein; β-hCG, human chorionic gonadotropin; CA-125, cancer antigen 125; CEA, carcinoembryonic antigen; DHEAS, dehydroepiandrosterone sulfate; LDH, lactate dehydrogenase.

### Preoperative Image Exams

Abdominal evaluation data were obtained from 8 patients (►Table 2). This evaluation was performed by magnetic resonance imaging (MRI), computed tomography (CT) of the abdomen, transabdominal ultrasound and/or transvaginal ultrasound. In all of the patients with reviewed preoperative examinations, the lesions were unilateral, 3 (37.5%) to the right side, and 5 (62.5%) to the left side. Lesion morphology was described in 7 patients, and 3 (42.8%) had cystic lesions, 2 (28.6%) had solid lesions, and 2 (28.6%) had solid-cystic lesions. The median lesion size was 13 cm (4–24 cm). There were no cases of suspicious lymph nodes.

### Treatment

The initial treatment consisted of surgery for all patients. A total of 5 (41.7%) patients underwent primary surgery at the HCB, 5 (41.7%) patients were managed at another hospital and then were referred for follow-up at the HCB, and 2 (16.6%) patients were managed at another service and subsequently underwent surgical staging at the HCB. The time elapsed between the surgery in another service and the surgical staging at the HCB of these 2 patients was of 155 and 328 days. The surgical approach was laparotomic in 7 (70.0%) cases, and laparoscopic in 3 (30.0%) cases, with no conversions. It is important to mention that in 2 patients managed by surgery in another hospital, the surgical approach was not described in their medical records. Unilateral oopho-

rectomy, unilateral salpingectomy, unilateral salpingo-oophorectomy, BSO, and total hysterectomy (TH) were some of the surgical procedures performed, which are described individually in ►Table 3. In addition, eventually, other surgical procedures were performed to complement staging, such as: omentectomy in 4 (33.3%) patients, pelvic or para-aortic lymphadenectomy in 3 (25.0%) patients, peritoneal biopsy in 2 (16.6%) patients and peritoneal washing in 6 (50.0%) patients. Two (16.6%) patients had intraoperative complications, which were hepatic cyst bleeding, controlled with electrocautery, and removal of the epiploic appendix with arterial bleeding. It is important to highlight that 2 (16.6%) patients were pregnant at the time of diagnosis. One of them was submitted to a right salpingo-oophorectomy during a cesarean section in another hospital, and then underwent surgical staging at the HCB. The other patient was submitted to excision of a left ovarian cyst during a cesarean section and then underwent surgical staging. Both surgeries were performed in another hospital. All of the surgical procedures performed are described in ►Table 3.

### Histopathological Features

All of the tumors were confined to one ovary and were at stage IA (►Table 3). Macroscopic analysis was available for 9 patients, of whom 5 (55.6%) had solid-cystic components, 2 (22.2%) had only cystic components, 1 (11.1%) had cystic components with vegetation, and 1 (11.1%) had only solid components. The median tumor size was 14.2 cm (3.2–23.5 cm), with 2 cases

**Table 3** Histopathological and treatment features of 12 patients diagnosed with ovarian Sertoli-Leydig cell tumors

N*	Surgery			Histopathology				
	Locality	Surgical approach	Surgery performed	Degree of differentiation	Tumor dimension (mm)	Characteristics	Mitotic rate (/10HPF)	Staging
1	HCB	-	Left oophorectomy, peritoneal washing	G2	5.50	-	18	IA
2	Other	Laparotomy	RSO, omentectomy	G2	-	Cystic with vegetations	-	IA
3	Other	Laparotomy	LSO	G2	-	-	-	IA
4	Other	Laparotomy	LSO	G2	4.00	Solid-cystic	-	IA
5	Other	Laparotomy	Right oophorectomy	G3	14.20	Solid-cystic	15	IA
6	Other/HCB	Laparoscopy	TH, BSO, omentectomy, peritoneal washing	G2	15.60	Solid-cystic	6	IA
7	Other/HCB	Laparotomy	LSO, para-aortic lymphadenectomy, peritoneal biopsy, peritoneal washing	G2	17.00	Solid-cystic	-	IA
8	HCB	Laparotomy	LSO, omentectomy, pelvic lymphadenectomy, peritoneal biopsy, peritoneal washing	G3	16.50	Solid-cystic	30	IA
9	HCB	Laparoscopy	BSO, peritoneal washing	G2	3.20	Solid	-	IA
10	HCB	Laparoscopy	RSO, left salpingectomy	G3	10.20	Cystic	-	IA
11	HCB	Laparotomy	LSO, cholecystectomy	G2	23.50	Cystic	-	IA
12	Other	-	TH, BSO, omentectomy, lymphadenectomy, appendectomy	G1	-	-	-	IA

Abbreviations: BSO, bilateral salpingo-oophorectomy; G1, well-differentiated; G2, moderately differentiated; G3, poorly differentiated; HCB, Hospital do Câncer de Barretos; HPF, high-power fields; LSO, left salpingo-oophorectomy; RSO, right salpingo-oophorectomy; TH, total hysterectomy.

presenting < 5 cm, 6 cases > 10 cm, and only 1 case between 5 and 10 cm. One (8.3%) tumor was well-differentiated, 8 (66.7%) were moderately differentiated, and 3 (25.0%) were poorly differentiated. One case presented heterologous elements, such as atypical proliferative mucinous tumor (borderline), but no case in the present series showed a retiform pattern. The mitotic rate was measured in 4 patients, being 6/10 high-power fields (HPF), 15/10 HPF, 18/10 HPF, and 30/10 HPF. In the present sample, there were no cases of lymph node or of omental involvement, neither of peritoneal carcinomatosis. In addition, abdominal cytology was negative in 100% of the cases.

#### Adjuvant Treatment and Follow-Up

Two (16.7%) patients received adjuvant treatment. One of them had a poorly differentiated tumor and underwent 3 cycles of paclitaxel and carboplatin every 21 days, and the other was strongly symptomatic at admission to the HCB and received 4 cycles of ifosfamide, cisplatin and etoposide every 21 days. Information about follow-up was available for all 12 patients in this series (→Table 4). The length of follow-up varied between 1.6 and 65.0 months, with a median of 19.5 months. There were no cases of tumor recurrence. A total of 10 (83.4%) patients were alive and with no evidence of disease, and 1 (8.3%) was alive and was receiving adjuvant treatment. One (8.3%) patient presented mesenteric torsion 2 months after the surgical staging and underwent an exploratory laparotomy with segmental enterectomy and laterolateral anastomosis at the HCB. On the 3<sup>rd</sup> postoperative day, this patient died after developing a septic and hemorrhagic shock. Thus, this death was considered related to the surgical staging, because there was no evidence of disease in the final pathology report.

#### Discussion

In the present study, the median age at the time of diagnosis ranged from 15 to 71 years old, and abdominal pain was the

most prevalent symptom in the present sample. A palpable abdominal mass was the predominant clinical sign in the physical exam. All of the tumors were at stage IA and were surgically treated. Regarding the histopathological features, most of the tumors were solid-cystic and moderately differentiated. Two patients received adjuvant chemotherapy; however, there were no cases of tumor recurrence, and one death related to surgical staging occurred.

Xiao et al.<sup>8</sup> divided the clinical manifestations found in their series of ovarian SLCTs into three categories: feminization, defeminization, and virilization. Manifestations of feminization included irregular vaginal bleeding, menorrhagia, or postmenopausal bleeding. Amenorrhea corresponded to a manifestation of defeminization, whereas facial pilification and clitoromegaly would be manifestations of virilization.<sup>8</sup> In our study, the patients fit into all three categories described by this author: we had cases of feminization, exemplified by two patients with abnormal uterine bleeding; amenorrhea occurred in three patients, representing the manifestations of defeminization; hirsutism was the sign of virilization evidenced in the physical examination of one patient.

The age group most affected by this type of tumor corresponds to the 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> decades of life, predominantly, as evidenced in our study, whose median age at diagnosis was 31 years old.<sup>4,6,11,20</sup> In addition, the signs and symptoms are diverse and, associated with the low incidence of this type of neoplasia, the clinical diagnosis is also difficult. In our study, half of the patients had no hormonal manifestations, and the disease presented asymptomatic or only with abdominal pain, palpable mass or abdominal distension; in second place, androgenic manifestations appeared, such as amenorrhea, oligomenorrhea, hirsutism, voice alterations, laryngeal protuberance or clitoromegaly, and a minority of patients had estrogenic manifestations, such as abnormal uterine bleeding. Thus, when these manifestations appear in the clinical practice, ovarian SLCTs should be considered at least as a differential diagnosis, so that these tumors are not neglected and that the correct treatment can be implemented (→Table 5).

**Table 4** Follow-up of 12 patients diagnosed with ovarian Sertoli-Leydig cell tumors

N°	Adjuvant treatment	Recurrence	Length of follow-up (months)	Status
1	No	No	1.60	Alive, no evidence of disease
2	No	No	13.50	Alive, no evidence of disease
3	No	No	10.10	Alive, no evidence of disease
4	No	No	28.00	Alive, no evidence of disease
5	No	No	65.00	Alive, no evidence of disease
6	No	No	36.60	Alive, no evidence of disease
7	Ifosfamide + cisplatin + etoposide	No	12.50	Death related to surgical staging
8	No	No	31.50	Alive, no evidence of disease
9	No	No	31.70	Alive, no evidence of disease
10	Paclitaxel + carboplatin	No	3.40	Alive, but in treatment
11	No	No	12.30	Alive, no evidence of disease
12	No	No	25.60	Alive, no evidence of disease

**Table 5** Review of published studies about ovarian Sertoli-Leydig cell tumors

Study	Median age (years old)	No hormonal manifestations (%) <sup>a</sup>	Androgenic manifestations (%) <sup>b</sup>	Estrogenic manifestations (%) <sup>c</sup>	Sample size
Roth et al <sup>2</sup>	24.5	15 (44.12)	15 (44.12)	4 (11.76)	34
Gui et al <sup>4</sup>	28	9 (22.50)	25 (62.50)	6 (15.00)	40
Nam et al <sup>15</sup>	31	7 (63.63)	3 (27.27)	1 (9.10)	11
Zhang et al <sup>21</sup>	-	3 (18.75)	7 (43.75)	6 (37.50)	16
Present case series	31	6 (50.00)	4 (33.30)	2 (16.70)	12

<sup>a</sup>asymptomatic or only abdominal pain, palpable mass or abdominal distension.

<sup>b</sup>amenorrhea, oligomenorrhea, hirsutism, voice alterations, laryngeal protuberance, ditoromegaly.

<sup>c</sup>abnormal uterine bleeding.

Alpha-fetoprotein consists of a glycoprotein detected at low levels in the blood of healthy adults. The liver and the yolk sac are its main sources. When present at serum levels above the standard value, it may be evidence of hepatocarcinoma or of germ cell tumors, such as the ovary and the testis. This glycoprotein is already a well-established tumor marker, being very useful in the diagnosis and in the follow-up of oncologic patients.<sup>22</sup> In a study developed by Schneider et al,<sup>13</sup> a high proportion of AFP-secreting ovarian SLCTs was observed. Sigismondi et al<sup>14</sup> measured serum AFP values in 13 patients, and the tumor marker was elevated in 3 of them. In our study, the AFP dosage was available for five patients, and was elevated in one of them. These data suggest that ovarian SLCTs should be included in the clinical investigation of physicians as a differential diagnosis of AFP-secreting tumors, since when diagnosed in more advanced stages they are difficult to treat.

The treatment of ovarian SLCTs still remains controversial due to the paucity of cases described and to the limitation of the knowledge about the clinical behavior, the management, and the prognosis of this disease. Colombo et al<sup>23</sup> suggested surgery as the standard primary treatment for this type of ovarian tumor. Because most SLCTs are unilateral and restricted to the ovary, fertility-preserving surgery with unilateral salpingo-oophorectomy and staging in patients who want to keep their fertility potential with no extraovarian disease are possible. The author also emphasizes the importance of endometrial evaluation to exclude concomitant endometrial neoplasia.

Colombo et al<sup>23</sup> also suggested that for women in the postmenopausal period, with a more advanced stage of disease or with a bilateral tumor, hysterectomy and BSO should be performed, as well as a meticulous surgical staging. Besides that, exploration of the abdominal cavity, collection of fluid for cytological analysis, multiple peritoneal biopsies, omentectomy and dissection of pelvic and para-aortic lymph nodes need to be performed. Efforts should be expended for complete tumor cytoreduction. However, the role of surgical staging is controversial, considering the benefits of detailed surgical staging and the morbidity associated with high complexity procedures. Brown et al<sup>16</sup> demonstrated that lymphadenectomy may be omitted from the surgical staging of patients with ovarian sex cord-stromal tumors, because lymph node metastases are rare and do not

justify the potential surgical risk. In our sample, one patient underwent staging surgery with left salpingo-oophorectomy, para-aortic lymphadenectomy, peritoneal biopsy and peritoneal washing and developed mesenteric torsion 2 months later. This patient required further surgery with segmental enterectomy and died on the 3<sup>rd</sup> postoperative day due to a septic and hemorrhagic shock. Thus, the type of surgical staging has to be discussed and individualized in order to reduce the morbidity and mortality associated with extensive surgical procedures.

Regarding adjuvant treatment, Colombo et al<sup>23</sup> concluded that chemotherapy should be considered for poorly differentiated ovarian SLCTs, with heterologous elements or in advanced stages. In our study, adjuvant treatment was performed in two patients, in whom the tumors were poorly and moderately differentiated; however, none of them had heterologous elements in histopathology. Also, in the study by Schneider et al,<sup>13</sup> out of 24 tumors at stage IA, including well-, moderately, and poorly differentiated, only 1 received adjuvant treatment, and none had recurrence. In our study, in our three patients with poorly differentiated tumors, only one received adjuvant treatment; however, all of them were at stage IA, and there was no tumor recurrence.

However, for the correct indication of adjuvant treatment, it is necessary to understand the prognostic factors of this disease. The low incidence of ovarian SLCTs makes it difficult to perform randomized studies evaluating the role of adjuvant treatment in more advanced tumors, as well as in patients at stage I with poor prognostic factors. In addition, the rarity of this type of tumor hinders the complete understanding of its prognostic factors.

Young et al<sup>3</sup> discussed some prognostic factors for ovarian SLCTs. The findings of the authors show that the mitotic rate can predict a poor prognosis when > 15/10 HPF. In the present series, 3 patients had a mitotic rate  $\geq$  15/10 HPF; however, there was no evidence of recurrence throughout the whole length of the follow-up, whose median was of 19.5 months. It is also worth noting that in ovarian SLCTs, recurrences usually appear early, with 70% of the cases occurring in the 1<sup>st</sup> year after treatment, and only 7% after 5 years.<sup>1</sup>

The degree of histological differentiation was also reported as a prognostic factor in ovarian SLCTs.<sup>2,3</sup> In a group

of 207 cases, Young et al<sup>3</sup> showed that the malignancy potential was 0%, 11%, and 59% for well-, moderately, and poorly differentiated tumors, respectively, and 19% for those with heterologous elements. Stage was another prognostic factor reported in the literature. In the MITO study, 70% of the patients with advanced stage had a disease-related death, whereas the 5-year survival rate was 92.3% for those at stage I.<sup>14</sup> As mentioned previously, in the study by Roth et al,<sup>2</sup> age and degree of histological differentiation were statistically significant as risk factors.

Our study is limited by the small sample number, considering the low incidence of this type of tumor, as well as by the retrospective characteristic, which implies a possible bias of data collection, since some information may not be contained in the medical records of the patients. However, our results are derived from a single institution, which is a reference in cancer treatment in Brazil and, thus, has standard procedures and routines in the management of the patients.

## Conclusion

In our series of 12 cases of ovarian SLCs, abdominal pain was the most common clinical presentation and, in the physical examination, the presence of a palpable abdominal mass was the most frequent finding. All of the tumors were unilateral and there was no ultrasonographic pattern. Surgery was the treatment of choice for all patients, all of the cases were stage IA at the time of diagnosis, and most of the tumors were moderately differentiated. Two patients received adjuvant treatment and there were no recurrences. There was only one death, which was related to the surgical staging and not directly related to the ovarian neoplasia, since there was no evidence of residual disease in the final pathology. It is important to emphasize that new researches need to be developed to try to better understand the diagnosis, the staging and the prognosis of this rare disease and, thus, to try to better define therapeutic strategies.

### Contributions

All of the authors contributed to the development of the present research, helped in the conception, the design, the data interpretation, and also in the critical review of the manuscript.

### Conflicts of Interests

The authors have no conflicts of interests to declare.

### Acknowledgements

The authors acknowledge the scientific support of the Nucleus of Epidemiology and Biostatistics (NEB) of the HCB in the development of the present research.

## References

- Lantzsch T, Stoerer S, Lawrenz K, Buchmann J, Strauss HG, Koelbl H. Sertoli-Leydig cell tumor. *Arch Gynecol Obstet* 2001;264(04):206-208. Doi: 10.1007/s004040000114
- Roth LM, Anderson MC, Govan AD, Langley FA, Gowing NF, Woodcock AS. Sertoli-Leydig cell tumors: a clinicopathologic study of 34 cases. *Cancer* 1981;48(01):187-197. Doi: 10.1002/1097-0142(19810701)48:1<187::AID-CNCR2820480130>3.0.CO;2-1
- Young RH, Scully RE. Ovarian Sertoli-Leydig cell tumors. A clinicopathological analysis of 207 cases. *Am J Surg Pathol* 1985;9(08):543-569. Doi: 10.1097/0000478-198508000-00001
- Gui T, Cao D, Shen K, et al. A clinicopathological analysis of 40 cases of ovarian Sertoli-Leydig cell tumors. *Gynecol Oncol* 2012;127(02):384-389. Doi: 10.1016/j.ygyno.2012.07.114
- Akman L, Ertas IE, Gokcu M, et al. Ovarian sertoli-leydig cell tumors: A multicenter long-term clinicopathological analysis of 27 patients. *J Cancer Res Ther* 2016;12(01):290-294. Doi: 10.4103/0973-1482.158037
- Bhat RA, Lim YK, Chia YN, Yam KL. Sertoli-Leydig cell tumor of the ovary: analysis of a single institution database. *J Obstet Gynaecol Res* 2013;39(01):305-310. Doi: 10.1111/j.1447-0756.2012.01928.x
- Appetecchia M, Cela V, Bernardi F, Burelli A, Cionini R, Pucci E. Sertoli-Leydig cell androgens-estrogens secreting tumor of the ovary: ultra-conservative surgery. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004;116(01):113-116. Doi: 10.1016/j.ejogrb.2004.01.043
- Xiao H, Li B, Zuo J, et al. Ovarian Sertoli-Leydig cell tumor: a report of seven cases and a review of the literature. *Gynecol Endocrinol* 2013;29(03):192-195. Doi: 10.3109/09513590.2012.738723
- Guo L, Yang X, Zhu H, et al. Sertoli-Leydig cell tumor presenting hyperestrogenism in a postmenopausal woman: a case report and review of the literature. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2012;51(04):620-624. Doi: 10.1016/j.tjog.2012.09.019
- Tsuzuki Y, Kikuchi I, Nojima M, Yoshida K, Hashizume A, Tomita S. A case report: ovarian Sertoli-Leydig cell tumor with hyperestrogenism and endometrial hyperplasia in a postmenopausal woman. *Jpn Clin Med* 2017;8:1179066017695239. Doi: 10.1177/1179066017695239
- Sahoo TK, Kar T, Kar A, Panda S. Poorly differentiated Sertoli-Leydig cell tumour of ovary with heterologous elements. *J Clin Diagn Res* 2017;11(05):XD01-XD02. Doi: 10.7860/JCDR/2017/25262.9860
- Young RH. Sex cord-stromal tumors of the ovary and testis: their similarities and differences with consideration of selected problems. *Mod Pathol* 2005;18(Suppl 2):S81-S98
- Schneider DT, Orbach D, Cecchetto G, et al. Ovarian Sertoli Leydig cell tumours in children and adolescents: an analysis of the European Cooperative Study Group on Pediatric Rare Tumors (EXPeRT). *Eur J Cancer* 2015;51(04):543-550. Doi: 10.1016/j.ejca.2014.11.013
- Sigismondi C, Gadducci A, Lorusso D, et al. Ovarian Sertoli-Leydig cell tumors. a retrospective MITO study. *Gynecol Oncol* 2012;125(03):673-676. Doi: 10.1016/j.ygyno.2012.03.024
- Nam SM, Kim JW, Eoh KJ, et al. A novel clinicopathological analysis of early stage ovarian Sertoli-Leydig cell tumors at a single institution. *Obstet Gynecol Sci* 2017;60(01):39-45. Doi: 10.5468/ogs.2017.60.1.39
- Brown J, Sood AK, Deavers MT, Milojevic L, Gershenson DM. Patterns of metastasis in sex cord-stromal tumors of the ovary: can routine staging lymphadenectomy be omitted? *Gynecol Oncol* 2009;113(01):86-90. Doi: 10.1016/j.ygyno.2008.12.007
- Thrall MM, Paley P, Pizer E, Garcia R, Goff BA. Patterns of spread and recurrence of sex cord-stromal tumors of the ovary. *Gynecol Oncol* 2011;122(02):242-245. Doi: 10.1016/j.ygyno.2011.03.020
- Prat J; FIGO Committee on Gynecologic Oncology. FIGO's staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum: abridged republication. *J Gynecol Oncol* 2015;26(02):87-89. Doi: 10.3802/jgo.2015.26.2.87
- Harris PA, Taylor R, Thielke R, Payne J, Gonzalez N, Conde JG. Research electronic data capture (REDCap)—a metadata-driven methodology and workflow process for providing translational

- research informatics support. *J Biomed Inform* 2009;42(02):377-381. Doi: 10.1016/j.jbi.2008.08.010
- 20 Chi M, Gilman AD, Iroegbu N. Management of metastatic ovarian Sertoli-Leydig cell tumor with sporadic multinodular goiter: a case report and literature review. *Future Oncol* 2011;7(09):1113-1117. Doi: 10.2217/fon.11.89
- 21 Zhang HY, Zhu JE, Huang W, Zhu J. Clinicopathologic features of ovarian Sertoli-Leydig cell tumors. *Int J Clin Exp Pathol* 2014;7(10):6956-6964
- 22 Watanabe T, Yamada H, Morimura Y, Abe M, Motoyama T, Sato A. Ovarian Sertoli-Leydig cell tumor with heterologous gastrointestinal epithelium as a source of alpha-fetoprotein: a case report. *J Obstet Gynaecol Res* 2008;34(03):418-421. Doi: 10.1111/j.1447-0756.2008.00730.x
- 23 Colombo N, Parma G, Zanagnolo V, Insinga A. Management of ovarian stromal cell tumors. *J Clin Oncol* 2007;25(20):2944-2951. Doi: 10.1200/JCO.2007.11.1005