



**Ministério da Saúde**

**Instituto Nacional de Câncer**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER**

**Pós-Graduação em Oncologia**

**RICARDO CASTELLANI DE MATTOS**

Expressão do Fator Induzido por Hipóxia e do Fator de Crescimento do Endotélio  
Vascular em Bexigas Irradiadas

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>.: Andréia Cristina de Melo

**RIO DE JANEIRO**

**2019**



**Ministério da Saúde**  
**Instituto Nacional de Câncer**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER**  
**Pós-Graduação em Oncologia**

**RICARDO CASTELLANI DE MATTOS**

Expressão do Fator Induzido por Hipóxia e do Fator de Crescimento do Endotélio  
Vascular em Bexigas Irradiadas

Dissertação apresentada ao Instituto Nacional de  
Câncer como parte dos requisitos para obtenção  
do título de Mestre em Oncologia

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andréia Cristina de Melo

**RIO DE JANEIRO**  
**2019**

M435e Mattos, Ricardo Castellani de.  
Expressão do fator induzido por hipóxia e do fator de crescimento do endotélio vascular em bexigas irradiadas / Ricardo Castellani de Mattos. – Rio de Janeiro, 2019.

103 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado em Oncologia) – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2019.

Orientador: Andréia Cristina de Melo.

1. Neoplasias do Colo do Útero. 2. Hipóxia. 3. Fator 1 Induzível por Hipóxia. 4. Radioterapia. I. Melo, Andréia Cristina de (Orient.). II. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. III. Título.

CDD 616.99466042695



**Ministério da Saúde**  
**Instituto Nacional de Câncer**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER**  
**Pós-Graduação em Oncologia**

**AUTOR: RICARDO CASTELLANI DE MATTOS**

**Expressão do Fator Induzido por Hipóxia e do Fator de Crescimento do  
Endotélio Vascular em Bexigas Irradiadas**

**ORIENTADORA: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andréia Cristina de Melo**

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dr.** Martin Bonamino - **Presidente**  
**Prof. Dr.** Angélica Nogueira Rodrigues  
**Prof. Dr.** Luciano Alves Favorito  
**Prof. Dr.** Luiz Henrique de Lima Araújo – Suplente I  
**Prof. Dr.** Antônio Rodrigues Braga Neto – Suplente II

**RIO DE JANEIRO**  
**2019**

Dedico à minha família.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à **Dra. Andréia Cristina de Melo**, minha orientadora e fonte inspiração, mulher que admiro e de quem tenho o privilégio da amizade. Muito obrigado pela ajuda, e pela coragem em apostar numa ideia inédita.

Ao **Dr. Leandro de Souza Thiago**, que, com conhecimento vasto e muita generosidade encaminhou decisões técnicas fundamentais na condução dos experimentos. Seu rigor foi estimulante.

À **Dra. Isabella dos Santos Guimarães**, incansável, precisa e de paciência inabalável. Obrigado pela atenção que tanto demandei.

À **Equipe de Enfermagem do Setor de Endoscopia do Hospital do Câncer II**. Vocês são incríveis! Obrigado por todo o carinho e paciência desde o início.

Ao meu chefe e amigo no setor de Endoscopia do HC II, **Dr. Edward Christian Brockmeyer Lusi**.

À **Dra. Claudia Bessa**, sua ajuda na convocação das pacientes foi decisiva.

À **Dra. Rachele Grazziotin**, pela fundamental ajuda com os dados da radioterapia.

À Enfermeira da Pesquisa Clínica **Flavia Vieira Guerra Alves**, que recebeu o projeto em seu nascimento.

À **Elizângela Marques Rodrigues**, pela pronta disponibilidade em atender às demandas de última hora.

Ao **Dr. Álvaro Ingles Garces**. Foi uma pena não termos você durante todo o projeto.

Ao **Sr. Fernando Paiva do RHC-HC II**. Sua disposição em cooperar com o fornecimento das informações hospitalares foi exemplar.

Ao **Dr. Guilherme Mesquita**, Patologista.

Aos **Professores e demais alunos da Pós Graduação**, com quem tanto aprendi durante esses dois anos.

Aos **colegas do staff e médicos residentes em Urologia do Hospital Federal da Lagoa**, sob a chefia do **Dr. Tomas Accioly de Souza**.

Aos **funcionários da Secretaria da Pós Graduação**, sempre precisos e atenciosos.

Às **pacientes**, cuja dignidade nos desafia. Espero poder ajudar.

Aos meus **amigos**: logo estarei de volta!

À minha **mãe**, meu exemplo maior.

Ao meu **irmão, Rafael**.

À **Eliza Vardiero Moraes**, minha esposa. Obrigado por tudo o que você oferece diariamente.

Aos **membros da banca examinadora**, por terem aceitado o convite de contribuir com esse trabalho, com discussão, críticas e sugestões.

*...Quando descobriu que suas crenças, há muito estimadas,  
não concordavam com as observações mais precisas,  
ele aceitou os fatos desconfortáveis.  
Ele preferiu a dura verdade a suas ilusões mais caras.  
Isto é o coração da ciência.*

*Carl Sagan*





**Ministério da Saúde**

**Instituto Nacional de Câncer**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER**

**Expressão do Fator Induzido por Hipóxia e do Fator de Crescimento do Endotélio Vascular em Bexigas Irradiadas**

**RESUMO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

Ricardo Castellani de Mattos

**Introdução:** O câncer do colo do útero representa importante problema de saúde pública, ocupando o quinto lugar entre as neoplasias mais incidentes no mundo. Seu tratamento envolve várias modalidades de intervenção, entre as quais a radioterapia. Os efeitos adversos tardios da radioterapia se relacionam à hipóxia tecidual e podem acometer estruturas vizinhas como a bexiga. A bexiga irradiada pode, por sua vez, desenvolver quadro inflamatório típico que configura a cistite induzida por radiação, da qual a hematúria é importante sintoma. O Fator Induzido por Hipóxia (HIF1A) é um fator de transcrição, que se associa a cofatores nucleares específicos diante de hipóxia, regulando a expressão de mais de 100 produtos gênicos envolvidos em diferentes vias celulares, como a angiogênese. O mecanismo pelo qual ocorre o aumento de vascularização submucosa na bexiga que apresenta dano induzido pela radiação, e em última instância resulta em hematúria, pode estar, portanto, relacionado ao aumento da expressão do HIF1A e seus alvos transcricionais, incluindo o VEGF. **Objetivos:** Esse estudo inédito tem como objetivo comparar a expressão do HIF1A e do VEGFA em amostras vesicais de pacientes submetidas à radioterapia como tratamento do câncer do colo do útero *versus* pacientes virgens de tratamento. Também foram analisadas as características da radioterapia empregada e seus efeitos adversos através de sistemas de pontuação. **Metodologia:** Trata-se de um estudo caso-controle avaliando a expressão do HIF1A e do VEGFA em fragmentos de tecido coletado por biópsia vesical endoscópica comparando-se as pacientes submetidas à radioterapia pélvica para tratamento do câncer do colo do útero com pacientes sem radiação pélvica prévia. A técnica utilizada para a avaliação da expressão do HIF1A e do VEGFA foi a PCR digital. Foram também coletados os dados referentes aos sistemas de pontuação de morbidade tardia pela radioterapia. **Resultados:** Foram incluídas 26 pacientes no estudo, das quais 14 pacientes eram previamente irradiadas e 12 pacientes eram virgens de tratamento (grupo controle) Entre as irradiadas, 7 pacientes (50%) apresentavam queixas compatíveis com dano actínico retal associado. Na escala RTOG/EORTC, que considera sintomas e achados cistoscópicos, a pontuação encontrada em 7 pacientes foi grau 1, em 4 pacientes foi grau 2 e em 3 pacientes foi grau 3. A pontuação encontrada no somatório dos graus de toxicidade na tabela LENT/SOMA variou entre 1 (4 pacientes) e 8 (uma paciente). O somatório dos graus de gravidade na escala CTCAE versão 4.03, variou de 0 (uma paciente) a 6 (duas pacientes), com média de 3. Não se detectou diferença estatisticamente significativa na expressão de HIF1A e VEGFA nas amostras vesicais de pacientes previamente irradiadas com amostras de pacientes não tratadas. Os valores obtidos foram normalizados utilizando gene de referência GAPDH. **Conclusão:** Não foi demonstrada diferença estatisticamente significativa nas comparações da expressão do HIF1A e do VEGFA entre o grupo irradiado e o grupo controle. No entanto, a frequência e a gravidade dos efeitos adversos da radioterapia justificam a continuidade de pesquisas que avaliem a importância da via do HIF na cistite actínica.



**Ministério da Saúde**

**Instituto Nacional de Câncer**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER**

**Expressão do Fator Induzido por Hipóxia e do Fator de Crescimento do Endotélio Vascular em Bexigas Irradiadas**

**ABSTRACT**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

Ricardo Castellani de Mattos

**Introduction:** Cervical cancer represents an important public health problem, representing the fifth among the most commonly diagnosed neoplasm in the world. Its treatment involves several modalities of intervention, among which the radiotherapy. The late adverse effects of radiotherapy are related to tissue hypoxia and may affect surrounding structures such as the bladder. The irradiated bladder may, in turn, develop a typical inflammatory picture that configures radiation-induced cystitis, of which hematuria is an important symptom. Hypoxia Induced Factor (HIF1A) is a transcription factor, which is associated with specific nuclear cofactors in the face of hypoxia, regulating the expression of more than 100 gene products involved in different cellular pathways, such as angiogenesis. The mechanism by which increased submucosal vascularization occurs in the bladder that exhibits radiation-induced damage, and ultimately results in hematuria, may therefore be related to increased expression of HIF1A and its transcriptional targets, including VEGF. **Objectives:** This original study aims to compare the expression of HIF1A and VEGFA in bladder samples of patients submitted to radiotherapy as treatment of cervical cancer versus treatment-naive patients. Characteristics of the radiotherapy used and its adverse effects through scoring systems were also analysed. **Methodology:** This is a case-control study evaluating the expression of HIF1A and VEGFA in fragments of tissue collected by endoscopic bladder biopsy comparing patients submitted to pelvic radiotherapy for treatment of cervical cancer with patients without previous pelvic radiation. The technique used for the evaluation of HIF1A and VEGFA expression was digital PCR. Data referring to late morbidity scoring systems by radiotherapy were also collected. **Results:** Twenty-six patients were included in the study, of which 14 patients were previously irradiated and 12 patients were treatment-naive (control group). Among the irradiated patients, 7 patients (50%) presented complaints compatible with associated rectal actinic damage. On the RTOG / EORTC scale, which considers symptoms and cystoscopic findings, the score found in 7 patients was grade 1, in 4 patients it was grade 2 and in 3 patients it was grade 3. The score found in the sum of the degrees of toxicity in the LENT / SOMA ranged from 1 (4 patients) to 8 (one patient). The sum of the degrees of severity on the CTCAE version 4.03 ranged from 0 (one patient) to 6 (two patients), with a mean of 3. No statistically significant difference was detected in the expression of HIF1A and VEGFA in bladder samples from previously irradiated patients with samples from untreated patients. The values obtained were normalized using GAPDH reference gene. **Conclusion:** There was no statistically significant difference in the comparisons of HIF1A and VEGFA expression between the irradiated group and the control group. However, the frequency and severity of the adverse effects of radiotherapy justify the continuation of researches that evaluate the importance of the HIF pathway in actinic cystitis.

## ÍNDICE

<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>xiv</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>xvi</b>
<b>LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....</b>	<b>xix</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1. Epidemiologia do câncer do colo do útero.....	1
1.2. Fatores de risco para o câncer do colo do útero.....	6
1.3. Histologia do câncer do colo do útero.....	7
1.4. Estadiamento do câncer do colo do útero.....	8
1.5. Tratamento do câncer do colo do útero.....	12
1.6. Radioterapia no câncer do colo do útero.....	14
1.7. Efeitos adversos da Radioterapia.....	15
1.8. A Cistite Induzida por Radiação.....	16
1.9. Tratamento do sangramento resultante tardia da cistite induzida pela radiação.....	23
1.10. Fator Induzido por Hipóxia e Fator de Crescimento do Endotélio Vascular.....	25
1.11. O impacto epidemiológico das complicações da radioterapia.....	29
1.12. A qualidade de vida do sobrevivente de câncer.....	34
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>37</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>38</b>
3.1. Objetivo Primário.....	38

3.2. Objetivos Secundários.....	38
<b>4. METODOLOGIA.....</b>	<b>39</b>
4.1. Desenho do estudo.....	39
4.2. Cálculo amostral.....	39
4.3. Considerações éticas.....	39
4.4. Critérios de elegibilidade.....	40
4.4.1. Critérios de Inclusão.....	40
4.4.2. Critérios de Exclusão.....	40
4.5. Coleta de dados/procedimentos do estudo.....	41
4.6. Quantificação da expressão do HIF1A e do VEGFA.....	43
4.6.1.Extração de RNA e síntese de cDNA.....	43
4.6.2.PCR digital em gotas (ddPCR).....	43
4.7. Armazenamento e análise estatística dos dados.....	45
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>46</b>
5.1. Características gerais das pacientes.....	46
5.2. As características do tratamento por radioterapia.....	47
5.3. As alterações histopatológicas relacionadas à radioterapia.....	50
5.4. A morbidade tardia da radioterapia.....	51
5.5. A expressão do HIF1A e do VEGFA em amostras vesicais.....	54
5.6. A expressão do HIF1A e do VEGFA de acordo com o sistema RTOG/EORTC.....	60
5.7. O lavado vesical enquanto amostra.....	62
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>64</b>

6.1. Os resultados de expressão do HIF e do VEGF.....	64
6.2. As limitações do estudo.....	68
6.3. Perspectivas.....	71
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>72</b>
<b>8. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>73</b>
<b>9. ANEXOS.....</b>	<b>86</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1: Incidência estimada, ajustada pela idade (Mundo), em 2018, países de IDH muito alto, mulheres, todas as idades, casos por 100.000 habitantes.....	1
Tabela 1.2: Incidência estimada, ajustada pela idade (Mundo), em 2018, países de IDH baixo, mulheres, todas as idades, casos por 100.000 habitantes.....	2
Tabela 1.3: Estimativas para o ano de 2018 das taxas brutas e ajustadas de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de câncer, segundo sexo e localização primária.....	5
Tabela 1.4: Estadiamento do câncer do colo do útero segundo o sistema da FIGO, 2018.....	10
Tabela 1.5: Estadiamento do câncer do colo do útero segundo o sistema TNM da AJCC, 2017.....	11
Tabela 1.6: Fisiopatologia proposta da cistite induzida por radiação.....	18
Tabela 1.7: RTOG/EORTC Sistema de graduação de morbidade tardia pela radiação (bexiga).....	20
Tabela 1.8: Escala LENT/SOMA para a bexiga.....	21
Tabela 1.9: Escala de eventos adversos CTCAE, versão 4.03. Foram selecionados eventos adversos que apresentam maior probabilidade de ocorrerem como complicação urinária da radioterapia.....	22
Tabela 4.1: Recomendações técnicas do fabricante para a realização do PCR.....	44
Tabela 5.1: Características gerais das pacientes.....	47

Tabela 5.2: Características da radioterapia empregada.....	49
Tabela 5.3: Doses média e máxima na bexiga, pela radioterapia externa, nas pacientes tratadas pela técnica conformacional em 3 dimensões.....	50
Tabela 5.4: Pontuação de toxicidade vesical e complicações relacionadas à radioterapia.....	53
Tabela 5.5: Quantificação do RNA nas amostras de biópsia vesical em pacientes irradiadas e controles.....	56
Tabela 5.6: Valores obtidos através da análise de expressão gênica de HIF1A, VEGFA e do GAPDH nas pacientes irradiadas.....	58
Tabela 5.7: Valores obtidos através da análise de expressão gênica de HIF1A, VEGFA e do GAPDH, no grupo controle.....	59
Tabela 5.8: Expressão do HIF1A e do VEGFA em pacientes irradiadas de acordo com o escore de toxicidade RTOG/EORTC.....	61

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Número estimado de casos prevalentes em 5 anos, Mundo, todos os sexos, todas as idades.....	3
Figura 1.2: Número estimado de casos prevalentes em 5 anos, países de baixo IDH, mulheres, todas as idades.....	3
Figura 1.3: Número estimado de mortes, Mundo, ambos os sexos, todas as idades.....	4
Figura 1.4: Mortalidade estimada, ajustada pela idade, Mundo, 2018, todos os cânceres, ambos os sexos, todas as idades, considerando o IDH, casos por 100.000 habitantes.....	4
Figura 1.5: Distribuição proporcional no Brasil dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma.....	6
Figura 1.6: A - Carcinoma de células escamosas, células grandes, tipo não queratinizante; B - adenocarcinoma, tipo usual ou endocervical.....	8
Figura 1.7: Estágios do desenvolvimento da cistite induzida por radiação.....	17
Figura 1.8: Modelo expandido da via de regulação canônica de HIF $\alpha$ .....	26
Figura 1.9: Número de casos matriculados no HC II em comparação com a estimativa para a cidade e para o estado do Rio de Janeiro, 2010-2015.....	31
Figura 1.10: Distribuição das frequências dos casos de câncer do colo do útero no HC II segundo estadiamento clínico de apresentação, 2005-2015, desconsiderando casos não estadiados.....	32
Figura 1.11: Estadio I vs. somatório dos demais estadios no HC II, no momento da matrícula, 2005-2015, desconsiderando os casos não estadiados.....	33
Figura 1.12: Estadiamento precoce (I – II) x tardio (III – IV) no momento da matrícula no HC II, 2005-2015, desconsiderando casos não estadiados.....	33



Figura 1.13: Distribuição das matrículas por câncer do colo do útero no HC II segundo o estadiamento clínico no período de 2005 a 2015.....	34
Figura 1.14: Número e porcentagem de sobreviventes de câncer em 5 anos entre 2000 e 2030.....	36
Figura 4.1: PCR digital em gotas.....	45
Figura 5.1: Achados histopatológicos compatíveis com o dano induzido pela radiação.....	51
Figura 5.2: Aspecto encontrado em exame de cistoscopia normal.....	54
Figura 5.3: Aspecto da mucosa vesical de pacientes irradiadas apresentando graus variados de neovascularização.....	54
Figura 5.4: Gráficos da PCR digital em gotas.....	57
Figura 5.5: Análise da expressão de RNA-m por ddPCR de HIF1A nas pacientes controle (não irradiadas) e pacientes previamente submetidas à radioterapia pélvica (cistite).....	59
Figura 5.6: Análise da expressão de RNA-m por ddPCR de VEGFA nas pacientes controle (não irradiadas) e pacientes previamente submetidas à radioterapia pélvica (cistite).....	60
Figura 5.7: Análise da expressão de RNA-m por ddPCR de HIF1A e VEGFA nas pacientes previamente submetidas à radioterapia pélvica de acordo com o escore de morbidade tardia RTOG/EORTC.....	62
Figura 5.8: Análise da expressão de RNA-m por ddPCR de HIF1A e VEGFA nas biópsias e nas amostras de lavado vesical das pacientes controle.....	63
Figura 6.1: Expressão normalizada do RNA-m de HIF1A e VEGFA em tecido normal e apresentando proctopatia crônica induzida pela radiação (PCIR), $p < 0,001$ .....	66
Figura 6.2: Análise semi-quantitativa do HIF-1 $\alpha$ : foi observado aumento significativo da expressão do HIF-1 $\alpha$ em 4 semanas ( $p < 0.001$ ).....	67

Figura 6.3: A expressão do VEGF apresentou aumento significativo 6 semanas após a irradiação ( $p = 0,007$ ).....	67
Figura 6.4: Exemplo de amostra vesical obtida por biópsia. Nota-se o tamanho diminuto do fragmento.....	70

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AJCC – American Joint Committee on Cancer  
AL – acelerador linear  
BT – braquiterapia  
cDNA – DNA complementar  
cGy – centigrays  
CTCAE – Common Terminology Criteria for Adverse Events  
ddPCR – PCR digital em gotas  
DNA – ácido desoxirribonucleico  
EAS – exame de elementos anormais e do sedimento urinário  
ECOG – Eastern Cooperative Oncology Group  
EORTC – European Organisation for Research and Treatment of Cancer  
ERH – elementos responsivos a hipóxia  
FIGO – International Federation of Gynecology and Obstetrics  
FIH – Fator Inibidor do HIF  
GAPDH – gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase  
HC I – Hospital do Câncer I  
HC II – Hospital do Câncer II  
HC III – Hospital do Câncer III  
hgb – hemoglobina  
HIF – Fator Induzido por Hipóxia  
HIF1A – gene que codifica HIF-1 $\alpha$   
HIF-1 $\alpha$  – proteína codificada pelo gene HIF1A  
HMK – Hospital Mário Kroeff  
HPV – Vírus Papiloma Humano  
IDH – Índice de Desenvolvimento Humano  
INCA – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva  
LENT/SOMA – Late Effects Normal Tissue/ Subjective, Objective, Management, Analytic  
mTOR – alvo da rapamicina em mamíferos  
NCCS – National Coalition for Cancer Survivorship  
PCR – reação em cadeia da polimerase  
PHD – enzimas que contém domínio prolil-hidroxilase  
PKM2 – isoforma M2 da piruvato quinase

ptn – proteína (indicação de proteinúria no EAS)  
pVHL – proteína supressora tumoral von Hippel-Lindau  
RHC – Registro Hospitalar de Câncer  
RNA – ácido ribonucleico  
RNA-m – RNA mensageiro  
ROS – espécies reativas de oxigênio  
RT – Radioterapia  
RTE – Radioterapia externa  
RTOG – Radiation Therapy Oncology Group  
RT-PCR – PCR em tempo real  
TCLE – termo de consentimento livre e esclarecido  
VEGF – Fator de Crescimento Endotelial Vascular  
VEGFA – gene que codifica o VEGF  
VEGFR – receptor do VEGF

## 1. Introdução

### 1.1. Epidemiologia do câncer do colo do útero

O câncer do colo do útero representa importante problema de saúde pública, ocupando o quinto lugar entre os mais incidentes no mundo, sendo o quarto tipo mais comum na população feminina. Em termos globais, cerca de 70% dos casos ocorrem em áreas com menores níveis de desenvolvimento humano (FERLAY *et al*, 2013). O impacto epidemiológico do câncer do colo do útero em países menos desenvolvidos é ainda maior. Enquanto nos países de mais alto Índice de Desenvolvimento Humano (IDH), o câncer do colo do útero é o décimo mais incidente incluindo homens (sétimo entre mulheres, Tabela 1.1), em países de baixo IDH é a segunda neoplasia maligna mais incidente entre as mulheres (Tabela 1.2), com 29,8 novos casos por 100.000 habitantes (GLOBOCAN, 2018).

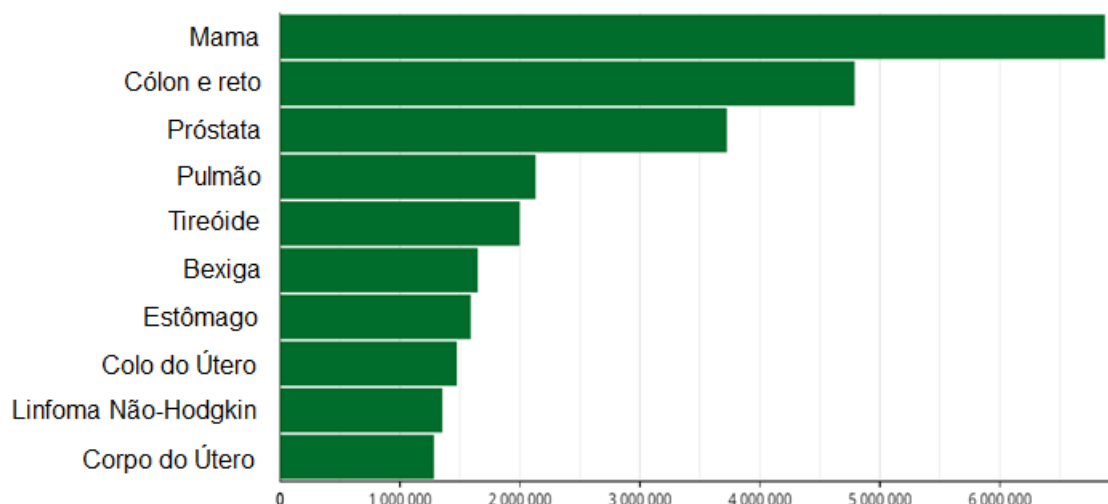
**Tabela 1.1:** Incidência estimada, ajustada pela idade (Mundo), em 2018, países de IDH muito alto, mulheres, todas as idades, casos por 100.000 habitantes. Fonte: GLOBOCAN, 2018.

<b>Câncer</b>	<b>Incidência</b>
<b>Mama</b>	75,2
<b>Cólon e reto</b>	25,0
<b>Pulmão</b>	21,4
<b>Tireoide</b>	18,2
<b>Corpo do útero</b>	15,7
<b>Melanoma cutâneo</b>	9,6
<b>Colo do útero</b>	9,4
<b>Ovário</b>	8,6
<b>Linfoma Não-Hodgkin</b>	7,7
<b>Estômago</b>	6,6

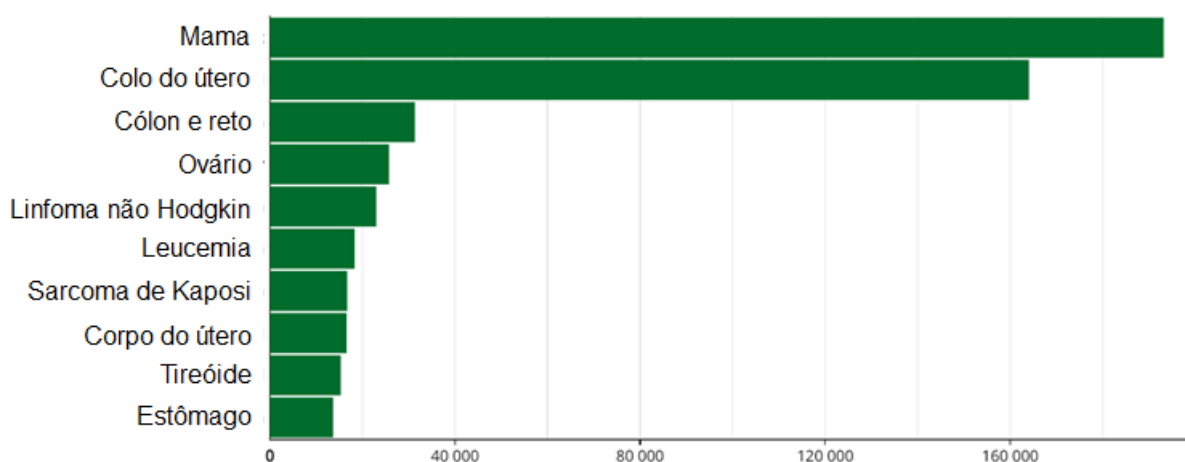
**Tabela 1.2:** Incidência estimada, ajustada pela idade (Mundo), em 2018, países de IDH baixo, mulheres, todas as idades, casos por 100.000 habitantes. Fonte: GLOBOCAN, 2018.

<b>Câncer</b>	<b>Incidência</b>
<b>Mama</b>	32,8
<b>Colo do útero</b>	29,8
<b>Cólon e reto</b>	7,0
<b>Ovário</b>	4,6
<b>Fígado</b>	4,3
<b>Estômago</b>	3,7
<b>Esôfago</b>	3,4
<b>Linfoma Não-Hodgkin</b>	3,4
<b>Corpo do útero</b>	3,1
<b>Leucemia</b>	2,1

Em todo o mundo, a neoplasia do colo do útero é a oitava mais prevalente em cinco anos (Figura 1.1), sendo a quarta entre as mulheres, depois do câncer de mama, do câncer de cólon e reto e do câncer de tireoide (excluindo o câncer de pele não melanoma). Enquanto nos países de IDH baixo a prevalência em cinco anos na população total é de 164.092 casos, atrás apenas do câncer de mama (Figura 1.2), nos países de mais alto IDH é apenas a décima segunda neoplasia mais prevalente (GLOBOCAN, 2018).



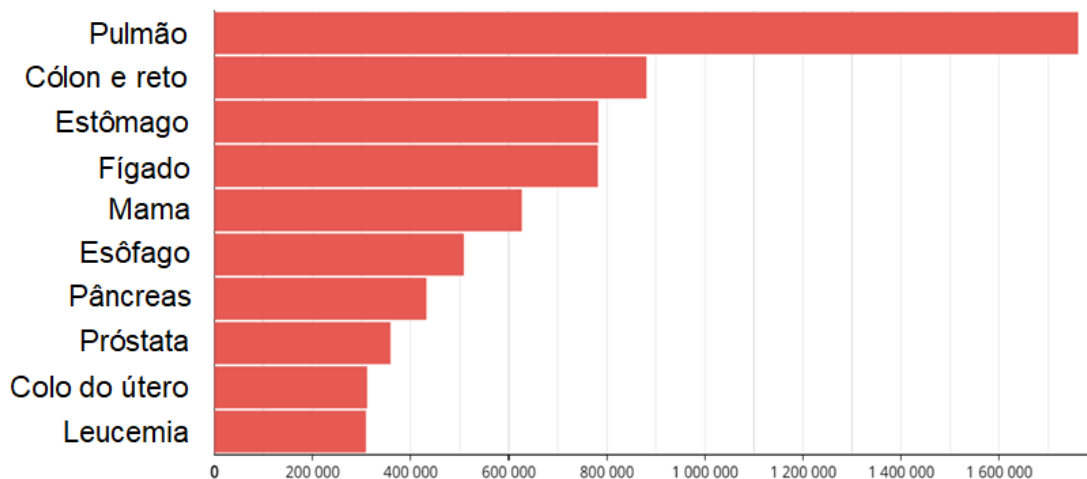
**Figura 1.1:** Número estimado de casos prevalentes em 5 anos, Mundo, todos os sexos, todas as idades. Fonte: GLOBOCAN, 2018.



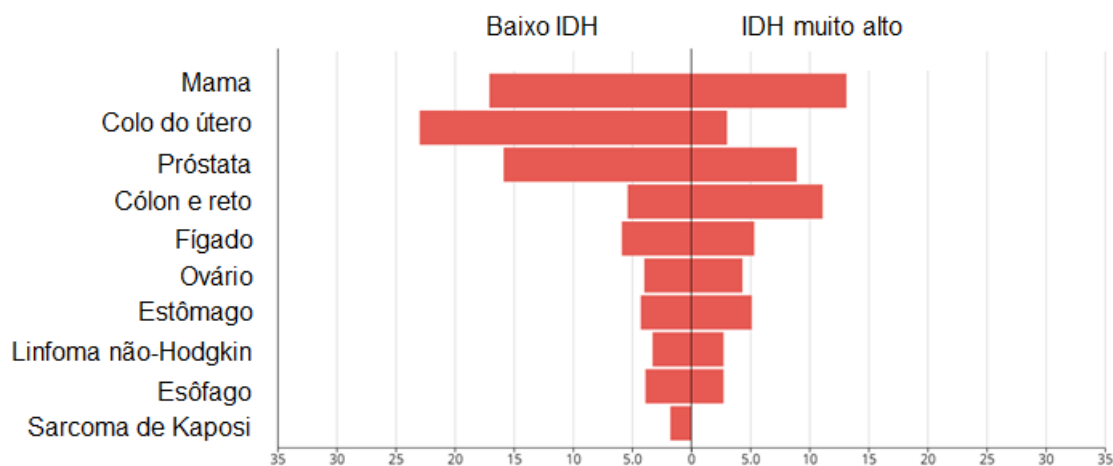
**Figura 1.2:** Número estimado de casos prevalentes em 5 anos, países de baixo IDH, mulheres, todas as idades. Fonte: GLOBOCAN, 2018.

O câncer do colo do útero é a nona neoplasia em mortalidade global, incluindo a população masculina (Figura 1.3). Na população feminina é a quarta neoplasia de maior mortalidade (6,9 mortes por 100.000). Enquanto nos países de maior IDH apresenta mortalidade de 3 casos por 100.000, ocupando a sétima

posição, é a neoplasia de maior mortalidade nos países de baixo IDH (Figura 1.4), com 23 casos por 100.000 (GLOBOCAN, 2018).



**Figura 1.3:** Número estimado de mortes, Mundo, ambos os sexos, todas as idades. Fonte: GLOBOCAN, 2018.



**Figura 1.4:** Mortalidade estimada, ajustada pela idade, Mundo, 2018, todos os cânceres, ambos os sexos, todas as idades, considerando o IDH, casos por 100.000 habitantes. Fonte: GLOBOCAN, 2018.




O Brasil é o quinto país do mundo em estimativa para o número de casos de câncer do colo do útero (GLOBOCAN, 2018). São esperados 16.370 novos casos de câncer do colo do útero no país para cada ano do biênio 2018-2019 (Tabela 1.3), com um risco estimado de 15,43 casos a cada 100 mil mulheres (ESTIMATIVA INCA, 2018). Trata-se da terceira neoplasia mais incidente em mulheres no Brasil (Figura 1.5) e a terceira causa de morte por câncer no sexo feminino no nosso país. Em 2016 ocorreram no Brasil 5.847 óbitos por câncer do colo do útero (BRASIL, 2017).

**Tabela 1.3:** Estimativas para o ano de 2018 das taxas brutas e ajustadas<sup>a</sup> de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de câncer, segundo sexo e localização primária\*. Fonte: ESTIMATIVA INCA 2018

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos											
	Homens						Mulheres					
	Estados			Capitais			Estados			Capitais		
	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada
Próstata	68.220	66,12	67,82	15.720	70,76	66,31	-	-	-	-	-	-
Mama Feminina	-	-	-	-	-	-	59.700	56,33	51,29	19.920	80,33	63,98
Colo do Útero	-	-	-	-	-	-	16.370	15,43	17,11	4.620	18,66	17,58
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	18,16	16,97	4.520	20,33	21,05	12.530	11,81	9,22	3.710	15,06	11,44
Cólon e Reto	17.380	16,83	20,03	5.630	25,34	25,16	18.980	17,90	18,40	6.820	27,49	20,84
Estômago	13.540	13,11	14,98	3.240	14,55	10,95	7.750	7,32	5,96	2.210	8,92	5,34
Cavidade Oral	11.200	10,86	11,22	2.770	12,38	12,03	3.500	3,28	2,86	1.010	3,89	2,80
Laringe	6.390	6,17	6,31	1.540	6,86	8,44	1.280	1,20	0,96	420	1,30	0,92
Bexiga	6.690	6,43	7,79	1.920	8,59	9,20	2.790	2,63	2,21	890	3,42	2,61
Esôfago	8.240	7,99	6,73	1.450	6,46	7,04	2.550	2,38	1,67	540	1,85	1,38
Ovário	-	-	-	-	-	-	6.150	5,79	4,80	2.140	8,46	6,54
Linfoma de Hodgkin	1.480	1,43	1,14	550	2,19	1,93	1.050	0,96	0,92	400	1,33	1,19
Linfoma não Hodgkin	5.370	5,19	5,42	1.480	6,59	6,81	4.810	4,55	4,19	1.520	6,10	5,44
Glândula Tireoide	1.570	1,49	1,50	500	1,87	1,76	8.040	7,57	5,88	2.490	10,01	7,02
Sistema Nervoso Central	5.810	5,62	5,49	1.340	6,10	6,55	5.510	5,17	5,17	1.400	5,63	4,70
Leucemias	5.940	5,75	5,51	1.480	6,69	6,58	4.860	4,56	4,29	1.190	4,72	4,59
Corpo do Útero	-	-	-	-	-	-	6.600	6,22	5,44	2.370	9,46	7,46
Pele Melanoma	2.920	2,82	2,69	800	3,34	3,31	3.340	3,16	2,15	880	3,42	2,74
Outras Localizações	41.480	40,17	35,26	9.470	42,62	43,45	36.230	34,17	29,04	8.920	36,00	28,39
Todas as Neoplasias, exceto Pele não Melanoma	214.970	208,32	217,27	52.410	235,91	226,91	202.040	190,61	191,78	61.450	247,95	199,05
Pele não Melanoma	85.170	82,53	-	17.020	76,60	-	80.410	75,84	-	17.230	69,60	-
Todas as Neoplasias Malignas	300.140	290,86	-	69.430	312,52	-	282.450	266,47	-	78.680	317,47	-
<b>Todas as Neoplasias Malignas Corrigidas para Sub-Registro</b>	<b>324.580</b>	<b>314,55</b>	-	-	-	-	<b>310.300</b>	<b>292,74</b>	-	-	-	-

<sup>a</sup>População padrão mundial (1960). / \*Números arredondados para múltiplos de 10.

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%	<b>Homens</b> 	<b>Mulheres</b>	Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%			Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%			Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%			Leucemias	4.860	2,4%

\*Números arredondados para múltiplos de 10.

**Figura 1.5:** Distribuição proporcional no Brasil dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma. Fonte: ESTIMATIVA INCA, 2018.

O controle do câncer do colo do útero constitui uma das prioridades da agenda de saúde do Brasil e integra o Plano de Ações Estratégicas para o Enfrentamento das Doenças Crônicas não Transmissíveis (Ministério da Saúde). O Ministério da Saúde, por meio da publicação “Diretrizes para o Rastreamento do Câncer do Colo do Útero” (DIRETRIZES, 2016) recomenda o exame citopatológico em mulheres assintomáticas com idade entre 25 e 64 anos, a cada três anos, após dois exames anuais consecutivos normais. Em caso de resultado de lesão de baixo grau, a indicação é de repetição do exame em seis meses.

## 1.2. Fatores de risco para o câncer do colo do útero

O principal fator envolvido na etiologia do câncer do colo do útero são as infecções persistentes pelos vírus papiloma humanos (HPV). A infecção pelo HPV é a infecção sexualmente transmissível mais comum em todo o mundo, e a maioria dos indivíduos sexualmente ativos de ambos os sexos a adquirem em algum momento durante a sua vida. Cerca de 291 milhões de mulheres em todo o mundo terão infecção por HPV do colo do útero a qualquer momento, correspondendo a uma prevalência de 10,4%, embora a prevalência seja maior entre as mulheres menores de 25 anos (16,9%) (DE SANJOSÉ *et al*, 2007; STEWART & WILD, 2014).

A infecção pelo HPV foi a primeira condição descrita como necessária para o desenvolvimento de um câncer no ser humano (BHATLA *et al*, 2018a). Hoje, sabe-se que o câncer do colo do útero é um desfecho raro, de longo prazo, da infecção

persistente do trato genital inferior por um dos tipos de HPV de alto risco. Entre os 13 tipos oncogênicos de HPV, os mais comumente detectados no câncer do colo do útero em todo o mundo são o HPV16 (57%) e o 18 (16%), enquanto os tipos 31, 33, 45, 52 e 58 são detectados em cerca de 19% dos casos (BOSCH *et al*, 2002; IARC, 2007). A infecção pelo vírus pode levar ao surgimento de lesões pré-malignas que, após anos podem evoluir para câncer invasivo. Os fatores de risco mais importantes para persistência e progressão são a imunodeficiência e o tipo de HPV envolvido, sendo o HPV16 o mais provável de persistir e causar o câncer do colo do útero (IARC, 2012).

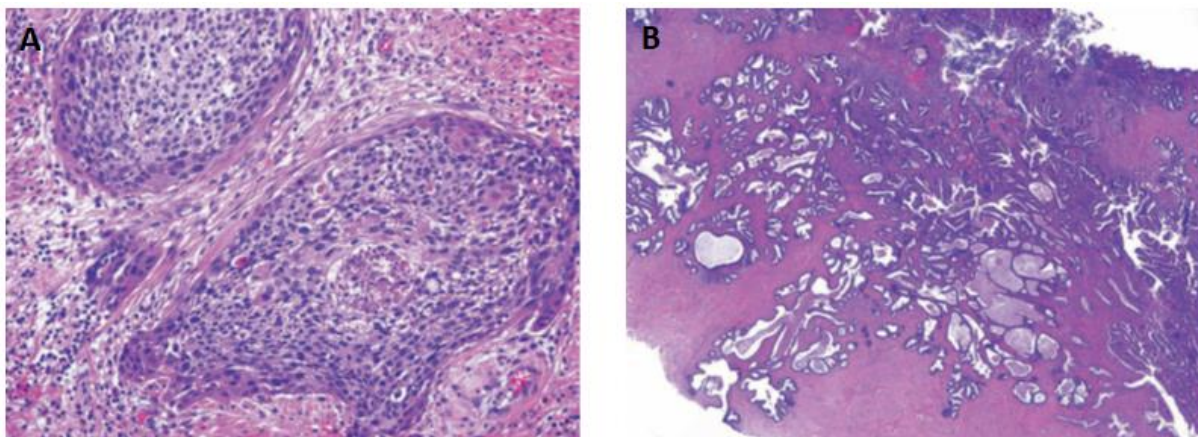
Considerando apenas os tipos oncogênicos do HPV, apenas um décimo das infecções persiste e pode progredir para câncer invasivo (BHATLA *et al*, 2018a). Embora não sejam conhecidos todos os fatores relacionados à progressão, uma possibilidade estudada tem sido a diversidade de linhagens em um mesmo tipo viral. Em uma população do sudeste brasileiro foram identificadas como mais prevalentes em tumores invasivos as linhagens A e D do HPV 16 e a linhagem A do HPV 18. Tais linhagens são as mais prevalentes em populações europeias (HPV 16 A e HPV 18 A) e de ancestralidade ameríndia (HPV 16 D) (VIDAL *et al*, 2016).

Outros fatores de risco para o câncer do colo do útero, além da infecção pelo HPV, são fracos em termos da magnitude da associação (tabagismo) ou representam correlatos da probabilidade de aquisição da infecção (número de parceiros sexuais) ou, possivelmente da probabilidade de progressão da infecção pelo HPV ao câncer (idade na primeira relação sexual e no primeiro parto, paridade, uso de contraceptivos orais e imunossupressão) (VELDHUIJZEN *et al*, 2010; IARC, 2012).

### **1.3. Histologia do câncer do colo do útero**

O câncer do colo do útero origina-se na junção entre o epitélio colunar da endocérvice e o epitélio escamoso da ectocérvice, um lugar de alterações metaplásicas contínuas, especialmente na puberdade e a partir da primeira gravidez até a menopausa. Histologicamente, 85-90% dos tumores invasivos do colo do útero são carcinomas de células escamosas (Figura 1.6), aparecendo como infiltração de

redes de células neoplásicas no estroma, com diferentes graus de diferenciação, com ou sem queratinização (STEWART & WILD, 2014).



**Figura 1.6:** A - Carcinoma de células escamosas, células grandes, tipo não queratinizante; B - adenocarcinoma, tipo usual ou endocervical. Fonte: STEWART & WILD, 2014.

Adenocarcinomas (Figura 1.6) e suas variantes constituem 10 a 15% das neoplasias do colo do útero. O mais comum tipo de adenocarcinoma é o endocervical, mostrando glândulas anormais de tamanho e forma variáveis com brotamentos e ramificações infiltrando o estroma (STEWART & WILD, 2014).

Na população brasileira, o carcinoma de células escamosas se apresenta em pacientes mais jovens, mais frequentemente de cor negra, com pior nível de escolaridade, e com maior consumo de álcool e tabaco. No entanto, a despeito das diferenças demográficas entre os dois tipos histológicos, a resposta terapêutica após a primeira linha de tratamento é equivalente nos dois grupos (NOGUEIRA-RODRIGUES *et al*, 2014).

#### **1.4. Estadiamento do câncer do colo do útero**

O estadiamento do câncer do colo do útero é o mais antigo da literatura, datando de 1928, quando, pela primeira vez, o câncer do colo do útero foi agrupado em diferentes fases de acordo com a extensão do crescimento tumoral (PECORELLI *et al*, 2009).

O câncer do colo do útero se dissemina por extensão direta para os paramétrios, vagina, útero e órgãos adjacentes, isto é, bexiga e reto. A disseminação linfática acomete inicialmente os linfonodos regionais, ou seja, as cadeias obturadora, ilíaca externa e ilíaca interna, e daí para a cadeia ilíaca comum e cadeia para-aórtica. Metástases distantes para os pulmões, fígado e esqueleto pela via hematogênica são um fenômeno tardio (BHATLA *et al*, 2018a).

O estadiamento adequado do câncer do colo do útero é fundamental para a determinação da abordagem terapêutica. O sistema de classificação mais utilizado em todo o mundo é o da *International Federation of Gynecology and Obstetrics* (FIGO). Uma vez que a maioria dos casos ocorre em países em desenvolvimento, a FIGO propõe um sistema de estadiamento essencialmente clínico (MUTCH, 2009), com base nos resultados do exame físico, biópsias, exames de imagem e alguns outros testes que são feitos em alguns casos, como a cistoscopia e a proctoscopia. A utilização desses outros métodos é encorajada e opcional, mas não mandatória (PECORELLI *et al*, 2009). O estadiamento não é baseado no que é encontrado durante a cirurgia. Se a cirurgia for realizada, um estadio patológico pode ser determinado a partir dos achados da cirurgia, mas isso não altera o seu estadio clínico, no qual é baseado o plano de tratamento.

O Comitê da FIGO para Oncologia Ginecológica revisou o estadiamento do carcinoma do colo do útero em 2018, em colaboração com outras sociedades de oncologia ginecológica. A revisão de 2018 (Tabela 1.4) permite a incorporação de achados de qualquer modalidade de imagem ou patologia, além da avaliação clínica do tamanho tumoral e da extensão da doença. Exames de imagem e de anatomia patológica podem ser usados na avaliação de linfonodos retroperitoneais. Quando considerados metastáticos, o caso será classificado no novo estadio IIIC. Caso apenas os linfonodos pélvicos estejam acometidos, o estadio correspondente é o IIIC1, diante do acometimento para-aórtico, o estadio equivalente é o IIIC2. As notações “r” e “p” devem ser usadas para indicar o método utilizado para o estadiamento, seja por imagem ou patologia, respectivamente (BHATLA, 2018b).

**Tabela 1.4:** Estadiamento do câncer do colo do útero segundo o sistema da FIGO, 2018.

FIGO	Tumor primário
I	Carcinoma limitado ao colo do útero
IA	Carcinoma invasivo diagnosticado apenas pela microscopia. Invasão estromal com profundidade máxima de 5 mm <sup>a</sup>
IA1	Invasão estromal de 3 mm ou menos em profundidade
IA2	Invasão estromal maior ou igual a 3 mm e menor que 5 mm de profundidade
IB	Carcinoma invasivo: maior ou igual a 5 mm de profundidade (maior que IA), confinada ao colo do útero <sup>b</sup>
IB1	Carcinoma invasivo: maior ou igual a 5 mm de profundidade e menor que 2 cm de diâmetro
IB2	Carcinoma invasivo: maior ou igual a 2 cm e menor que 4 cm de diâmetro
IB3	Carcinoma invasivo: maior ou igual a 4 cm
II	Tumor invade além do útero, sem invasão da parede pélvica ou do terço inferior da vagina
IIA	Invasão limitada aos dois terços superiores da vagina, sem invasão parametrial
IIA1	Lesão visível, 4 cm ou menos
IIA2	Lesão visível com mais de 4 cm
IIB	Tumor com invasão parametrial, sem invasão da parede pélvica
III	Tumor com extensão ao terço inferior da vagina e/ou à parede pélvica lateral e/ou causando hidronefrose e/ou envolve linfonodos pélvicos e/ou para-aórticos
IIIA	Tumor acomete o terço inferior da vagina sem invadir a parede pélvica
IIIB	Tumor se estende à parede pélvica e/ou causa hidronefrose
IIIC	Envolvimento de linfonodos pélvicos e/ou para-aórticos, independente do tamanho e extensão tumoral (com anotações r e p) <sup>c</sup>
IIIC1	Metástases apenas para linfonodos pélvicos
IIIC2	Metástases para linfonodos para-aórticos
IV	Tumor invade a mucosa vesical ou o reto (com biópsia) e/ou se estende além da pelve verdadeira (edema bolhoso não classifica como T4)
IVA	Disseminação para órgãos pélvicos adjacentes
IVB	Disseminação para órgãos à distância

Em caso de dúvida deve ser atribuído o estadio inferior.

<sup>a</sup> Exames de imagem e anatomia patológica podem ser usados quando disponíveis.

<sup>b</sup> O acometimento do espaço linfovascular não muda o estadiamento. A extensão lateral da lesão não é mais considerada.

<sup>c</sup> Deve ser acrescentada a notação “r”, (referente a: radiologia) ou “p”, (referente a: patologia), para indicar o método pelo qual o caso foi alocado no estágio IIIC. Exemplo: Se um exame de imagem indica metástase linfonodal pélvica, a alocação de estadiamento seria IIIC1r, e se confirmada por achados patológicos, seria IIIC1p. A modalidade do exame de imagem ou da técnica de patologia usada deve sempre ser documentada (BHATLA *et al*, 2018b).

O estadiamento do câncer do colo do útero proposto *pelo American Joint Committee on Cancer (AJCC)* é, por sua vez, baseado no sistema TNM (Tabela 1.5), onde o descritor T define a extensão do tumor primário, o descritor N define o envolvimento de linfonodos regionais e o descritor M se refere à presença de lesões metastáticas em sítios distantes (AJCC, 2017).

**Tabela 1.5:** Estadiamento do câncer do colo do útero segundo o sistema TNM da AJCC, 2017.

<b>T</b>	<b>Tumor primário</b>
TX	Tumor primário não pode ser avaliado
T0	Não há evidência do tumor primário
T1	Carcinoma limitado ao colo do útero
T1a	Carcinoma invasivo diagnosticado apenas pela microscopia. Invasão estromal com profundidade máxima de 5 mm e largura máxima de 7 mm
T1a1	Invasão estromal de 3 mm ou menos em profundidade e de 7 mm ou menos de largura
T1a2	Invasão estromal com mais de 3 e menos de 5 mm de profundidade e 7 mm ou menos de largura
T1b	Lesão clinicamente visível confinada ao colo ou lesão microscópica maior que T1a/IA2
T1b1	Lesão visível, 4 cm ou menos
T1b2	Lesão visível com mais de 4 cm
T2	Tumor invade além do útero, sem invasão da parede pélvica ou do terço inferior da vagina
T2a	Invasão limitada aos dois terços superiores da vagina, sem invasão parametrial
T2a1	Lesão visível, 4 cm ou menos
T2a2	Lesão visível com mais de 4 cm

T2b	Tumor com invasão parametrial, sem invasão da parede pélvica
T3	Tumor com extensão à parede pélvica lateral e/ou envolvendo o terço inferior da vagina e/ou causando hidronefrose
T3a	Tumor acomete o terço inferior da vagina sem invadir a parede pélvica
T3b	Tumor se estende à parede pélvica e/ou causa hidronefrose
T4	Tumor invade a mucosa vesical ou o reto e/ou se estende além da pelve verdadeira (edema bolhoso não classifica como T4)
<b>N</b>	<b>Linfonodos regionais</b>
NX	Linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Não há linfonodos regionais acometidos
N0 (i+)	Células tumorais isoladas, até 0,2 mm
N1	Metástases para linfonodos regionais
<b>M</b>	<b>Metástases à distância</b>
M0	Sem metástases à distância
M1	Metástases distantes (incluindo peritônio, linfonodos supra clavicular, mediastinal ou distantes, fígado, pulmão ou ossos)

### 1.5. Tratamento do câncer do colo do útero

O tratamento do câncer do colo do útero é direcionado pelo estadiamento da doença, envolve várias modalidades de intervenção e possibilita alternativas terapêuticas em diferentes condições clínicas e patológicas. Devido à complexidade do manejo da doença, serão expostas aqui apenas as linhas gerais do tratamento primário (NCCN, 2018).

Para pacientes com doença em estadio IA1, quando há a intenção de preservar a fertilidade da paciente, uma biópsia em cone é o tratamento adequado. Para pacientes com doença em estadio IA1 com invasão do espaço linfovascular ou doença em estadio IA2, uma biópsia em cone com margens cirúrgicas negativas e dissecação de linfonodos pélvicos pode ser recomendada, assim como a traquelectomia radical com linfadenectomia pélvica (ANDIKYAN *et al*, 2014; ABURUSTUM, SONODA, 2010). Para pacientes com doença em estadio IA1 com invasão do espaço linfovascular ou no estadio IA2, quando não há a intenção da preservação da fertilidade, pode ser oferecida a histerectomia radical modificada



com linfadenectomia pélvica ou a radioterapia externa associada à braquiterapia (KOKKA *et al*, 2013).

Para pacientes com doença em estadios IB1 ou IIA1 o tratamento oferecido envolve a histerectomia radical com linfadenectomia pélvica com ou sem linfadenectomia para-aórtica ou a radioterapia externa com braquiterapia, com ou sem quimioterapia concomitante (LANDONI *et al*, 1997).

Atualmente, há estudos em andamento avaliando a cirurgia menos radical em pacientes com lesões em estadios iniciais. O estudo SHAPE (*Simple Hysterectomy And Pelvic node dissection in Early cervix cancer*) está avaliando a histerectomia simples versus radical em pacientes com tumores do colo do útero menores que 2 cm (NCT01658930). O SHAPE é um ensaio do *Cervix Cancer Research Network* que pode ter aplicação imediata em países com menos recursos.

Um ensaio randomizado de cirurgia versus radioterapia para pacientes com câncer de colo do útero estadios IB1 até IIA não demonstrou diferença de sobrevivência (LANDONI *et al*, 1997). É interessante notar que os pacientes neste estudo não receberam quimioterapia, e 84% dos pacientes no braço cirúrgico com tumores maiores que 4 cm precisaram radioterapia após a cirurgia. A morbidez foi maior nos pacientes que receberam as duas modalidades, e as recomendações atuais são tentar utilizar uma única condição.

Nos casos de estadios IB2 e IIA2 podem ser indicadas a radioterapia pélvica externa com quimioterapia concomitante e braquiterapia (ainda com possibilidade de histerectomia adjuvante) ou a histerectomia radical com linfadenectomia pélvica, com ou sem linfadenectomia para-aórtica (PETERS *et al*, 2000).

Nos casos de doença em estadios IIB, IIIA, IIIB, ou IVA deverá ser considerada avaliação por imagem ou estadiamento cirúrgico que pesquise o envolvimento linfonodal pélvico ou para-aórtico (GOFF *et al*, 1999). O tratamento dessas pacientes se baseia na radioterapia externa com quimioterapia concomitante seguido de braquiterapia (KEYS *et al*, 1999; MORRIS *et al*, 1999, NATIONAL CANCER INSTITUTE, 1999; ROSE *et al*, 1999; WHITNEY *et al*, 1999; PETERS *et al*, 2000; PEARCEY *et al*, 2002; TIERNEY *et al*, 2008; ROSE, 2011). De acordo com os resultados dos exames de imagem ou do estadiamento linfonodal cirúrgico, poderá

haver indicação de radioterapia para-aórtica ou de campo estendido (LUTZ *et al*, 2007).

Em casos de estadio IVB ou com comprovação de metástases à distância o paciente deverá ser avaliado quanto à possibilidade e necessidade de tratamento local. Essa abordagem pode incluir ressecções, radioterapia externa, técnicas ablativas e tratamento sistêmico. Diante da impossibilidade de tratamento local, poderá ser oferecido o tratamento sistêmico ou cuidados paliativos (LUTZ *et al*, 2007).

### **1.6. Radioterapia no câncer do colo do útero**

A radioterapia é utilizada no tratamento de pacientes com câncer do colo do útero como tratamento definitivo para doença localmente avançada ou para pacientes que não sejam candidatos à cirurgia ou como terapia adjuvante após a histerectomia radical nos casos em que há um ou mais fatores de risco (linfonodos positivos, infiltração do paramétrio, margens cirúrgicas positivas, tamanho tumoral, invasão estromal profunda, e invasão linfovascular) (NCCN, 2018).

A radioterapia deve ser direcionada a regiões de envolvimento tumoral conhecido ou suspeito. São duas as modalidades de radioterapia empregadas: a radioterapia externa e a braquiterapia. A radioterapia externa é direcionada para a pelve, podendo ou não envolver a região para-aórtica, enquanto na braquiterapia a abordagem é intracavitária. Durante a radioterapia externa a maioria dos pacientes terá indicação de quimioterapia concomitante com cisplatina (ou carboplatina caso não haja tolerância) ou cisplatina com 5-fluoracil (KEYS *et al*, 1999; MORRIS *et al*, 1999; NATIONAL CANCER INSTITUTE, 1999; ROSE, 2011; WHITNEY *et al*, 1999; PETERS *et al*, 2000; PEARCEY *et al*, 2002; TIERNEY *et al*, 2008). Os melhores resultados são alcançados quando o tratamento se completa em até 8 semanas (FYLES *et al*, 1992).

O volume de radioterapia externa deve cobrir a doença macroscópica, os paramétrios, os ligamentos útero-sacros, margem vaginal a partir da doença macroscópica, os linfonodos pré-sacrais e outros linfonodos em risco. Para pacientes sem suspeita de envolvimento linfonodal durante a cirurgia ou por exame de imagem, a radiação deve incluir as cadeias linfonodais ilíaca externa, ilíaca

interna, obturadora e pré-sacral. Em pacientes com maior risco de acometimento linfonodal, a radiação deverá cobrir também a cadeia ilíaca comum. Em caso de envolvimento confirmado das cadeias ilíaca comum e/ou para-aórtica, está indicada a radioterapia pélvica de campo estendido e para-aórtica até o nível dos vasos renais (ou até nível mais cefálico, na dependência da distribuição do envolvimento linfonodal). Em pacientes com acometimento do terço inferior da vagina, as regiões inguinais bilaterais também devem ser cobertas (NCCN, 2018).

### **1.7. Efeitos adversos da Radioterapia**

O planejamento da radioterapia no câncer do colo do útero deve levar em consideração o impacto em estruturas vizinhas como o reto, a bexiga, o sigmoide, o intestino delgado e os ossos. Os efeitos adversos da radioterapia podem acometer todas essas estruturas e podem ser divididos entre agudos e tardios (EIFEL *et al*, 1995).

Efeitos agudos, tais como diarreia, sintomas miccionais e fadiga ocorrem em algum grau na maioria dos pacientes e são tipicamente amplificados pela quimioterapia concomitante. No entanto, tais manifestações são geralmente administráveis através de medicamentos e suporte clínico, e geralmente se resolvem logo após o término da radioterapia (SMIT & HEYNS, 2010).

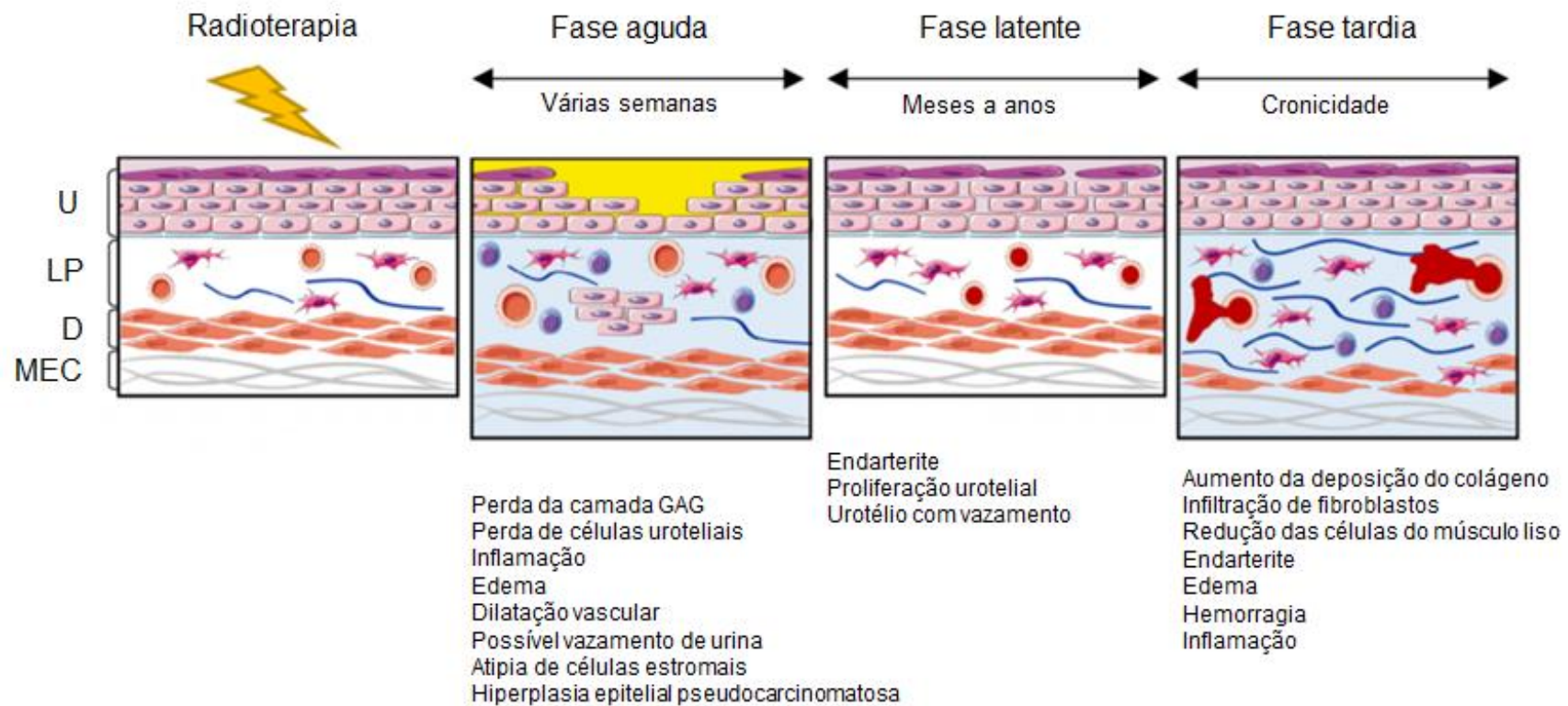
Os efeitos adversos tardios podem incluir lesões na bexiga, reto, intestino delgado e estruturas pélvicas ósseas (EIFEL *et al*, 1995). O risco de desenvolvimento das principais complicações (obstrução, fibrose, necrose e fístula) se relaciona ao volume, à dose total, à dose por fração e à sensibilidade à radiação específica do tecido normal (PEREZ *et al*, 1999; FORREST *et al*, 2010). O bloqueio cuidadoso da exposição de estruturas vizinhas, enquanto se mantém a cobertura tumoral adequada, é fundamental para a obtenção dos melhores resultados. Também é necessário considerar condições próprias do paciente na determinação da dose e do volume de radiação, tais como a presença de doenças inflamatórias intestinais, doenças do colágeno e doenças vasculares, histórico de cirurgias pélvicas ou abdominais múltiplas, histórico de doença inflamatória pélvica e diabetes.

## **1.8. A Cistite Induzida por Radiação**

As diferentes técnicas de radioterapia têm como objetivo, portanto a cobertura do órgão ou tecido alvo, evitando a irradiação de tecidos normais. No entanto, a lesão de órgãos vizinhos parece inevitável (ZWAANS, CHANCELLOR, LAMB, 2016).

Uma vez que a bexiga receba parte da radiação direcionada ao tratamento do câncer do colo do útero ela poderá desenvolver quadro inflamatório típico que configura a cistite induzida por radiação ou cistite actínica. A cistite induzida por radiação pode ser dividida em três fases distintas quanto à cronologia de sua apresentação: (1) uma fase aguda que começa durante o tratamento e se resolve dentro de várias semanas após o término da radioterapia, (2) uma fase latente assintomática dependente da dose que pode durar meses a anos, e (3) uma fase crônica de resposta tardia e irreversível (Figura 1.7).

A fisiopatologia da cistite induzida por radiação é pouco compreendida. Múltiplos mecanismos de dano vesical por radiação foram descritos (Tabela 1.6). Os mecanismos propostos incluem efeitos inflamatórios da radiação ionizante gerando lesão do urotélio, vasculatura e músculo detrusor, com os efeitos sobre o urotélio mais evidentes após quatro meses (MARKS *et al*, 1995).



**Figura 1.7:** Estágios do desenvolvimento da cistite induzida por radiação. A progressão da cistite induzida por radiação consiste em três fases: uma fase aguda inflamatória reversível, uma fase latente assintomática e uma fase tardia inflamatória crônica. Cada fase é caracterizada por mudanças patológicas específicas. U, urotélio; LP, lâmina própria; D, detrusor; MEC, matriz extracelular. Fonte: ZWAANS, CHANCELLOR, LAMB, 2016.

**Tabela 1.6:** Fisiopatologia proposta da cistite induzida por radiação. Fonte: BROWNE *et al*, 2015.

<b>LOCALIZAÇÃO ANATÔMICA NA BEXIGA</b>	<b>EFEITOS DE DANOS INDUZIDOS POR RADIAÇÃO</b>
Urotélio	Irregularidade nuclear Edema celular Aumento de elementos citoplasmáticos Ruptura das junções íntimas e da camada de polissacarídeos
Vasculatura	Edema celular do endotélio vascular Proliferação de células endoteliais Fibrose perivascular
Músculo	Edema do músculo liso Substituição do músculo liso por fibroblastos Aumento da deposição de colágeno Isquemia vascular da parede vesical

O dano tecidual agudo à bexiga é causado primariamente pela lesão à mucosa vesical (urotélio), que contém células que se dividem rapidamente. Isso se dá usualmente durante o tratamento e envolve resposta inflamatória aguda e edema tecidual (DENTON *et al*, 2002).

A cistite aguda induzida pela radiação se manifesta durante ou logo após o tratamento e não costuma permanecer após três meses de concluída a radioterapia. Os sintomas mais comumente apresentados são a disúria, a frequência e a urgência urinárias. A incidência de sintomas agudos entre pacientes recebendo radioterapia pélvica pode variar entre 23 e 80% (MARKS *et al*, 1995).

O mecanismo da lesão tardia, por sua vez, envolve tecidos de renovação lenta, como o vascular e o conjuntivo. Enquanto essas células sustentam o dano da radiação no momento do tratamento, tais efeitos são expressos após as tentativas

de divisão celular, de forma que a cistite tardia pode demorar meses a anos para se desenvolver (SMIT & HEYNS, 2010).

O aspecto mais característico da cistite tardia induzida pela radiação é a endarterite obliterante, que resulta em atrofia tecidual e fibrose. O tecido irradiado é comumente caracterizado pelos três *Hs*: hipovascular, hipocelular e hipóxico. A capacidade de reposição celular e do colágeno fica comprometida pela condição hipóxica, o que leva à lesão tecidual, podendo resultar em ulceração e fístula. A mucosa vesical se torna necrótica e descamativa. O desenvolvimento de telangectasias também pode levar ao sangramento e a fibrose deverá resultar na diminuição da capacidade vesical (MARKS *et al*, 1995).

A incidência exata da cistite tardia induzida pela radiação para tratamento de neoplasias pélvicas é desconhecida. A literatura estima incidência variando entre 5 e 10% (DENTON *et al*, 2002). No entanto, esse valor já foi estimado em pacientes de câncer do colo do útero entre 8 e 12%, com frequência de sequelas moderadas ou graves entre 2 e 6% (MARKS *et al*, 1995). Levenback *et al* relataram uma incidência de 6,5% em 1.784 pacientes com câncer do colo do útero estadiado IB tratados com radiação terapia por um período de 29 anos (LEVENBACK *et al*, 1994). A incidência é ainda maior em pacientes submetidos à radioterapia para câncer de bexiga (GOODMAN *et al*, 1981).

As manifestações clínicas da cistite tardia induzida pela radiação incluem: disúria, frequência e urgência urinárias, (possivelmente relacionadas à redução da capacidade e da complacência vesicais), incontinência urinária (relacionada à disfunção esfinteriana ou à perfuração vesical com formação de fístula ou ainda à perda da capacidade e da complacência vesicais), dor e hematúria. A hematúria é importante sintoma e pode variar de leve e intermitente ou mesmo microscópica até hemorragia muito intensa com a formação de coágulos na luz vesical levando à retenção urinária com dor aguda forte.

Os sintomas da cistite tardia induzida por radiação não são específicos, podendo estar relacionados a outras condições, como infecção, malignidade, ou litíase. Portanto, em caso de sangramento, o diagnóstico é voltado à exclusão de outras causas de hematúria. Além da realização, de acordo com o quadro clínico, de exames laboratoriais e de imagem, a avaliação do trato urinário inferior através de cistoscopia é fundamental. A cistoscopia, além de descartar a progressão da doença

neoplásica, pode evidenciar edema, ulcerações, fístulas, fibrose, redução da capacidade vesical e proliferação vascular em intensidades variáveis. A nova vascularização é tipicamente frágil e sujeita a sangramentos e seu desenvolvimento costuma estar relacionado ao ambiente de hipóxia resultante da radioterapia (STEWART, 1986).

A intensidade da toxicidade tardia da irradiação da bexiga, assim como de inúmeros outros tecidos, pode ser avaliada através de sistemas de pontuação. Possivelmente a primeira tentativa de criação de um sistema de pontuação aceito internacionalmente tenha sido a instituição do método RTOG/EORTC (*Radiation Therapy Oncology Group/European Organisation for Research and Treatment of Cancer*, Tabela 1.7) (DISCHE *et al*, 1989, RTOG FOUNDATION).

**Tabela 1.7:** RTOG/EORTC Sistema de graduação de morbidade tardia pela radiação (bexiga).

0	Grau 1	Grau 2	Grau 3	Grau 4	Grau5
Sem alterações	Atrofia epitelial discreta, telangectasias pequenas (hematúria microscópica)	Moderada frequência, telangectasia generalizada, hematúria macroscópica intermitente	Frequência e disúria graves, telangectasias graves generalizadas, hematúria frequente, redução na capacidade vesical (menor que 150 ml)	Necrose/bexiga contraída (capacidade menor que 100 ml), cistite hemorrágica grave	Morte diretamente relacionada aos efeitos da radiação

Em 1995, um estudo colaborativo entre pesquisadores europeus e americanos propôs um novo sistema de pontuação que viesse a substituir os anteriores (LENT SOMA, 1995). O Sistema LENT/SOMA (*Late Effects Normal Tissue/ Subjective, Objective, Management, Analytic*, Tabela 1.8) foi criado com o objetivo de relatar os efeitos adversos em maiores detalhes e de distinguir entre sintomas, dados analíticos e medidas terapêuticas. No entanto, sua complexidade e o tempo de coleta de suas informações limitam sua aplicabilidade. Já foi



demonstrada boa correlação entre os sistemas RTOG/EORTC e LENT/SOMA para a toxicidade vesical tardia (ANACAK *et al*, 2001).

**Tabela 1.8:** Escala LENT/SOMA para a bexiga. Fonte: LENT SOMA, 1995.

		Grau 1	Grau 2	Grau 3	Grau 4
Subjetivo	Disúria	Ocasional e mínima	Intermitente e tolerável	Persistente e intensa	Refratária e excruciante
	Frequência	Intervalos de 3 a 4 horas	Intervalos de 2 a 3 horas	Intervalos de 1 a 2 horas	Micção a cada hora
	Hematúria	Ocasional	Intermitente	Persistente com coágulos	Refratária
	Incontinência	Menos que semanal	Menos que diária	2 absorventes ou menos ao dia	Refratária
	Jato fraco	Ocasionalmente	Intermitente	Persistente, obstrução incompleta	Obstrução completa
Objetivo	Hematúria	Microscópica, hemoglobina normal	Intermitente macroscópica, < 10% redução hemoglobina	Persistente, macroscópica, 10-20% redução da hemoglobina	Refratária, > 20% redução da hemoglobina
	Endoscopia	Telangiectasia ou atrofia esparsa sem sangramento	Telangiectasia ou atrofia confluyente com sangramento	Ulceração até o músculo	Perfuração, fístula
	Capacidade vesical	Acima de 300 ml	Entre 200 e 300 ml	Entre 100 e 200 ml	100 ml ou menos
	Volume residual	25 ml	Entre 25 e 100 ml	Mais que 100 ml	
	Disúria	Ocasional, sem uso de opioide	Regular, sem uso de opioide	Regular, opioide necessário	Cirurgia
	Frequência	Alcalinização	Antiespasmódico ocasional	Regular, opioide necessário	Cistectomia
	Tratamento	Hematúria	Reposição de ferro	Transfusão ocasional ou cauterização única	Transfusão ou cauterização frequentes
Incontinência		Uso de absorventes ocasionalmente	Uso de absorventes intermitente	Uso regular de absorventes ou auto cateterismo	Cateter permanente
Jato fraco			Cateterização menos que 1 vez ao dia	Dilatação, cateterização mais que 1 vez ao dia	Cateter permanente, intervenção cirúrgica.
Analítico	Cistografia	Avaliação da superfície mucosa			
	Análise volumétrica	Avaliação da capacidade vesical em ml			
	Radiografia contrastada	Avaliação para úlceras, capacidade e contratilidade			
	Ultrassonografia	Avaliação da espessura da parede vesical, formação de fístula e sinus.			
	Eletromiografia	Avaliação da atividade esfinteriana com transdutor intravesical de pressão, pressão de contração e curvas de volume			

Outra escala de graduação de gravidade da toxicidade relacionada ao tratamento do câncer é o CTCAE (*Common Terminology Criteria for Adverse*

Events), proposto pelo *National Cancer Institute*, dos Estados Unidos (Tabela 1.9). No sistema orgânico que relaciona lesões renais e urinárias, constam eventos adversos que não necessariamente estariam relacionados à radioterapia, como a cólica renal. Assim, serão apresentados aqui apenas os eventos adversos listados no CTCAE (versão 4.03, NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2009) que mais provavelmente podem ter relação com a radioterapia.

**Tabela 1.9:** Escala de eventos adversos CTCAE, versão 4.03. Foram selecionados eventos adversos que apresentam maior probabilidade de ocorrerem como complicação urinária da radioterapia. Fonte: NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2009.

Evento adverso	Grau 1	Grau 2	Grau 3	Grau 4	Grau 5
Perfuração vesical	-	Perfuração extra peritoneal, cateter uretral indicado	Perfuração intraperitoneal, intervenção eletiva radiológica, endoscópica ou cirúrgica indicada	Risco de vida, falência orgânica indicação de cirurgia urgente	Morte
<b>Definição: ruptura da parede vesical.</b>					
Espasmo vesical	Intervenção não indicada	Indicação de antiespasmódicos	Indicação de hospitalização	-	-
<b>Definição: contração da parede vesical súbita e involuntária</b>					
Cistite não infecciosa	Hematúria microscópica, mínimo aumento da frequência, urgência, disúria ou nictúria; incontinência nova	Hematúria moderada, aumento moderado da frequência, urgência, disúria, nictúria ou incontinência. Cateter ou irrigação indicada. Impacto moderado na vida diária	Hematúria maciça; transfusão, medicamentos venosos ou indicação de hospitalização; intervenção endoscópica, radiológica ou cirúrgica eletiva indicada	Risco de vida, intervenção radiológica ou cirúrgica urgente indicada	Morte
<b>Definição: inflamação vesical que não é causada por infecção urinária</b>					
Hematúria	Assintomática, indicada observação	Sintomática, cateter ou irrigação vesical indicada, limitação moderada da vida diária	Hematúria maciça; transfusão, medicamentos venosos ou indicação de hospitalização; intervenção endoscópica, radiológica ou cirúrgica eletiva indicada, limitação grave da vida diária	Risco de vida, intervenção radiológica ou cirúrgica urgente indicada	Morte
<b>Definição: comprovação laboratorial da presença de sangue na urina.</b>					
Hemoglobinúria	Assintomática, indicada observação	-	-	-	-
<b>Definição: comprovação laboratorial da presença de hemoglobina livre na urina</b>					
Proteinúria	1+ proteinúria, proteína urinária <1,0 g/24h	Adultos: 2+ proteinúria, proteína urinária 1,0 – 3,4 g/24h	Adultos: proteína urinária >=3,5 g/24h	-	-
<b>Definição: comprovação laboratorial da presença de proteína livre na urina</b>					
Fístula urinária	-	Intervenção não invasiva indicada; cateter uretral ou supra	Limitação importante da vida diária, Intervenção eletiva radiológica, endoscópica ou	Risco de vida, intervenção radiológica ou	Morte

		público indicado.	cirúrgica indicada, derivação permanente indicada	cirúrgica urgente indicada	
<b>Definição: comunicação anormal entre qualquer parte do sistema urinário e outro órgão e região anatômica</b>					
Frequência urinária	Presente	Limitação moderada da vida diária, tratamento medicamentoso indicado	-	-	-
<b>Definição: micção a intervalos curtos</b>					
Incontinência urinária	Ocasional (exemplo: com a tosse, espirro...), <i>pads</i> não indicados	Espontânea, indicação de <i>pads</i> , limitação moderada da vida diária	Intervenção indicada (exemplo: <i>clamp</i> , injeções de colágeno), cirurgia indicada, limitação importante da vida diária	-	-
<b>Definição: incapacidade para controlar o fluxo de urina</b>					
Retenção urinária	Cateterismo uretral supra púbico ou intermitente não indicado; capaz de urinar com algum resíduo	Cateterismo uretral supra púbico ou intermitente não indicado; medicação indicada	Perda ou alteração de função renal ou hidronefrose: intervenção cirúrgica ou radiológica eletiva indicada	Risco de vida, falência orgânica intervenção cirúrgica urgente indicada	Morte
<b>Definição: retenção de urina na bexiga devido à incapacidade de urinar</b>					
Obstrução do trato urinário	Assintomática, indicada observação	Sintomática, sem hidronefrose, sepse ou disfunção renal; dilatação uretral, cateter uretral ou supra púbico indicado	Sintomática com alteração de função: hidronefrose ou insuficiência renal; intervenção eletiva radiológica, endoscópica ou cirúrgica indicada	Risco de vida, intervenção urgente indicada	Morte
<b>Definição: bloqueio do fluxo normal da urina no trato urinário</b>					
Dor no trato urinário	Dor leve	Dor moderada, limitação moderada da vida diária	Dor grave, limitação importante da vida diária	-	-
<b>Definição: sensação de desconforto no trato urinário</b>					
Urgência urinária	Presente	Limitação moderada da vida diária, tratamento medicamentoso indicado	-	-	-
<b>Definição: desejo súbito de urinar difícil de resistir</b>					

## 1.9. Tratamento do sangramento resultante da cistite tardia induzida por radiação

O tratamento do sangramento resultante da cistite tardia induzida por radiação é desafiador (MANIKANDAN, KUMAR, DORAIRAJAN, 2010, PASCOE *et al*, 2018) e engloba várias alternativas terapêuticas de acordo com a gravidade do quadro clínico.

Pacientes apresentando breves episódios isolados de hematúria leve e autolimitada podem ser conduzidos sem qualquer intervenção direta. Diante de sangramentos mais importantes considera-se a internação hospitalar com reposição volêmica e eventualmente transfusão sanguínea. É importante que o paciente não

permaneça com coágulos na luz da bexiga. A cateterização uretral com lavagem vesical e evacuação de coágulos do interior da bexiga por cistoscopia podem ser necessárias. Uma vez que os coágulos sejam removidos, é preciso instalar a irrigação vesical contínua para evitar a formação de novos coágulos (ALESAWI *et al*, 2014).

Diante de sangramento persistente, outras modalidades terapêuticas devem ser empregadas. A administração de agentes antifibrinolíticos como o ácido aminocapróico, pela via oral ou venosa, pode ser importante, mas deve considerar a dose máxima diária para a diminuição do risco de eventos tromboembólicos. A administração do ácido aminocapróico por irrigação vesical também já foi estudada com o objetivo de se evitar os efeitos adversos de seu emprego sistêmico (SINGH & LAUNGANI, 1992).

Outros compostos podem ser utilizados em instilações no interior da bexiga. Já foram estudados os sais de alumínio (ARRIZABALAGA *et al*, 1987), o extrato placentário (MICIC & GENBACEV, 1988) e as prostaglandinas (HEMAL *et al*, 1988), mas apesar de resultados favoráveis, não há evidência suficiente para a recomendação de seu emprego.

A utilização de formalina na luz vesical, por sua vez, deve ser limitada a situações extremas de sangramento refratário. Ainda que em concentrações bastante diluídas, a formalina é bastante tóxica. Altas concentrações tendem a produzir melhores resultados, mas com maior toxicidade. Uma série recente relatou sucesso no tratamento de 75% dos pacientes utilizando concentrações até 4% (LOWE & STAMEY, 1997, ZIEGELMANN *et al*, 2017). O mecanismo de ação da formalina é a precipitação de proteínas celulares levando a efeito de fixação que acarretará a oclusão de pequenos vasos. No entanto, a fixação da musculatura vesical pode resultar na diminuição da capacidade da bexiga e na obstrução ureteral, que por sua vez pode levar à hidronefrose e insuficiência renal. A recomendação de que se utilize a formalina apenas quando descartado o refluxo vesicoureteral (SMIT & HEYNS, 2010) é de difícil emprego prático e na maioria das vezes haverá risco de o agente atingir o trato urinário superior.

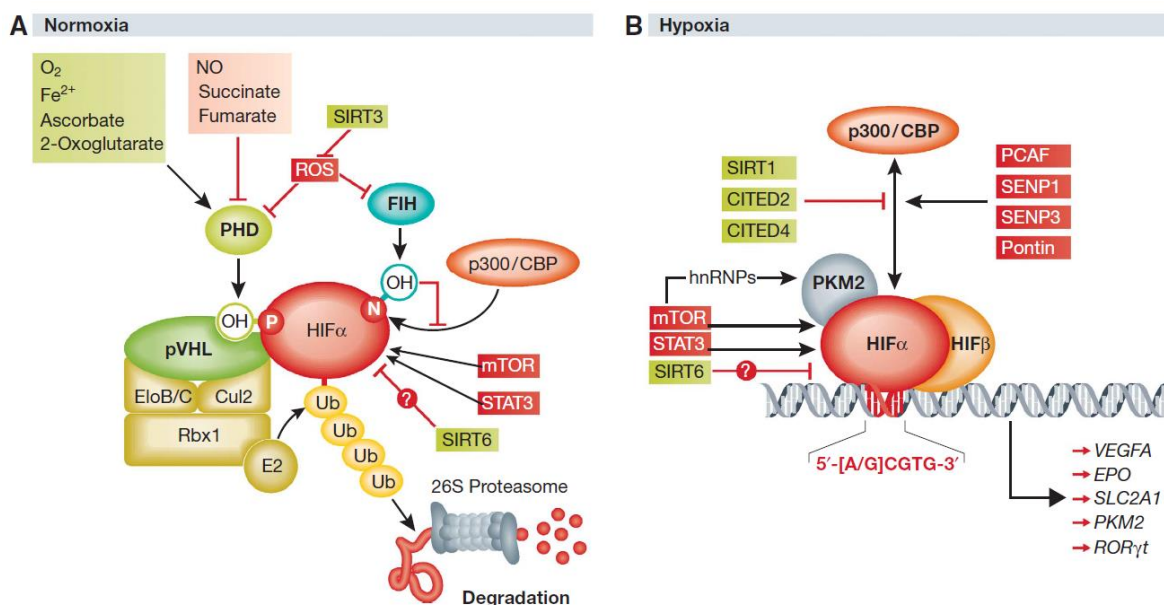
## 1.10. Fator Induzido por Hipóxia e Fator de Crescimento do Endotélio Vascular

O Fator Induzido por Hipóxia (HIF) é um fator de transcrição, formado por subunidades alfa ( $\alpha$ ) e beta ( $\beta$ ), que se associa a cofatores nucleares específicos diante da hipóxia para ativar genes responsáveis por várias respostas adaptativas às baixas tensões de oxigênio (GREER *et al*, 2012). Existem em humanos três genes que codificam isoformas distintas de HIF $\alpha$ : HIF1A que codifica HIF-1 $\alpha$ , EPAS1, que codifica HIF-2 $\alpha$ , e HIF3A que codifica múltiplas variantes de *splicing* de HIF-3 $\alpha$  (MAYNARD *et al*, 2003).

A expressão de HIF-1 $\alpha$  é regulada pela quantidade de oxigênio, havendo rápida degradação dessa proteína na presença de concentrações normais de oxigênio, enquanto que a HIF-1 $\beta$  é expressa constitutivamente.

Diante de tensões normais de oxigênio (normóxia) o HIF-1 $\alpha$  é hidroxilado por enzimas chamadas de prolin-hidroxilases dependentes de ferro (PHDs), ocorrendo a sua ubiquitinação dependente da proteína supressora tumoral von Hippel-Lindau (pVHL). Assim, a ubiquitinação marca a proteína para que ocorra a degradação proteossomal (MAXWELL *et al*, 1999; EPSTEIN *et al*, 2001). Contudo, em condições de hipóxia ou da supressão dos genes VHL, as enzimas PHDs tornam-se inativas, permitindo o acúmulo de HIF-1 $\alpha$  no citoplasma e, conseqüentemente, a sua translocação para o núcleo dimerizando com a subunidade  $\beta$  e sua ligação aos elementos responsivos a hipóxia (ERH) (WENGER *et al*, 2005). No núcleo esse fator de transcrição dimérico regula a expressão de mais de 100 produtos gênicos envolvidos em diferentes vias celulares, como angiogênese, eritropoiese, proliferação celular, metabolismo e apoptose (SEMENZA *et al*, 2014) (Figura 1.8).

Existem diversos inibidores de HIF-1, classificados pelo seu mecanismo de inibição como, por exemplo, inibidores que afetam a ligação do HIF-1 ao DNA, inibidores da transcrição de genes alvos pelo HIF-1, inibidores no nível de proteína HIF-1 $\alpha$ , e inibidores da dimerização do HIF-1. Dentre os inibidores, podemos citar a pVHL um importante antagonista do HIF $\alpha$  com efeitos na estabilização dos níveis proteicos de HIF $\alpha$  e o fator inibidor do HIF (FIH) que também participa da regulação negativa do HIF $\alpha$  hidroxilando no domínio de transativação C-terminal na presença de oxigênio, inibindo as interações entre HIF $\alpha$  e seus cofatores transcripcionais (LANDO, 2002) (Figura 1.8).



**Figura 1.8:** Modelo expandido da via de regulação canônica de HIF $\alpha$ . **A:** Diante de tensões normais de oxigênio, HIF $\alpha$  é submetido à proil hidroxilação dependente de oxigênio pelas enzimas que contém domínio proil-hidroxilase (PHDs), o que permite o reconhecimento e ubiquitinação pela proteína de von Hippel-Lindau (pVHL) e seu complexo ubiquitina-ligase associado. O HIF $\alpha$  poliubiquitinado é degradado pelo proteossoma 26S. A atividade das enzimas PHDs é regulada por fatores nucleares que incluem as espécies reativas de oxigênio (ROS), que são por sua vez moduladas negativamente pela sirtuina 3 (SIRT3). A ligação do fator coativador p300/CBP é inibida pela hidroxilação pelo fator inibidor do HIF (FIH). O HIF $\alpha$  é regulado no nível do RNA mensageiro pelo mTOR e pelo STAT3, enquanto a sirtuina 6 (SIRT6) reduz os níveis proteicos de HIF $\alpha$ . **B:** Diante de baixas tensões de oxigênio o HIF $\alpha$  deixa de ser hidroxilado pelas enzimas PHDs e se associa ao HIF $\beta$ . O heterodímero se liga à promotores de genes responsivos ao HIF e, com a ligação aos coativadores p300/CBP e PKM2 (isoforma M2 da piruvato quinase), inicia sua transcrição. A interação entre HIF $\alpha$  e p300 pode ser regulada por uma variedade de fatores que impedem a ligação ou adicionam ou removem modificações pós-traducionais que influenciam a atividade transcrricional do HIF $\alpha$ . Fonte: GREER, 2012

Apesar de a hipóxia ser o principal estimulador da atividade do HIF, outros fatores podem aumentar seus níveis mesmo em normóxia, tais como: espécies reativas de oxigênio (ROS), íons metálicos e fatores de crescimento. Recentemente foi demonstrado que a ativação de oncogenes ou a perda de genes supressores tumorais também podem cursar com o acúmulo do HIF (LOBODA, JOZKOWICZ, DULAK, 2012).

Como mencionado anteriormente, a radiação aumenta ROS nas células uroteliais, promove apoptose, perda da barreira e inflamação sustentada. Cronicamente, isso resulta em depósitos de colágeno, fibrose tecidual e um ambiente hipóxico na bexiga irradiada. Uma vez que o ambiente tecidual esteja em hipóxia, HIF-1 promove a formação de novos vasos através do aumento da expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (KROCK, 2011).

Em vertebrados, as isoformas VEGFA-D são moléculas amplamente expressas que desempenham papel crucial na formação, função e manutenção dos vasos sanguíneos (SIMONS, 2016).

Entre os receptores com os quais o VEGF se liga estão os receptores tirosina quinase VEGFR1-3 (SIMONS, 2016). A maior parte das informações sugere que a ligação do VEGFA ao VEGFR2 é a responsável pela maior parte dos estímulos angiogênicos observados *in vivo* (KIERAN, 2012).

A ativação do VEGF representa etapa crucial na angiogênese fisiológica (FERRARA, 2003) e a importância da sinalização do VEGF e do VEGFR na neovascularização já foi demonstrada em vários modelos e reforçada pelos níveis significativamente elevados do VEGF em vários tipos tumorais (KIERAN, 2012).

A ativação da via do VEGF regula respostas imediatas como a permeabilidade vascular e respostas tardias que requerem regulação gênica como a sobrevivência, migração e proliferação de células endoteliais (SIMONS, 2016). Atividade bem documentada do VEGF *in vitro* é a habilidade de promover o crescimento de células do endotélio vascular derivadas de artérias, veias e vasos linfáticos. O VEGF induz potente resposta angiogênica e também linfangiogênica em vários modelos *in vivo* (FERRARA, 2003), além de promover o aumento da permeabilidade vascular e induzir a vasodilatação (FERRARA, 2003).

Níveis elevados de VEGF podem levar à formação de uma vasculatura local deficiente, desorganizada e com maior permeabilidade (NIU & CHEN, 2010).

A associação entre o dano induzido pela radiação, incluindo o desenvolvimento de novos vasos submucosos, e a expressão do HIF e do VEGF já foi estudada. Traub *et al* demonstraram que na proctopatia crônica induzida pela radiação há aumento significativo da expressão do RNA mensageiro do HIF1A e do VEGFA (TRAUB *et al*, 2011). A expressão do HIF na bexiga em outras condições,

possivelmente relacionadas à hipóxia também já foi alvo de pesquisas. Lee *et al* avaliaram a presença de hipóxia em bexigas de pacientes com diagnóstico de cistite intersticial através da avaliação da expressão proteica do HIF-1 $\alpha$  e do VEGF (LEE & LEE, 2011). Christianansen *et al* investigaram o papel da hipóxia na fisiopatologia da síndrome da bexiga hiperativa idiopática através da avaliação da expressão do RNA mensageiro de marcadores de angiogênese: HIF1A, HIF2A e VEGFA (CHRISTIAANSEN *et al*, 2011). Koritsiadis *et al* demonstraram o aumento da imunorreatividade ao HIF-1 $\alpha$  no tecido vesical de pacientes com obstrução infra vesical (KORITSIADIS *et al*, 2010). O aumento da expressão proteica do HIF-1-  $\alpha$  e do VEGF também já foi demonstrado no câncer de bexiga (TICKOO *et al*, 2010).

O estudo do papel desempenhado pelo HIF-1 $\alpha$  na fibrose sugere que este fator transcricional pode representar alvo promissor para o desenvolvimento de novos tratamentos para condições como a esclerodermia (XIONG & LIU, 2017).

A possibilidade da inibição do HIF-1 $\alpha$  de maneira seletiva, ou seja, apenas em tecidos hipóxicos, tem sido avaliada na forma de pró-drogas (PHILLIPS, 2016) ou através de carregadores específicos como lipossomos (ZHANG *et al*, 2016). Tais estratégias promoveriam os benefícios da inibição do HIF nos tecidos alvo enquanto minimizariam a potencial toxicidade sistêmica do tratamento.

Foi demonstrado que o inibidor do HIF YC-1 [3-(5'-hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzyl indazole] diminuiu o acúmulo de matriz extracelular na fibrose da doença renal crônica (NAYAK *et al*, 2016)..

A diminuição dos níveis de HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$  intracelulares, além do VEGF circulante através da inibição da via esfingosina quinase pelo FTY720 (Fingolimode) resultou em remodelação ou normalização vascular em modelo animal de câncer de rim (GSTALDER *et al*, 2016).

É necessário observar que o estudo do papel da hipóxia tecidual e da ativação da via do HIF em pacientes submetidos à radioterapia para tratamento do câncer do colo do útero poderá ter seus resultados eventualmente extrapolados para outra complicação importante dessa modalidade terapêutica: a proctopatia induzida pela radiação. A incidência dessa complicação crônica foi avaliada entre 5 e 20% dos pacientes do sexo masculino submetidos à radioterapia para o tratamento do câncer de próstata (KENNEDY & HEISE, 2007; PHAN, 2009).



A magnitude epidemiológica do câncer do colo do útero no Brasil e a importância da radioterapia no tratamento dessa doença fazem das complicações do emprego da radiação ionizante tema obrigatório a ser discutido. O impacto dessas complicações, o número crescente de pacientes que convivem com tais problemas, associados à falta de alternativas eficazes na sua abordagem, tornam necessárias pesquisas que possam fornecer subsídios para o desenvolvimento de novas opções terapêuticas. Conhecimentos em biologia molecular poderiam, portanto, representar fonte de abordagens originais para o sangramento urinário como complicação da radioterapia, resultante do aumento da vascularização submucosa que essas pacientes apresentam.

O mecanismo pelo qual ocorre o aumento de vascularização submucosa na bexiga que apresenta dano induzido pela radiação, e em última instância resulta em hematúria, pode estar, portanto, relacionado ao aumento da expressão do HIF1A e seus alvos transcricionais, incluindo o VEGF. A técnica utilizada para a avaliação da expressão do HIF1A e do VEGFA foi a PCR digital.

A PCR digital em gotas (ddPCR) representa uma evolução das técnicas de PCR, que permite uma quantificação absoluta, altamente sensível de ácidos nucleicos sem a necessidade de curva padrão (HINDSON *et al*, 2011). As amostras são particionadas em 20.000 gotas (contendo zero, uma ou algumas moléculas molde) que, após a amplificação, as gotas contendo a sequência alvo são detectadas por fluorescência e classificadas como positivas e negativas. Cada gota comporta-se como uma reação de PCR independente, e devido às características de segregação randômica dos fragmentos de ácidos nucleicos nas gotas, pode-se utilizar o algoritmo de Poisson para determinar a quantidade absoluta dos ácidos nucleicos. Assim, ao contrário da PCR em tempo real quantitativa, a ddPCR não depende do número de ciclos de amplificação para determinar a quantidade inicial de ácido nucleico em cada amostra e nem da utilização de uma curva padrão (TAYLOR, LAPERRIERE, GERMAIN, 2017).

### **1.11. O impacto epidemiológico das complicações da radioterapia**

A importância das complicações da radioterapia pélvica no Brasil, notadamente a hematúria, ganha magnitude quando se considera o impacto

epidemiológico do câncer do colo do útero regionalmente, e quando se analisa a evolução da distribuição dos diferentes estadios clínicos no momento do diagnóstico e ao se avaliar as alternativas terapêuticas disponíveis, apresentadas anteriormente.

O Rio de Janeiro é historicamente o segundo estado do Brasil em estimativa para o número de casos novos de câncer do colo do útero, ficando atrás apenas do estado de São Paulo (ESTIMATIVA INCA, 2010, 2012, 2014, 2016, 2018), e o INCA é responsável por parcela significativa da assistência às mulheres com diagnóstico dessa neoplasia.

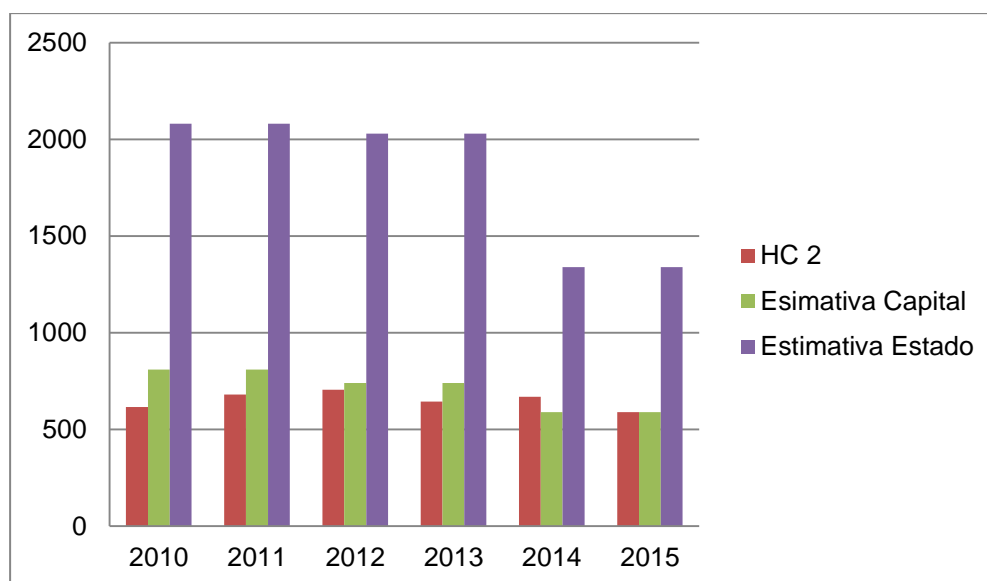
O cruzamento de dados provenientes das estimativas de incidência de câncer no Brasil, elaboradas pelo INCA, e do Registro Hospitalar de Câncer (RHC) do HC II, responsável pelo tratamento do câncer do colo do útero no Instituto, revela em números o papel de destaque da unidade.

Para cada ano do biênio 2010/2011 foram estimados 18.430 novos casos de câncer do colo do útero por ano em todo o Brasil, dos quais 2.080 no estado do Rio de Janeiro. A capital do estado corresponderia com 810 novos casos (ESTIMATIVA INCA, 2010). Foram registradas no HC II em 2010 um total de 616 pacientes com doença invasiva, correspondendo a 76,4% dos casos estimados para a capital e a 29,6% dos casos estimados para todo o estado. Em 2011 foram matriculadas 680 pacientes: 83,9% dos casos estimados para a capital e 32,7% dos casos do estado (RHC, Figura 6.1).

De acordo com as estimativas, para 2012 e 2013 eram esperados no Brasil 17.540 novos casos de câncer do colo do útero por ano. O estado do Rio de Janeiro deveria apresentar 2.030 casos e a capital, 740 (ESTIMATIVA INCA, 2012). No HC II foram matriculadas em 2012 um total de 706 mulheres com doença invasiva, o que corresponde a 34,8% dos casos estimados para o estado e 95,4% do estimado para a capital. No ano de 2013 foram matriculadas 644 pacientes, o que equivale a 31,7% dos casos estimados para o estado e 87% da estimativa para a capital. (RHC, Figura 6.1)

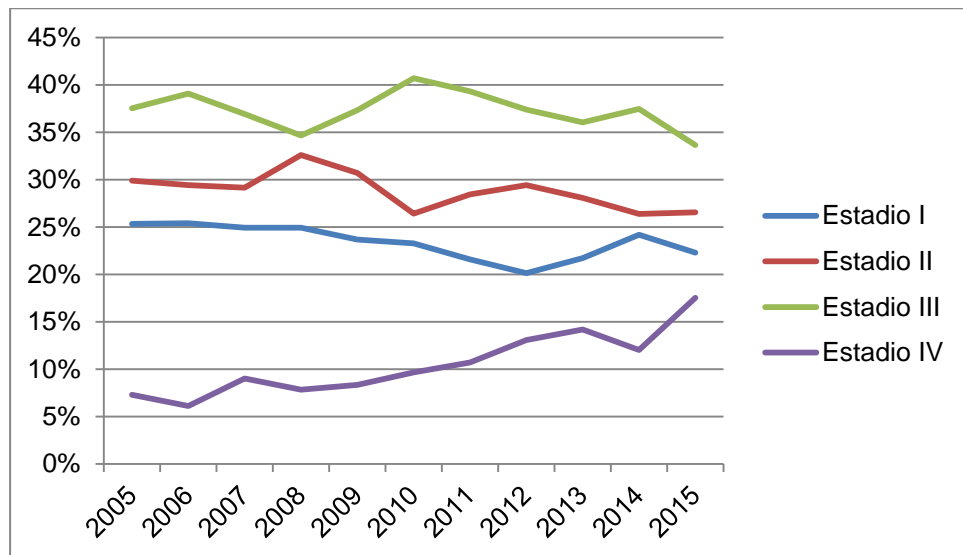
Para o biênio 2014/2015 foram estimados 15.590 casos novos de câncer do colo do útero por ano no Brasil, dos quais 1.340 no estado do Rio de Janeiro. Na cidade do Rio de Janeiro foram estimados 590 casos novos ao ano. (ESTIMATIVA INCA, 2014). Por sua vez, o HC II matriculou no ano de 2014 um total de 669 casos

de câncer do colo do útero invasivo, correspondendo a mais do que toda a estimativa para a cidade do Rio de Janeiro (113,4% desse valor) e a cerca da metade do número de casos novos estimados no estado do Rio de Janeiro (49,9%). Em 2015 foram matriculadas 589 casos de câncer do colo do útero invasivo no HC II, o que corresponde a 99,8% da estimativa para a capital e a 43,9% dos casos estimados para todo o estado. (RHC, Figura 6.1)



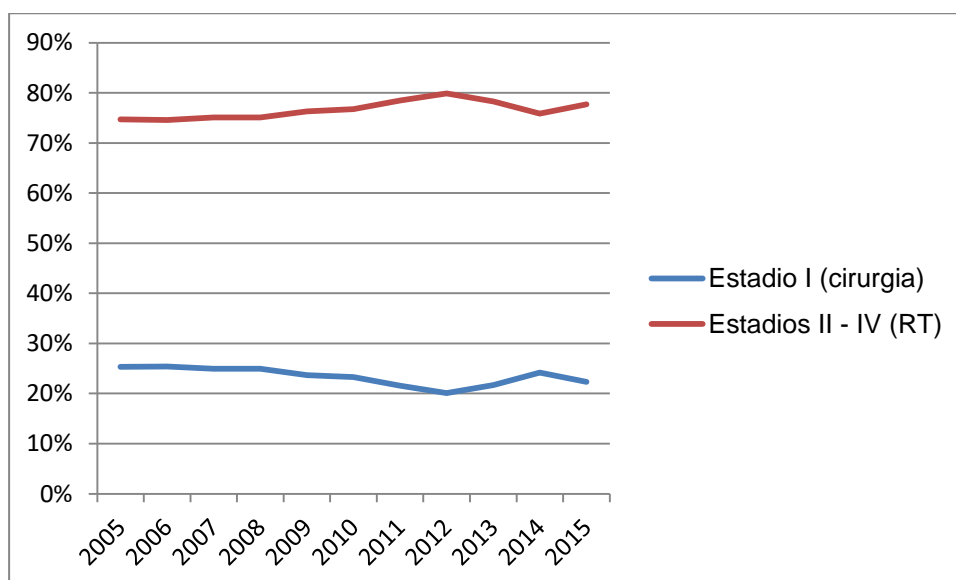
**Figura 1.9:** Número de casos matriculados no HC II em comparação com a estimativa para a cidade e para o estado do Rio de Janeiro, 2010-2015. Fontes: ESTIMATIVA INCA, 2010, 2012, 2014, RHC HC II.

Apesar do pioneirismo do Brasil na utilização do exame citopatológico para o rastreamento do câncer do colo do útero (THULER, 2008), e da existência de recomendações e diretrizes voltadas para os profissionais de saúde, ainda não se atingiu o controle dessa doença. A distribuição das pacientes portadoras de câncer do colo do útero de acordo com o estadiamento clínico no momento da matrícula no INCA revela que não há perspectiva de redução do número de mulheres irradiadas. A proporção das matrículas entre 2005 e 2015, revela que os estadios mais avançados têm aumentado em frequência. Em 2005, no momento da matrícula, 7% das pacientes apresentavam doença em estágio IV, enquanto em 2015 a proporção de mulheres com o estadio mais avançado da doença foi de 18% (Figura 6.2).

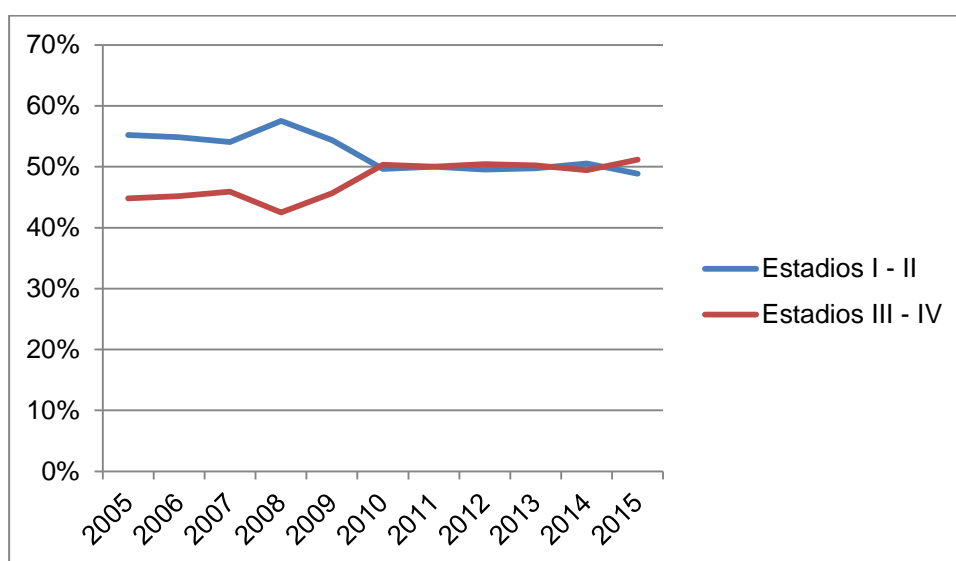


**Figura 1.10:** Distribuição das frequências dos casos de câncer do colo do útero no HC II segundo estadiamento clínico de apresentação, 2005-2015, desconsiderando casos não estadiados. Fonte: RHC.

Em um período de dez anos, esperava-se que houvesse progressiva redução da proporção de estádios mais avançados e aumento dos casos iniciais. No entanto, ao compararmos as curvas de frequência do estadio I (mais precoce e de manejo essencialmente cirúrgico), com o somatório dos demais estádios, percebe-se o afastamento das curvas (Figura 6.3). Na comparação entre o somatório dos estádios I e II com o somatório dos estádios III e IV, nota-se que as curvas se encontraram e que em 2015 os casos mais avançados superaram os mais precoces pela primeira vez em 10 anos (Figura 6.4).

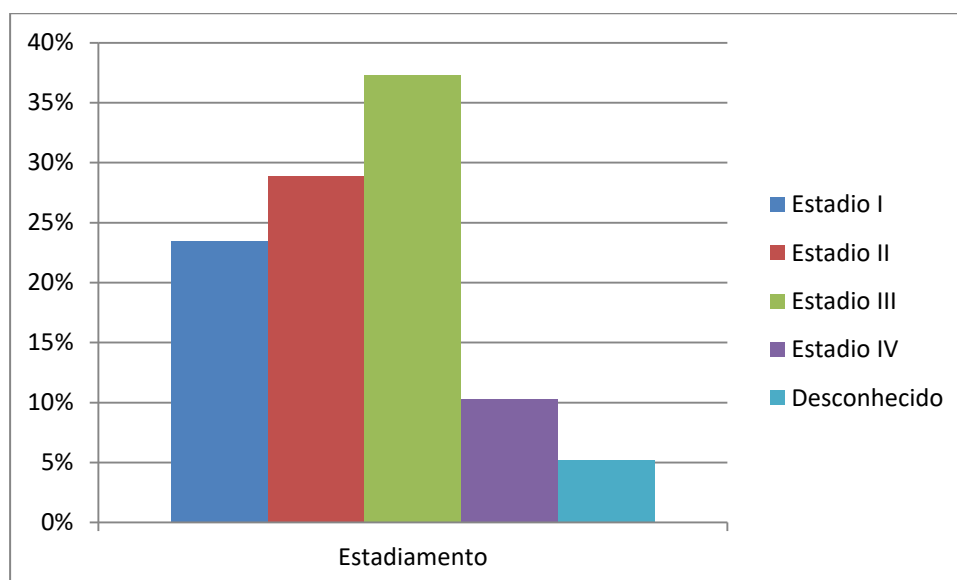


**Figura 1.11:** Estadio I vs. somatório dos demais estádios no HC II, no momento da matrícula, 2005-2015, desconsiderando os casos não estadiados. Fonte: RHC.



**Figura 1.12:** Estadiamento precoce (I – II) x tardio (III – IV) no momento da matrícula no HC II, 2005-2015, desconsiderando casos não estadiados. Fonte: RHC.

A avaliação do total de casos de câncer do colo do útero matriculados no HC II no período de 2005 a 2015 revela importante predomínio do estádio III (Figura 6.5), o mesmo padrão prevalente em países de baixo IDH (ANOLUE *et al*, 2014; THULER *et al*, 2014; KUMARI *et al*, 2018).



**Figura 1.13:** Distribuição das matrículas por câncer do colo do útero no HC II segundo o estadiamento clínico no período de 2005 a 2015. Fonte: RHC.

### 1.12. A qualidade de vida do sobrevivente de câncer

O interesse pela qualidade de vida do paciente no seguimento após o tratamento do câncer e o estudo das complicações crônicas do tratamento pela radioterapia se inserem em um contexto que recebe atenção crescente na literatura médica e em discussões de bioética.

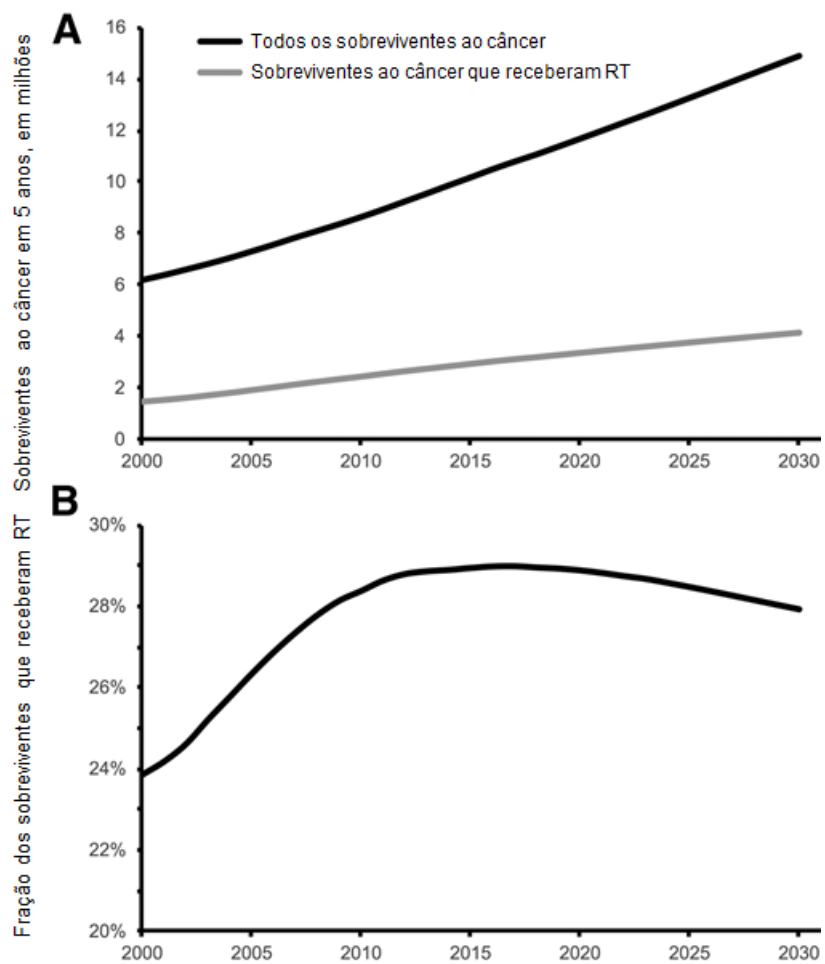
O debate sobre a sobrevivência ao câncer teve início em meados da década de 1980 a partir do artigo “*Seasons of Survival, Reflections of a Physician with Cancer*”, de Fitzhugh Mullan, (MULLAN, 1985) e da fundação em 1986 da *National Coalition for Cancer Survivorship* (NCCS, Coalizão Nacional para a Sobrevivência ao Câncer, em tradução livre) uma associação que trabalha para mudar o léxico social de “vítima de câncer” para “sobrevivente de câncer”, além de proporcionar uma noção diferente da experiência do câncer (NCCS). A NCCS define o sobrevivente de câncer como *quem vive com, através e além de um diagnóstico de câncer*.

Nos EUA o número de pessoas vivendo com câncer ou que já tiveram câncer aumentou de 3 milhões em 1971 para mais de 15,5 milhões em 2016, correspondendo hoje a cerca de 5% da população do país. Calcula-se que em 2026 esse número possa chegar a 20,3 milhões de pessoas (MILLER *et al*, 2016). Esse aumento tem implicações óbvias para o sistema de saúde. As preocupações

médicas e psicológicas dos sobreviventes incluem o efeito do câncer e seu tratamento na qualidade de vida, interessando o bem estar físico, psicológico, social e espiritual (FERRELL *et al*, 1995; HEWITT, GREENFIELD, STOVALL, 2005).

Uma vez que a radioterapia exerce papel central no tratamento do paciente com câncer e que maior parte de sua toxicidade se manifesta anos após sua administração, reduzir seus efeitos adversos tardios é fundamental (BRYANT *et al*, 2017).

A necessidade de se buscar alternativas direcionadas à melhoria da qualidade de vida do paciente sobrevivente de câncer que foi submetido à radioterapia parece ser uma realidade inescapável. Estima-se que nos EUA em 2016, entre os 10,5 milhões de sobreviventes de câncer em 5 anos, 3,05 milhões de pacientes receberam radioterapia. O número de sobreviventes tratados com radioterapia é projetado para alcançar 3,38 milhões em 2020 e 4,17 milhões em 2030. A fração de todos os sobreviventes de câncer que receberam radiação aumentou de 24% em 2000 para um máximo previsto de 29% em 2020 (Figura 6.6). Após 2020, a fração de sobreviventes tratados com radiação está projetada para diminuir ligeiramente para 28% até 2030. (BRYANT *et al*, 2017).



**Figura 1.14:** Número e porcentagem de sobreviventes de câncer em 5 anos entre 2000 e 2030. A: Número total de sobreviventes em 5 anos e que receberam radioterapia. B: Proporção dos sobreviventes que receberam radioterapia (RT).  
 Fonte: BRYANT *et al*, 2017



## **2. Justificativa**

Esse estudo tem como objetivo comparar a expressão do HIF1A e do VEGFA em amostras vesicais obtidas de pacientes que tiveram o diagnóstico de câncer do colo do útero e que foram submetidas à radioterapia. O rastreamento do câncer do colo do útero ainda não foi capaz de controlar o impacto epidemiológico da doença no Brasil, de forma que predominam estádios avançados em sua apresentação clínica. É grande, portanto, o número de mulheres submetidas à radioterapia pélvica como tratamento do câncer do colo do útero no país. Em virtude deste elevado volume de pacientes e da frequência significativa de efeitos adversos dessa modalidade terapêutica, há considerável parcela das pacientes que sobreviveram à neoplasia convivendo com complicações crônicas de seu tratamento.

A radioterapia estabelece hipóxia tecidual e assim proporciona o desenvolvimento de neovascularização submucosa vesical que pode sangrar, resultando em graus variados de hematúria. A hematúria é importante complicação crônica do tratamento com radioterapia pélvica e sua abordagem é desafiadora. A pesquisa da expressão do HIF e do VEGF em amostras vesicais de pacientes irradiadas ganha relevância em face da disponibilidade de medicamentos com alvos moleculares relacionados à via do HIF e à angiogênese. Espera-se que esse estudo forneça subsídios e possibilite o direcionamento de esforços de pesquisa que tenham como objetivo o desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas para as complicações da radioterapia pélvica.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo primário**

Comparar a expressão do HIF1A e do VEGFA em amostras vesicais de pacientes submetidas à radioterapia como tratamento do câncer do colo do útero *versus* pacientes virgens de tratamento.

#### **3.2. Objetivos secundários**

Relacionar a expressão do HIF1A e do VEGFA com os achados endoscópicos encontrados, de acordo com o sistema RTOG/EORTC.

Avaliar a viabilidade do lavado vesical como amostra para expressão do HIF1A e do VEGFA comparando os valores obtidos em biópsias vesicais com os obtidos através de lavado.

Avaliar as características da radioterapia recebida pelas participantes do estudo.

Avaliar a morbidade tardia da radioterapia para tratamento do câncer do colo do útero segundo as escalas RTOG/EORTC, LENT/SOMA e CTCAE (versão 4.03), bem como segundo a associação com a proctopatia actínica e com alterações ao exame do sedimento urinário.

Avaliar as alterações histopatológicas das amostras vesicais apresentadas pelas participantes do estudo submetidas à radioterapia para tratamento do câncer do colo do útero.

## **4. Metodologia**

### **4.1. Desenho do estudo e financiamento**

Trata-se de um estudo caso-controle avaliando a expressão do HIF1A e do VEGFA em fragmento de tecido coletado por biópsia vesical endoscópica comparando-se as pacientes submetidas à radioterapia pélvica para tratamento do câncer do colo do útero com pacientes sem radiação pélvica prévia. O estudo foi realizado em uma única instituição, o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), no Hospital do Câncer II (HCII).

Os recursos para a realização do estudo foram provenientes de saldo da Divisão de Pesquisa Clínica e Desenvolvimento Tecnológico do INCA.

### **4.2. Cálculo amostral**

A amostra foi estimada baseada em dados de expressão de HIF1A e VEGFA já publicados em amostras de pacientes com proctopatia crônica induzida por radioterapia. Foi prevista a inclusão de pelo menos 18 casos (histórico de radioterapia pélvica como tratamento do câncer do colo do útero) e 9 controles (histórico de câncer do colo do útero virgens de tratamento) com um poder de 90% e um nível de significância de 0.05. Devido eventuais perdas no manejo da amostra, foi proposto incluir 20% a mais da amostra calculada.

### **4.3. Considerações éticas**

O protocolo final e o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) específico do estudo estão registrados no número CAAE 37818114.8.0000.5274 e foram revistos e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do INCA (CEP - INCA) em 16 de novembro de 2014 – ANEXO 1.

As pacientes elegíveis só foram incluídas após o fornecimento do TCLE específico para o estudo (ANEXOS 2 e 3) por escrito, além do TCLE do Banco Nacional de Tumores (BNT) INCA. A paciente capacitada a fornecer o consentimento, indicou a sua autorização lendo, esclarecendo as dúvidas, rubricando todas as páginas, assinando e datando os TCLEs. Os TCLEs foram

obtidos antes da realização de qualquer procedimento específico do estudo. O processo de obtenção dos TCLEs foi documentado no documento fonte (prontuário) da paciente.

#### **4.4. Critérios de elegibilidade**

Os critérios de elegibilidade a seguir foram definidos, para selecionar as pacientes para as quais o protocolo era considerado adequado. Todos os problemas médicos e não médicos relevantes foram levados em consideração para a decisão sobre a adequação de cada paciente em participar do estudo.

##### **4.4.1. Critérios de Inclusão**

- Pacientes que assinaram o TCLE
- Idade > 18 anos.
- Desempenho na escala *Eastern Cooperative Oncology Group* (ECOG) *performance status* (PS) de 0, 1, ou 2.
- Casos: pacientes tratadas para o câncer do colo do útero, submetidas à radioterapia externa no INCA no período de agosto de 2010 a junho de 2016.
- Casos: Intervalo entre o término da radioterapia externa e a cistoscopia não inferior a 18 meses.

Controles: pacientes com diagnóstico de câncer do colo do útero virgens de tratamento, cujo estadiamento clínico não fosse mais avançado que IIIA.

- Histologia de carcinoma de células escamosas ou adenocarcinoma.
- Função orgânica adequada.
- Prontuário disponível para coleta de dados (características clínicas, detalhes do tratamento).

##### **4.4.2. Critérios de Exclusão**

- Pacientes com distúrbio da coagulação sanguínea, hematúria macroscópica ativa ou infecção urinária ativa conforme demonstração clínica ou em exames laboratoriais.
- Pacientes com histologias diferentes das mencionadas nos critérios de inclusão.
- Problema médico ou psiquiátrico grave, agudo ou crônico
- Mulheres grávidas ou que estivessem amamentando.

#### **4.5. Coleta de dados/procedimentos do estudo**

A convocação das pacientes para a participação no estudo foi diferente entre os grupos irradiado e controle.

As pacientes do grupo irradiado foram convocadas mediante uma de duas formas possíveis. Uma forma de convocação foi através de levantamento em arquivo das pacientes submetidas à radioterapia no INCA por câncer do colo do útero no período anterior à convocação que correspondesse ao intervalo mínimo determinado nos critérios de inclusão.

A partir das listagens do arquivo da radioterapia, as pacientes foram contatadas por telefone para se apresentarem ao hospital. Na primeira consulta realizada foi apresentado o projeto de pesquisa e, àquelas que tinham interesse em participar, o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). As pacientes leram o TCLE, tiveram todas as suas dúvidas sanadas e o assinaram. Nesse momento também foram solicitados os exames laboratoriais necessários, coletados os demais dados demográficos e dados clínicos relevantes, o tipo histológico, estadiamento e dose de radiação empregada e programada a realização da cistoscopia.

Outra forma de convocação das pacientes irradiadas se deu quando do comparecimento da paciente em virtude de exame já previamente agendado, na maior parte das vezes tendo a hematúria intermitente como indicação. Antes da realização do exame era apresentado o projeto de pesquisa e, àquelas que tinham interesse em participar, o TCLE. As pacientes tinham tempo suficiente para ler o TCLE, tiveram todas as suas dúvidas sanadas e o assinaram. Caso a paciente já apresentasse os exames necessários à inclusão no estudo, eram coletados os demais dados demográficos e dados clínicos relevantes, o tipo histológico, estadiamento e dose de radiação empregada e o exame era então realizado. Caso fossem necessários exames laboratoriais, estes eram solicitados e a cistoscopia programada.

A convocação das pacientes do grupo controle se deu através da revisão de matrículas recentes de pacientes com diagnóstico de câncer do colo do útero. Era realizada busca em arquivo médico e feito contato telefônico. Da mesma forma que aconteceu com o grupo irradiado, as pacientes eram convidadas a comparecer ao hospital, era apresentado o projeto de pesquisa e, àquelas que concordavam com a

participação na pesquisa, o TCLE. As pacientes tinham tempo suficiente para ler o TCLE, tiveram todas as suas dúvidas sanadas e o assinaram. Caso a paciente já apresentasse os exames necessários à inclusão no estudo, eram coletados os demais dados demográficos e dados clínicos relevantes, o tipo histológico, estadiamento e dose de radiação empregada e o exame era então realizado. Caso fossem necessários os exames laboratoriais, estes eram solicitados e a cistoscopia programada.

Para os casos, com relação aos eventos adversos tardios clínicos e laboratoriais relacionados à radioterapia pélvica, as pacientes foram avaliadas segundo o sistema CTCAE, versão 4.03 (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2009). Cada paciente foi então examinada endoscopicamente através de cistoscopia. Durante a avaliação endoscópica a classificação da cistite actínica de acordo com o sistema RTOG/EORTC (DISCHE *et al*, 1989) foi a empregada uma vez que esse sistema, apesar de menos detalhado e preciso que o anterior, possibilita avaliação mais adequada quanto à presença de neovascularização actínica. Também foi realizada a avaliação de acordo com o sistema LENT/SOMA (LENT SOMA, 1995).

O exame de cistoscopia foi realizado com a paciente em posição de litotomia, sob sedação ou não, utilizando-se camisa de cistoscopia de calibre 20 Fr, com ótica de espessura de 5 mm e angulação de 30 graus. Uma vez avaliadas as paredes vesicais e descartada eventual progressão de doença nas pacientes irradiadas ou invasão vesical no grupo controle, foram coletados dois fragmentos de biópsia por pinça específica. Nas pacientes do grupo controle em que foi coletado o lavado vesical (n = 8) isso foi realizado antes da realização da biópsia, após barbotagem com o próprio soro fisiológico de infusão. De forma geral, nas pacientes irradiadas as biópsias eram realizadas preferencialmente na parede vesical posterior, devido à proximidade anatômica com o colo do útero e à sua condição extra peritoneal. Nas pacientes previamente irradiadas a coleta da amostra evitou regiões de vascularização mais exuberante.

Por fim, para os casos e os controles, foi acondicionado um fragmento de tecido em criotubo contendo RNAlater® de acordo com as recomendações do fabricante e com os protocolos aprovados pela instituição (ANEXO 1) para avaliação da expressão do HIF1A e do VEGFA que foi armazenado no BNT até a coleta de todas as amostras e um segundo fragmento foi depositado em formol e enviado à

Divisão de Patologia do INCA para análise histopatológica. Os lavados vesicais foram prontamente resfriados a 4°C e enviados para o processamento imediato no laboratório de pesquisa clínica.

#### **4.6. Quantificação da expressão do HIF1A e do VEGFA**

##### **4.6.1. Extração de RNA e síntese de cDNA**

A extração de RNA das amostras das pacientes pelo RNeasy Mini Kit (QIAGEN) foi realizada seguindo as recomendações do fabricante com pequenas modificações. As amostras de biópsia de bexiga foram submetidas ao processo de trituração utilizando triturador de tecidos em tampão de lise com adição de DTT (dithiothreitol) 2 M (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA). Após a completa fragmentação da amostra realizou-se os procedimentos utilizando as colunas de extração. As amostras contendo RNA foram diluídas duas vezes em um volume final de 30 µL com água livre de RNases. As amostras de RNA foram quantificadas utilizando espectrofotômetro Nanodrop-modelo ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA) e posteriormente armazenadas a - 80°C para a síntese de DNA complementar (cDNA).

Para síntese de cDNA utilizou-se o kit SuperScript™ II RT (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Sucintamente, adicionou-se 2 µl de Randon Primer (Invitrogen, MD, EUA) em 10 µl da amostra do RNA previamente extraído, com posterior aquecimento a 70°C por 10 minutos, seguido de repouso por 5 minutos para resfriamento. Adicionou-se 8 µl da solução Mix contendo 4 µl de tampão 5x; 1 µl de DTT; 1 µl de desoxirribonucleotídeos fosfatados (DNTP) 10 mM; 0,5 µl de Super Script; 0,5 µl de inibidor de RNase (Invitrogen, MD, EUA) e 1µl de água dietilpirocarbonato (DEPC) em cada amostra e o ensaio de transcriptase reversa foi realizado em termociclador Veriti (Applied Biosystems, CA, EUA).

##### **4.6.2. PCR digital em gotas (ddPCR)**

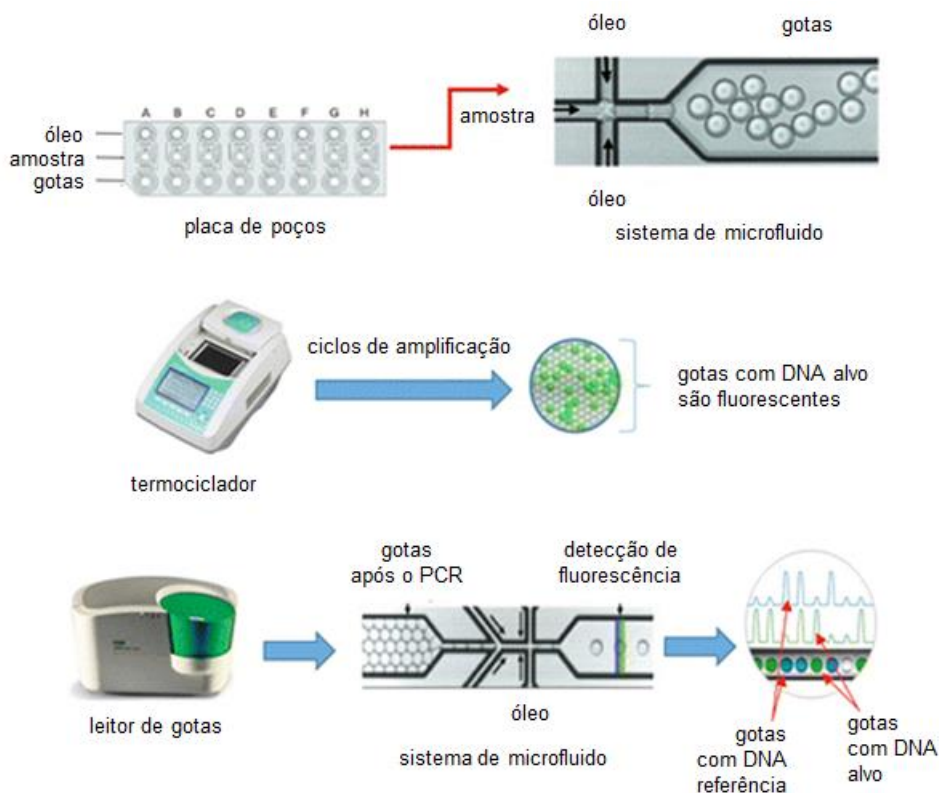
Inicialmente, realizou-se o preparo do mix para a reação da PCR, contendo a amostra, 2x ddPCR™ Supermix for Probes no UTP (Bio-rad, Hercules, CA), primers e as seguintes sondas: ddPCR GEX HEX Assay GAPDH #10031255 (Assay ID: dHsaCPE5031597) (Bio-rad), ddPCR GEX FAM Assay HIF1A1A #10031252 (Assay ID: dHsaCPE5033624) (Bio-rad) e ddPCR GEX FAM

Assay VEGFA #10031252 (Assay ID: dHsaCPE5034756) (Bio-rad). Posteriormente o mix foi transferido para o QX-100 droplet generator (gerador de gotas) (Bio-rad, Hercules, CA), equipamento responsável por particionar a reação em 20.000 gotas (mistura água-óleo), de acordo com as instruções do fabricante. O conteúdo, então, foi transferido para uma placa de 96 poços e selada utilizando o equipamento PX1 PCR plate sealer (Bio-rad, Hercules, CA). Realizou-se PCR convencional seguindo as recomendações do fabricante (Tabela 4.1) e em seguida as placas foram analisadas no QX100 droplet reader (Bio-rad, Hercules, CA). Foram realizadas leituras em cada poço para determinar a quantidade de eventos positivos e os resultados foram mostrados na forma de dot-plots utilizando o software QuantaSoft (Bio-rad, Hercules, CA) (Figura 4.1).

**Tabela 4.1:** Recomendações técnicas do fabricante para a realização do PCR.

Passo	Temperatura	Tempo	Ciclos
Ativação da enzima	95°C	10min	1 ciclo
Desnaturação	94°C	30seg	40 ciclos
Anelamento/extensão	60°C	1:10 min	
	98°C	10min	1 ciclo
	4°C	∞	1 ciclo





**Figura 4.1:** PCR digital em gotas. O sistema mistura amostras e óleo em uma placa contendo poços e gera gotas de nanolitro por um sistema de microfluído e geração de vácuo. A emulsão é transferida para o termociclador para amplificação. A presença do DNA alvo nas gotas é detectada pela geração de fluorescência no leitor de gotas. O sistema separa e alinha cada gota, que é analisada por dois laser para detectar fluorescência. Fonte: D'AVERSA, 2018.

#### 4.7. Armazenamento e análise estatística dos dados

Os dados obtidos foram armazenados, inseridos em um banco de dados e analisados de forma anônima não havendo possibilidade da identificação das pacientes. As análises estatísticas desse estudo foram realizadas através do programa GraphPadPrism v.5 para Windows (versão 5.00.288). Para investigar diferenças na expressão de HIF1A e VEGFA nos tecidos irradiados versus os tecidos considerados normais e sua relação com a presença de cistite actínica clinicamente graduada foi realizado o teste t de Student utilizando os resultados das medianas. Um  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

## 5. Resultados

### 5.1. Características gerais das pacientes

Entre fevereiro de 2015 e julho de 2018 foram incluídas 26 pacientes no estudo da avaliação da expressão do HIF1A e do VEGFA em amostras vesicais. Foram incluídas 14 pacientes previamente irradiadas e 12 pacientes como grupo controle.

As características gerais das pacientes estão na tabela 5.1. A mediana de idade foi de 48 anos no grupo irradiado (31-66) e 44,5 anos no grupo controle (39-66). Com relação à cor da pele/raça, no grupo irradiado 7 pacientes eram brancas (50%), 6 eram pardas (42,9%) e uma paciente era negra (7,1%). No grupo controle, 4 pacientes (33,3%) eram brancas, 5 pardas (41,7%) e 3 (25%) negras. No grupo de pacientes irradiadas, 12 possuíam diagnóstico de carcinoma e células escamosas (87,5%) e 1 paciente possuía diagnóstico de adenocarcinoma (14,3%). No grupo controle, 11 pacientes (91,7%) apresentavam carcinoma de células escamosas e 1 paciente (8,3%) apresentava diagnóstico de adenocarcinoma. Treze pacientes do grupo irradiado apresentavam grau de diferenciação nuclear II (92,9%) e uma paciente apresentava grau III (7,1%). No grupo controle, uma paciente apresentava grau I (8,3%), 7 pacientes exibiam grau II (58,3%) e 3 pacientes (25%) exibiam grau III de diferenciação nuclear. Uma paciente no grupo controle não teve o grau de diferenciação nuclear informado. Entre as pacientes previamente irradiadas, 2 possuíam estadiamento FIGO IB1 (14,3%), uma paciente apresentava estadiamento IB2 (7,1%), uma paciente exibia estadiamento IIA (7,1%), 9 pacientes apresentavam estadiamento IIB (64,3%) e uma paciente apresentava estadiamento IIIB (7,1%). Entre as pacientes do grupo controle foi incluída uma paciente com estadiamento IB1 (8,3%), uma paciente IB2 (8,3%), uma paciente IIA (8,3%), 8 pacientes (66,7%) IIB e uma paciente IIIA (8,3%).

É preciso salientar que, apesar da inclusão de parte pacientes no estudo ter ocorrido antes da atualização do estadiamento do câncer do colo do útero pela FIGO, as alterações de 2018 não alteraram os estadios das pacientes. Dessa forma, a referência utilizada neste estudo é a mais atual.

**Tabela 5.1:** Características gerais das pacientes.

		Irradiadas - n (%)	Controle - n (%)
<b>Idade em anos (mediana)</b>		48	44,5
<b>Cor/raça</b>	parda	6 (42,9)	5 (41,7)
	branca	7 (50,0)	4 (33,3)
	negra	1 (7,1)	3 (25,0)
<b>Diagnóstico anatomopatológico</b>	carcinoma escamocelular	12 (85,7)	11 (91,7)
	adenocarcinoma	2 (14,3)	1 (8,3)
<b>Grau nuclear</b>	I	0	1 (8,3)
	II	13 (92,9)	7 (58,3)
	III	1 (7,1)	3 (25)
	não informado	0	1 (8,3)
<b>Estadiamento</b>	IB1	2 (14,3)	1 (8,3)
	IB2	1 (7,1)	1 (8,3)
	IIA	1 (7,1)	1 (8,3)
	IIB	9 (64,3)	8 (66,7)
	IIIA	0	1 (8,3)
	IIIB	1 (7,1)	0
<b>Total:</b>		14	12

## 5.2. As características do tratamento por radioterapia

As características relacionadas ao tratamento das pacientes irradiadas encontram-se na tabela 5.2. Entre as 14 pacientes do grupo previamente submetido à radioterapia, 10 foram submetidas à radioterapia externa no Hospital do Câncer I (HC I) e 4 pacientes no HC II.

Onze pacientes receberam a radioterapia em acelerador linear, enquanto duas receberam cobaltoterapia. Uma paciente recebeu parte de seu tratamento em acelerador linear e parte em cobalto. Quatro das pacientes receberam a radioterapia em duas dimensões, e 9 pacientes em 3 dimensões.

A dose de radioterapia externa empregada em 12 casos foi de 4500 cGy, enquanto duas pacientes receberam 5040 cGy. Treze pacientes realizaram a radioterapia externa em 25 sessões e uma paciente em 28 sessões. Todas as pacientes incluídas foram submetidas à braquiterapia: dez no Hospital do Câncer I, duas no Hospital Mário Kroeff e duas no Hospital do Câncer III. Onze pacientes receberam dose de 2400 cGy na braquiterapia e duas receberam 2800 cGy. A dose total de radioterapia empregada, somando as dosagens de radioterapia externa e braquiterapia, variou entre 6900 e 7840 cGy, com média de 7044 cGy. Uma das pacientes submetidas à braquiterapia no Hospital Mário Kroeff não apresentava relatório de tratamento, não sendo possível determinar a dose recebida na modalidade e a dose total da radioterapia empregada.

A dose de radioterapia externa que atingiu a bexiga, calculada nos casos em que foi utilizada a técnica conformacional em três dimensões (Tabela 5.3), não atingiu o valor máximo restritivo de 6500 cGy (MARKS *et al*, 2010). Não foi possível calcular a dose vesical resultante da braquiterapia, pois a técnica empregada foi em duas dimensões em todos os casos. Ainda assim, não se presume que tal valor tenha sido alcançado. Não obstante, foi encontrada toxicidade tardia RTOG/EORTC grau 3 em uma paciente tratada pela modalidade conformacional em acelerador linear (Paciente 108: Tabela 5.2, Tabela 5.3 e Figura 5.3, coluna C).

O intervalo entre o término da radioterapia externa e a realização da cistoscopia com biópsia variou entre 19 e 69 meses, com média de 46 meses.

**Tabela 5.2:** Características da radioterapia empregada.

Paciente	Radioterapia Externa				Braquiterapia				Dose Total <sup>d</sup>	Cirurgia
	Lugar <sup>a</sup>	Aparelho <sup>b</sup>	Técnica <sup>c</sup>	Dose <sup>d</sup>	t <sup>e</sup>	BT <sup>f</sup>	Ciclos	Dose <sup>d</sup>		
101	HC I	AL	2D	4500	51	HC I	3	2400	6900	HTA II
102	HC I	cobalto	3D	4500	49	HM K	-	-	-	
103	HC I	AL	2D	4500	49	HC I	3	2400	6900	
104	HC I	AL	2D	4500	49	HC III	3	2400	6900	
105	HC I	AL	3D	4500	54	HC I	3	2400	6900	
106	HC I	AL	3D	4500	54	HC I	4	2400	6900	HTA III + SOB
107	HC II	AL	3D	4500	49	HM K	4	2800	7300	
108	HC II	AL	3D	4500	19	HC I	3	2400	6900	
109	HC II	AL/cobalto	2D	5040	52	HC I	3	2400	7440	
110	HC I	AL	3D	5040	49	HC III	4	2800	7840	HTA III
111	HC I	AL	3D	4500	40	HC I	3	2400	6900	
112	HC I	AL	3D	4500	69	HC I	4	2400	6900	
114	HC II	AL	2D	4500	24	HC I	3	2400	6900	
115	HC I	cobalto	3D	4500	36	HC I	3	2400	6900	
<b>Média</b>				4557	46			2461	7044	

<sup>a</sup> – lugar onde foi realizada a radioterapia externa: HC I - Hospital do Câncer I; HC II - Hospital do Câncer II;

<sup>b</sup> – aparelho fonte da radiação: AL – acelerador linear, cobalto – aparelho de cobaltoterapia;

<sup>c</sup> – técnica utilizada: 2D – duas dimensões, 3D – 3 dimensões;

<sup>d</sup> – dose em cGy;

<sup>e</sup> – t: intervalo entre o término da radioterapia externa e a cistoscopia com biópsia, em meses;

<sup>f</sup> – BT – braquiterapia; lugar onde foi realizada a braquiterapia: HC I - Hospital do Câncer I, HC III - Hospital do Câncer III; HMK - Hospital Mário Kroeff,

**Tabela 5.3:** Doses média e máxima na bexiga, pela radioterapia externa, nas pacientes tratadas pela técnica conformacional em 3 dimensões.

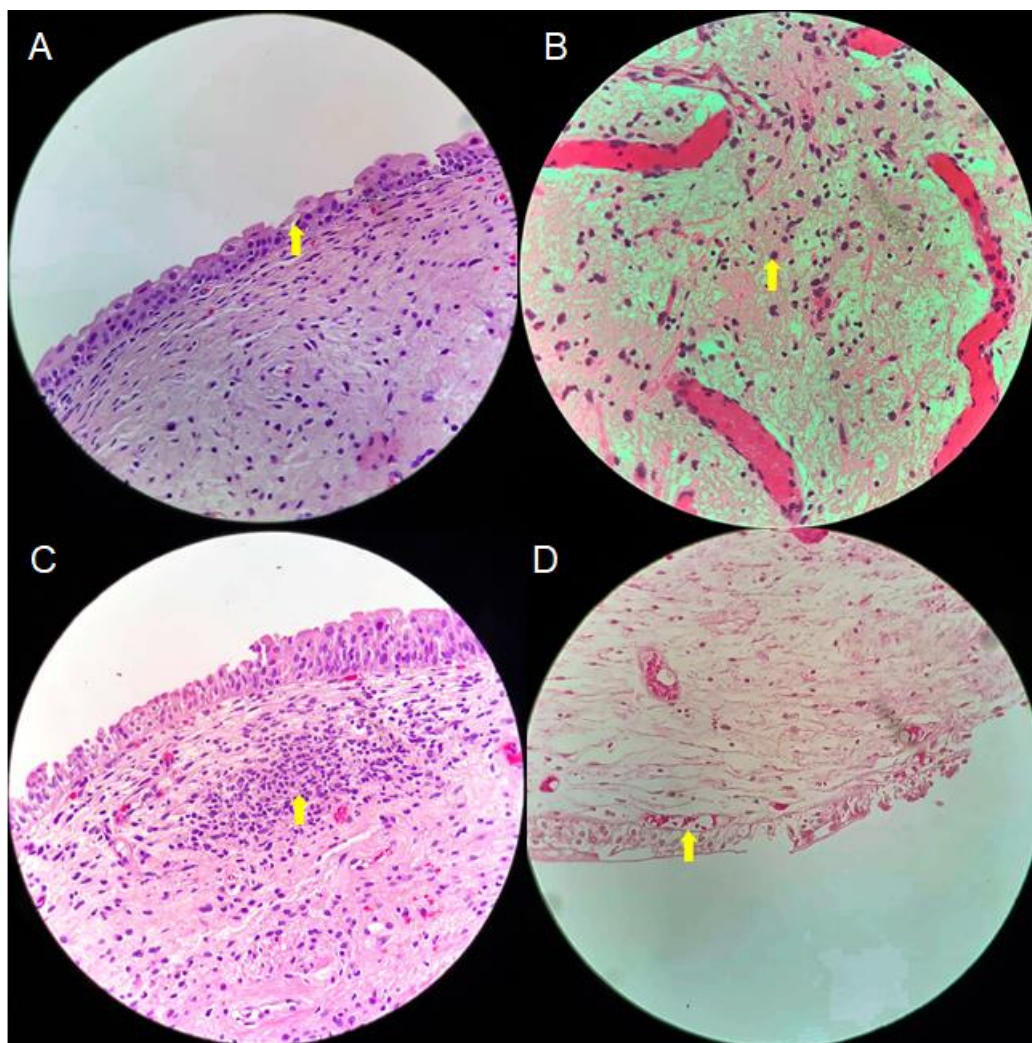
<b>Paciente</b>	<b>Bexiga m (cGy)*</b>	<b>Bexiga M (cGy)**</b>
<b>102</b>	4806	4960
<b>105</b>	4730	4840
<b>106</b>	4590	4680
<b>107</b>	4700	4890
<b>108</b>	4384	4860
<b>110</b>	5510	5580
<b>111</b>	4610	4690
<b>112</b>	4798	4850
<b>115</b>	4820	4960

\* - Dose vesical média em cGy;

\*\* - Dose vesical máxima em cGy.

### **5.3. As alterações histopatológicas relacionadas à radioterapia**

Os achados histopatológicos encontrados nas biópsias das pacientes irradiadas foram compatíveis com os já descritos na literatura. Foi possível identificar segmentos de atrofia mucosa, ectasia vascular submucosa, atipia celular moderada e infiltrado inflamatório (Figura 5.1).



**Figura 5.1:** Achados histopatológicos compatíveis com o dano induzido pela radiação. É possível identificar: atrofia mucosa (A), atipia celular (B), infiltrado inflamatório (C) e ectasia vascular submucosa (D). Hematoxilina-eosina, aumento de 400x.

#### **5.4. A morbidade tardia da radioterapia**

Os dados relacionados a possíveis complicações da radioterapia e aos escores de toxicidade vesical estão listados na tabela 5.4. Observou-se que 7 pacientes irradiadas (50%) apresentavam queixas compatíveis com dano actínico retal, das quais foi possível a comprovação endoscópica da complicação em 6 pacientes e uma apresentou queixa de diarreia crônica. Na escala RTOG/EORTC, que considera sintomas e achados cistoscópicos, a pontuação encontrada em 7

pacientes foi grau 1 (atrofia epitelial discreta, telangectasias pequenas ou hematúria microscópica), em 4 pacientes foi grau 2 (moderada frequência, telangectasia generalizada, hematúria macroscópica intermitente) e em 3 pacientes foi grau 3 (frequência e disúria graves, telangectasias graves generalizadas, hematúria frequente, redução na capacidade vesical - menor que 150 ml). A pontuação encontrada no somatório dos graus de toxicidade na tabela LENT/SOMA variou entre 1 (4 pacientes) e 8 (uma paciente), com média de 3,57. O somatório dos graus de gravidade na escala CTCAE versão 4.03, considerando os diferentes eventos adversos mais provavelmente relacionados à irradiação vesical, variou de 0 (uma paciente) a 6 (duas pacientes), com média de 3. O exame de elementos anormais e do sedimento urinário (EAS) revelou hematúria e/ou hemoglobinúria em 4 pacientes, uma delas apresentava hemoglobinúria intensa (4+). Leucocitúria e proteinúria foram encontradas em 5 pacientes. Cinco pacientes não apresentavam alterações no EAS e uma paciente não realizou EAS.



**Tabela 5.4:** Pontuação de toxicidade vesical e complicações relacionadas à radioterapia.

Paciente	Proctopatia*	RTOG/EORTC	LENT/SOMA					Total	CTCAE	EAS**
			S	O	M	A	Máx.			
101	N	1	2	1	0	0	2	3	4	1+ hgb, 2+ leuc
102	Grau 1	2	2	1	0	0	2	3	5	N
103	N	1	0	1	0	0	1	1	0	N
104	S	1	3	1	0	0	3	4	2	1+ leuc
105	S	1	0	1	0	0	1	1	1	N
106	N	1	0	1	0	0	1	1	2	2+ leuc
107	Grau 2	1	0	1	0	0	1	1	1	1+ leuc, 1+ ptn
108	N	3	3	3	2	0	3	8	6	4+ hgb, 1+ ptn
109	N	3	1	2	1	2	2	6	3	N
110	N	1	2	1	1	0	2	4	4	1+ ptn
111	S	2	0	2	0	0	2	2	2	1+ hgb, 1+ ptn, 3+ leuc
112	S (diarreia)	2	2	2	0	0	2	4	3	N
114	N	2	2	2	1	0	2	5	3	3+ hgb, 2+ ptn
115	S	3	3	2	2	0	3	7	6	Não disponível
<b>Média</b>		1,64						3,57	3	

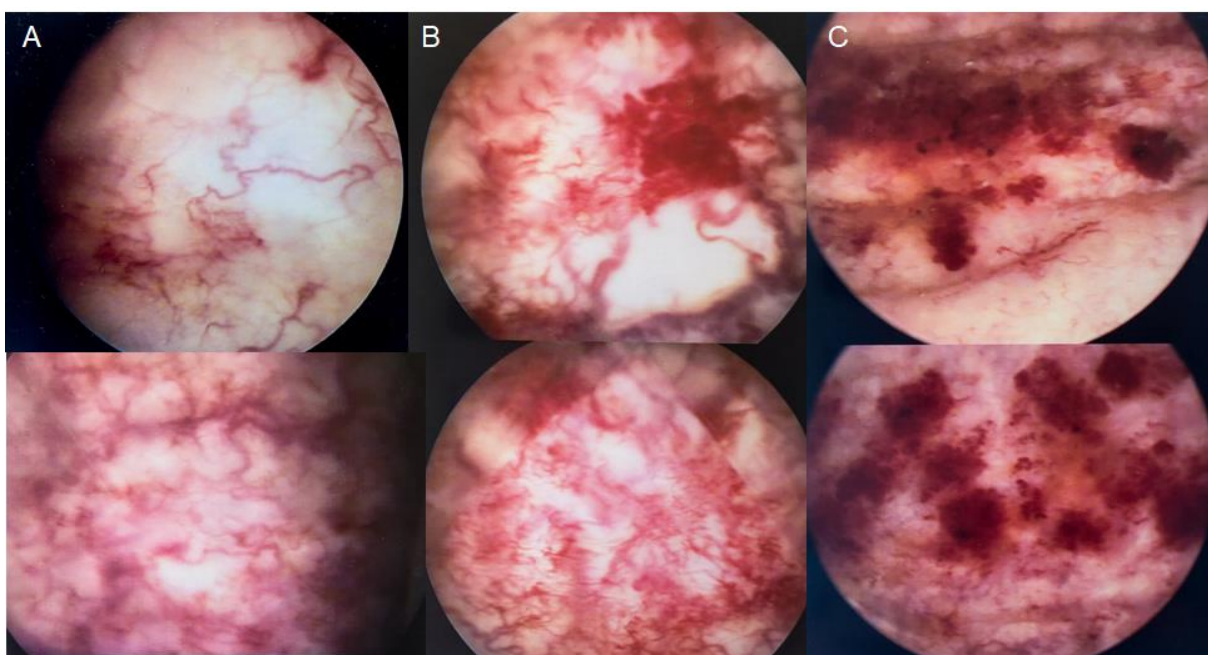
\* - a classificação da intensidade da proctopatia actínica foi a utilizada pela rotina do setor de endoscopia do HC II.

\*\* - hgb: hemoglobina, ptn: proteína, leuc: leucócitos. A gradação em número de + segue os padrões laboratoriais do INCA. N: exame normal, S: alteração presente (grau não especificado no exame de retossigmoidoscopia).

A avaliação das paredes vesicais através da cistoscopia revelou diferentes intensidades de dano induzido pela radiação segundo a escala de morbidade tardia RTOG/EORTC (Figura 5.3). É possível notar que, nas pacientes classificadas como Grau 1 a parede vesical apresentava graus de atrofia epitelial discreta, associada à telangectasias pequenas, nas pacientes classificadas como Grau 2 observou-se telangectasia generalizada e nas pacientes classificadas como Grau 3 as paredes vesicais apresentavam telangectasias graves generalizadas. É possível compararmos os achados com uma imagem captada durante um exame normal (Figura 5.2)



**Figura 5.2:** Aspecto encontrado em exame de cistoscopia normal. Imagem de arquivo.



**Figura 5.3:** Aspecto da mucosa vesical de pacientes irradiadas apresentando graus variados de neovascularização. As imagens foram obtidas durante os exames de cistoscopia de pacientes incluídas no estudo e correspondem as escalas de morbidade tardia RTOG/EORTC: coluna A - Grau 1, coluna B - Grau 2, coluna C - Grau 3.

### **5.5 A expressão do HIF1A e do VEGFA em amostras vesicais**

Com o propósito de testar a hipótese da associação entre o dano induzido pela radiação, o aumento de vascularização submucosa e, conseqüente, hematúria com a expressão de HIF1A e VEGFA, avaliou-se a expressão gênica utilizando a

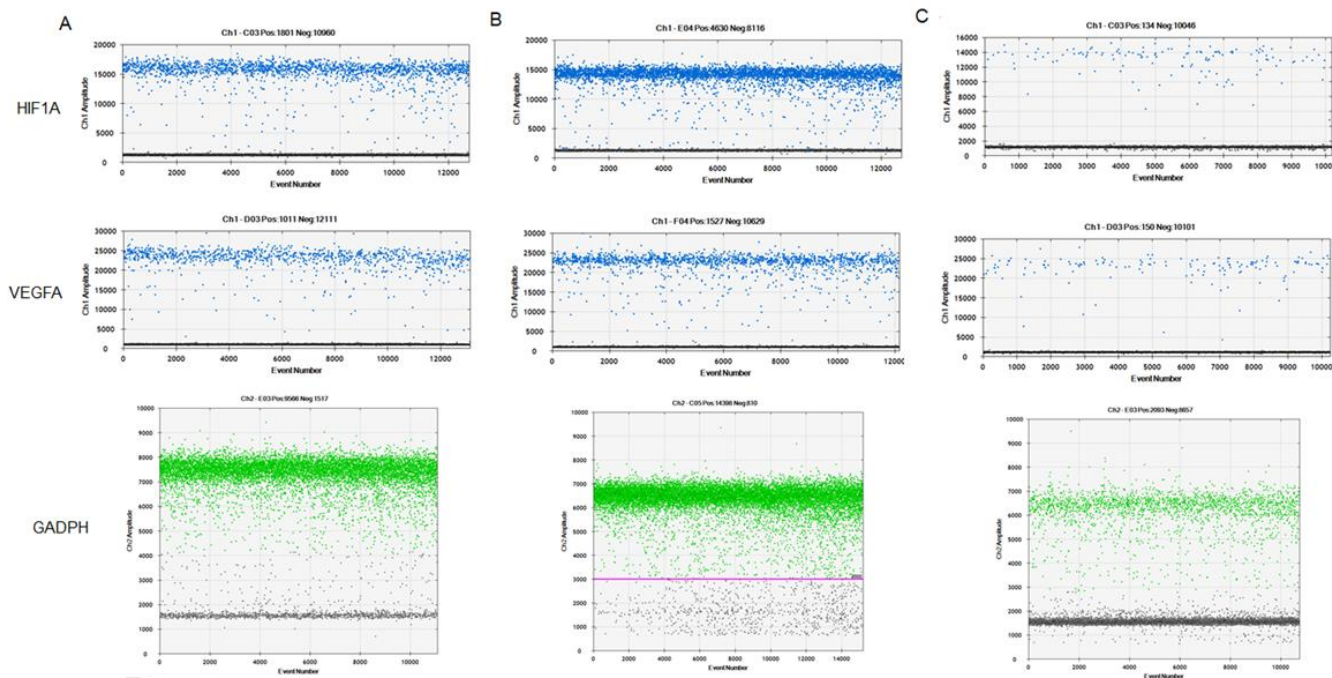
técnica de ddPCR em amostras vesicais de pacientes previamente irradiadas e pacientes não tratadas com radioterapia.

Não foi possível a realização da extração de RNA de todas as pacientes irradiadas, permanecendo apenas 8 pacientes para a análise molecular. A extração das amostras de biópsia de bexiga seguiu as recomendações do fabricante com pequenas modificações para aumentar o rendimento do processo de extração visto que os fragmentos obtidos eram pequenos. Todas as amostras que estavam disponíveis foram extraídas com sucesso obtendo em média 18,2 ng/μl de RNA (DP ±7,3) para as amostras das pacientes irradiadas e 13,4 ng/μl de RNA (DP ±7,8) para as amostras das pacientes controles (Tabela 5.5).

**Tabela 5.5:** Quantificação do RNA nas amostras de biópsia vesical em pacientes irradiadas e controles.

Código SPC	Quantificação RNA Biopsia (ng/μl)
<b>Irradiadas</b>	
101	9,3
102	13,4
105	28,6
106	25,1
107	22,2
110	22,5
112	15,3
114	9,2
<b>Média</b>	18,2
<b>Desvio Padrão</b>	7,386474125
<b>Controles</b>	
200	19,1
201	20,2
202	32,3
203	6,7
204	17,9
205	13,4
206	7
207	5,1
208	12
209	7,3
210	13,2
211	7,6
<b>Média</b>	13,48333333
<b>Desvio Padrão</b>	7,883796194

Posteriormente realizou-se a análise da expressão gênica de HIF1A, VEGFA e GAPDH através da ddPCR utilizando o corresponde à 5ng de RNA para cada reação. Cabe salientar que, o protocolo do fabricante para as análises de expressão gênica sugere a utilização de pelo menos 1ng de RNA para a detecção da maioria dos transcritos (PrimePCR™ ddPCR™ Gene Expression Probe Assay – Bio-Rad). Conforme mostrado na figura 5.4 foi possível realizar a quantificação precisa da expressão gênica de todos os alvos nas amostras das pacientes irradiadas, controles e nos lavados vesicais.



**Figura 5.4:** Gráficos da PCR digital em gotas. Os gráficos indicam a intensidade de fluorescência (*Ch1 Amplitude* e *Ch2 Amplitude para FAM* ou *HEX* respectivamente) das gotas analisadas (*event number*). As gotas são designadas “positivas” ou “negativas” baseadas nas suas amplitudes de fluorescência. Os eventos positivos estão assinalados em azul (HIF1A e VEGFA) e verde (GAPDH), enquanto os eventos negativos em cinza (gotas sem a molécula de DNA de interesse). Todas as análises foram realizadas utilizando o software QuantaSoft (Bio-rad). Durante a formação das gotas as moléculas de cDNA são distribuídas randomicamente nas gotas. Devido ao alto número de eventos independentes utiliza-se o algoritmo de Poisson para determinar a quantificação absoluta do número de cópias independente de uma curva padrão, permitindo uma quantificação precisa da expressão gênica. (A) gráfico representativo de uma paciente do grupo controle, (B) paciente irradiada e (C) amostra de lavado vesical (paciente do grupo controle).

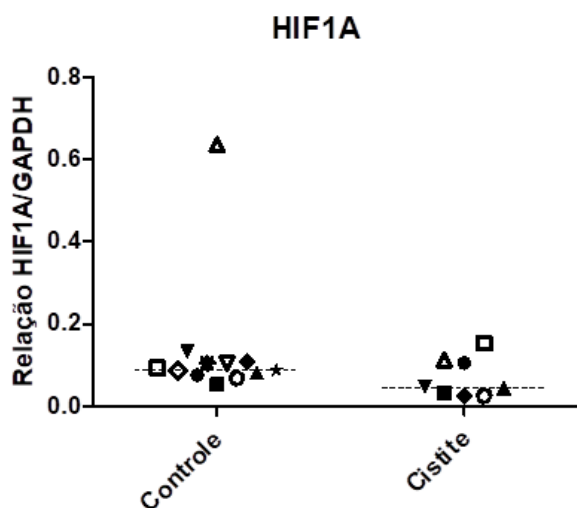
Os valores obtidos nos ensaios experimentais estão compilados nas tabelas 5.6 e 5.7. Como pode ser verificado por meio dos dados expostos nas Figuras 5.5 e 5.6, não foi detectada diferença estatisticamente significativa na expressão de HIF1A e VEGFA nas amostras vesicais de pacientes previamente irradiadas com amostras de pacientes não tratadas. Os valores obtidos foram normalizados utilizando gene de referência GAPDH.

**Tabela 5.6:** Valores obtidos através da análise de expressão gênica de HIF1A, VEGFA e do GAPDH nas pacientes irradiadas.

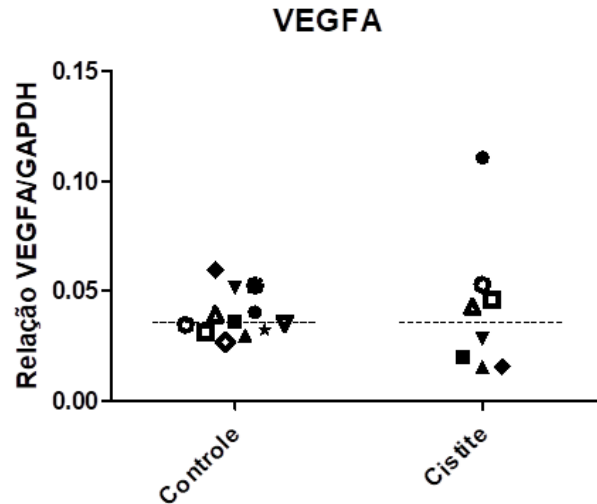
Paciente	HIF1A (cópias/ $\mu$ l)	VEGFA (cópias/ $\mu$ l)	GAPDH (cópias/ $\mu$ l)	Relação HIF1A/GAPDH	Relação VEGFA/GAPDH
101	2,1	2,2	19,9	0,105527638	0,110552764
102	87	53	2680	0,032462687	0,019776119
105	17,7	6,1	401	0,044139651	0,01521197
106	25,1	14,5	513	0,048927875	0,028265107
107	9	5,7	373	0,024128686	0,015281501
110	0,59	1,2	22,8	0,025877193	0,052631579
112	531	158	3450	0,153913043	0,045797101
114	294	112	2620	0,11221374	0,042748092
<b>Mediana</b>	21,4	10,3	457	0,046533763	0,035506599

**Tabela 5.7:** Valores obtidos através da análise de expressão gênica de HIF1A, VEGFA e do GAPDH, no grupo controle.

Paciente	HIF1A (cópias/ $\mu$ l)	VEGFA (cópias/ $\mu$ l)	GAPDH (cópias/ $\mu$ l)	Relação HIF1A/GAPDH	Relação VEGFA/GAPDH
200	179	94	2340	0,076495726	0,04017094
201	4,7	3,1	86	0,054651163	0,036046512
202	39,5	14,3	482	0,081950207	0,02966805
203	352	136	2640	0,133333333	0,051515152
204	305	167	2810	0,108540925	0,059430605
205	165	83	2410	0,06846473	0,034439834
206	169	56	1811	0,093318609	0,030922142
207	973	60	1529	0,636363636	0,039241334
208	246	83	2370	0,103797468	0,035021097
209	315	96	3620	0,087016575	0,026519337
210	291	145	2780	0,104676259	0,052158273
211	247	90	2800	0,088214286	0,032142857
Mediana	246,5	86,5	2390	0,090766447	0,035533804



**Figura 5.5:** Análise da expressão de RNA-m por ddPCR de HIF1A nas pacientes não irradiadas (controle) e pacientes previamente submetidas à radioterapia pélvica (cistite). GAPDH foi utilizado como controle interno dos experimentos. A comparação entre grupos foi realizada pelo teste t de Student não pareado.  $p > 0,05$



**Figura 5.6:** Análise da expressão de RNA-m por ddPCR de VEGFA nas pacientes não irradiadas (controle) e pacientes previamente submetidas à radioterapia pélvica (cistite). GAPDH foi utilizado como controle interno dos experimentos. A comparação entre grupos foi realizada pelo teste t de Student não pareado.  $p > 0,05$

### 5.6. A expressão do HIF1A e do VEGFA de acordo com o sistema RTOG/EORTC

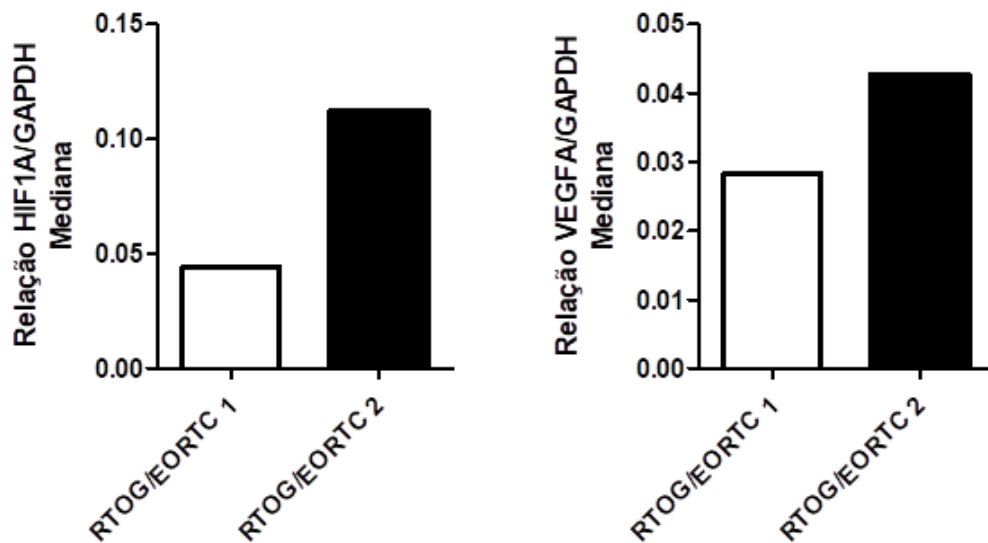
Foi feita análise comparando a expressão do HIF1A e do VEGFA no grupo irradiado, de acordo com o escore de morbidade tardia RTOG/EORTC. Foi demonstrada relação direta entre o grau de morbidade tardia e a expressão do HIF1A e do VEGF (Tabela 5.8, Figura 5.7).



**Tabela 5.8:** Expressão do HIF1A e do VEGFA em pacientes irradiadas de acordo com o escore de toxicidade RTOG/EORTC.

Paciente	RTOG/EORTC*	Relação HIF1A/GAPDH	Relação VEGFA/GAPDH
101	1	0,105528	0,110553
105	1	0,04414	0,015212
106	1	0,048928	0,028265
107	1	0,024129	0,015282
110	1	0,025877	0,052632
<b>Mediana</b>		<b>0,04414</b>	<b>0,028265</b>
102	2	0,032463	0,019776
112	2	0,153913	0,045797
114	2	0,112214	0,042748
<b>Mediana</b>		<b>0,112214</b>	<b>0,042748</b>

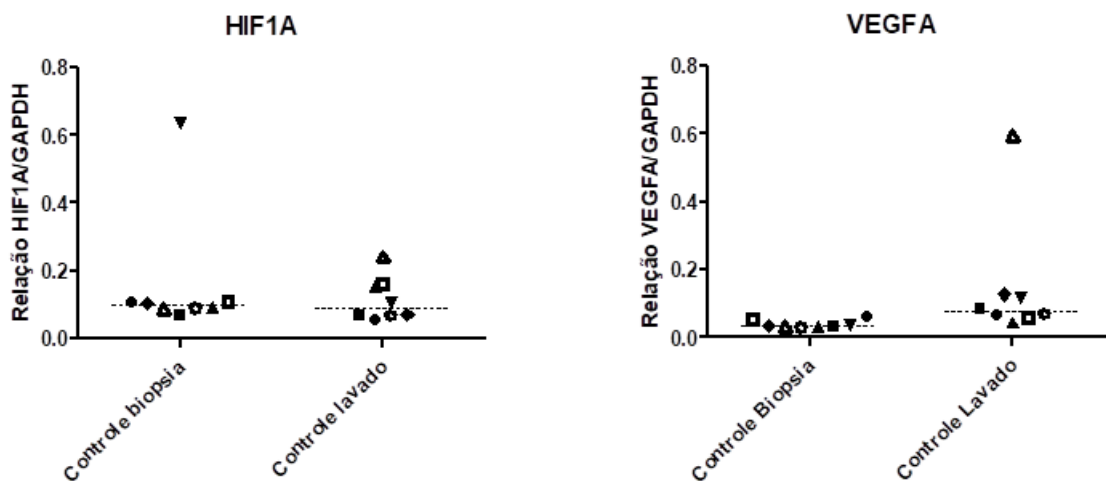
\* RTOG/EORTC: grau 1 - Atrofia epitelial discreta, telangectasias pequenas (hematúria microscópica); grau 2 - Moderada frequência, telangectasia generalizada, hematúria macroscópica intermitente.



**Figura 5.7:** Análise da expressão de RNA-m por ddPCR de HIF1A e VEGFA nas pacientes previamente submetidas à radioterapia pélvica de acordo com o escore de morbidade tardia RTOG/EORTC. GAPDH foi utilizado como controle interno dos experimentos. A comparação entre grupos foi realizada pelo teste t de Student não pareado.  $p > 0,05$

### 5.7. O lavado vesical enquanto amostra

Com o intuito de elucidar se os lavados vesicais poderiam ser utilizados como amostras mais acessíveis para utilização em estudos posteriores, realizou-se as análises comparativas entre a expressão de HIF1A e VEGFA nas amostras de biópsia vesical e lavado das pacientes controle (Figura 5.8). Cabe ressaltar que, apenas uma paciente irradiada teve a coleta do lavado vesical, portanto impossibilitando as análises nesse grupo de pacientes.



**Figura 5.8:** Análise da expressão de RNA-m por ddPCR de HIF1A e VEGFA nas biópsias e nas amostras de lavado vesical das pacientes do grupo controle. GAPDH foi utilizado como controle interno dos experimentos. A comparação entre grupos foi realizada pelo teste t de Student não pareado.  $p > 0,05$

Nota-se na figura 5.8 que foi possível realizar a análise da expressão gênica nos lavados vesicais, apesar da baixa celularidade encontrada. Ademais não foi possível observar diferenças estatisticamente significativas entre as duas amostras biológicas, apesar de uma tendência de maior expressão de VEGFA nos lavados vesicais.

## 6. Discussão

### 6.1. Os resultados de expressão do HIF e do VEGF

Os resultados obtidos de expressão do HIF1A e do VEGFA nas amostras de bexigas de pacientes submetidas à radioterapia para tratamento do câncer do colo do útero foram conflitantes com os dados apresentados na literatura em outras condições clínicas ou experimentais.

O papel desempenhado pela hipóxia e pelo aumento da expressão do HIF na obstrução infra vesical e suas consequências patológicas também tem sido estudado. Foi demonstrado por imunohistoquímica que na obstrução crônica secundária ao aumento do volume prostático a hipóxia resulta em aumento da expressão do HIF-1 $\alpha$ . A pressão detrusora no fluxo máximo a partir da qual ocorre o aumento da expressão do HIF1- $\alpha$  foi de 60 cm de água (KORITSIADIS *et al*, 2010). As amostras de pacientes obstruídos foram obtidas em cirurgias endoscópicas de ressecção prostática ou em cirurgias prostáticas abertas. As amostras de controle foram obtidas por ocasião da ressecção endoscópicas de tumores vesicais superficiais.

Foi demonstrado em modelo murino que a inibição farmacológica da via do HIF pode atenuar a fibrose tecidual presente nas bexigas submetidas à obstrução infra vesical e representar potencial para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para essa condição (IGUCHI *et al*, 2016). As avaliações da expressão do HIF-1 $\alpha$  e do HIF-2 $\alpha$  foram realizadas por imunohistoquímica e a expressão de seus alvos foi estudada por RT-PCR.

Para testar a hipótese de que a hipóxia pode desempenhar importante papel na síndrome de bexiga hiperativa foram analisadas as expressões do HIF-1 $\alpha$ , do HIF-2 $\alpha$  e do VEGF. Células uroteliais de pacientes com síndrome de bexiga hiperativa demonstraram maior expressão, especialmente do VEGF (CHRISTIAANSEN *et al*, 2011). Foram utilizadas culturas de células obtidas por biópsia e as análises foram realizadas pelas técnicas de RT-PCR, ensaio imuno enzimático e citometria de fluxo.

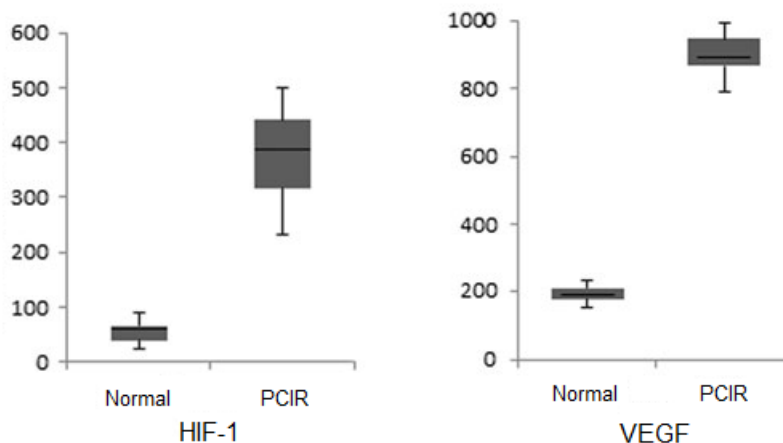
Foi demonstrado através de análise imunohistoquímica, *imunoblotting*, e imunofluorescência o aumento da expressão proteica de HIF-1 $\alpha$  e VEGF na cistite intersticial. Foram utilizadas amostras coletadas por biópsias de 32 pacientes com a condição e de 8 voluntários. Os achados do estudo sugerem o eventual papel terapêutico da oxigenioterapia hiperbárica nesse grupo de pacientes (LEE & LEE, 2011).

Estudos com pacientes com câncer de bexiga mostraram aumento na expressão do HIF-1 $\alpha$ , do VEGF e de outros marcadores de angiogênese por imunohistoquímica (IOACHIM *et al*, 2006). Os autores utilizaram amostras de tecido ressecado em procedimento cirúrgico terapêutico, o que disponibiliza material abundante para a análise no nível proteico. As amostras de controle foram obtidas através de biópsias vesicais em pacientes submetidos à ressecção endoscópica de adenomas prostáticos. Ainda que se possa discutir a adequação desse grupo controle, uma vez que o aumento da expressão do HIF-1 $\alpha$  também já foi revelado na obstrução infra vesical (KORITSIADIS *et al*, 2010), os autores demonstraram uma tendência de correlação indireta entre a expressão do HIF-1 $\alpha$  e a diferenciação nuclear tumoral.

Outro estudo que pesquisou por imunohistoquímica a expressão do HIF-1 $\alpha$  no câncer de bexiga e também utilizou como amostras o material obtido de peças cirúrgicas (cistectomias e ressecções transuretrais), pôde demonstrar o aumento da expressão do HIF-1 $\alpha$  em tumores invasivos (TICKOO *et al*, 2010). A pesquisa do HIF em câncer se apoia na hipóxia presente no tumor e na possibilidade do desenvolvimento de drogas inibitórias da sua via como alternativa terapêutica.

Também foi avaliada a relação de HIF e VEGF, com o dano intestinal induzido pela radioterapia. Traub *et al*, pesquisaram a expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo em amostras de biópsias retais de pacientes submetidos à radioterapia para tratamento de câncer da próstata ou câncer do colo do útero. As biópsias foram realizadas na área comprometida pela radiação e comparadas com biópsias coletadas em áreas mais altas do intestino grosso, supostamente não afetadas pela radioterapia. Dessa forma o mesmo paciente forneceu tecido irradiado e amostra de controle. Os autores demonstraram através da técnica de RT-PCR um aumento significativo da expressão do HIF1A (6,9 vezes) e do VEGFA (4,7 vezes),

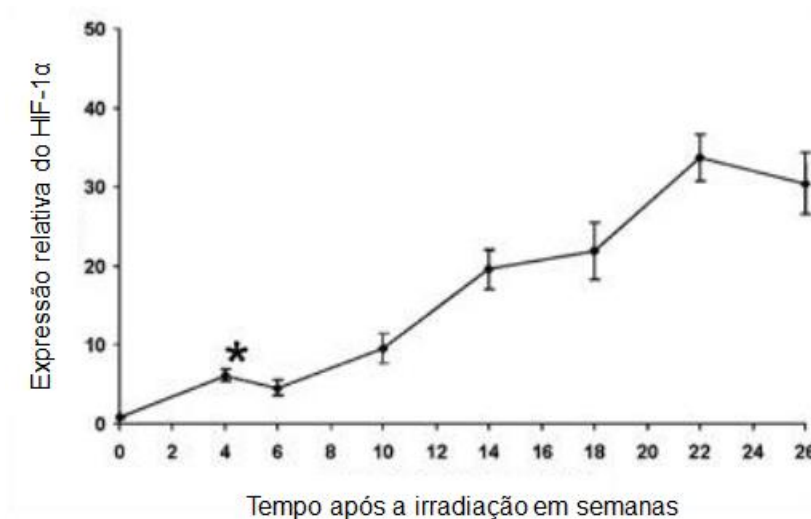
além do fator de crescimento de fibroblasto-2 e da interleucina-1 $\beta$  (Figura 6.7, TRAUB *et al*, 2011).



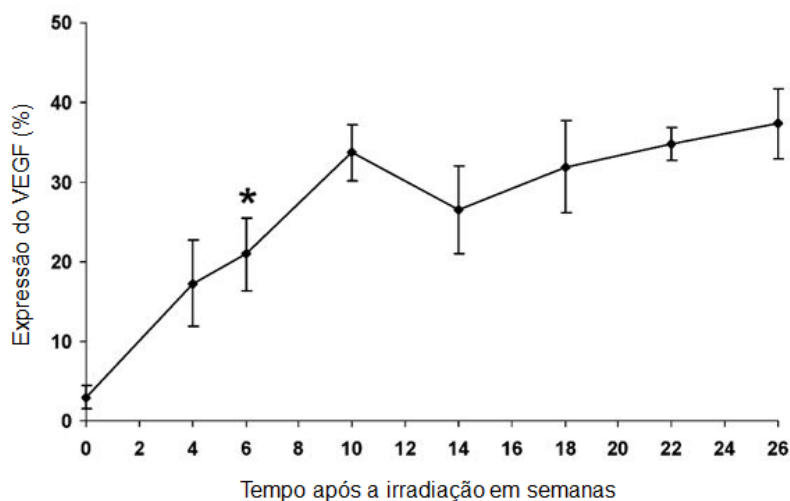
**Figura 6.1:** Expressão normalizada do RNA-m de HIF1A e VEGFA em tecido normal e apresentando proctopatia crônica induzida pela radiação (PCIR),  $p < 0,001$ . Fonte: TRAUB *et al*, 2011.

É necessário salientar a dificuldade da obtenção de material de tecidos irradiados para análise. O estudo acima, cujo perfil de pacientes se assemelha ao aqui apresentado, mereceu carta aos editores alertando sobre o risco das possíveis graves complicações advindas da realização de biópsias em retos com dano induzido pela radiação (JONGEN, KAHLKE, PETERSEN, 2012). Na carta o autor citava os riscos de formação de fístulas, de complicações infecciosas e de ulcerações.

A expressão do HIF-1 $\alpha$  e do VEGF, bem como de outros marcadores de hipóxia, estresse oxidativo, angiogênese e proliferação capilar, ativação de macrófagos, sinalização celular e fibrose, foi estudada em pulmões de ratos submetidos à irradiação. Utilizando imunohistoquímica e *western blot*, os autores demonstraram o aumento progressivo do HIF-1 $\alpha$  a partir de 4 semanas e do VEGF a partir de 6 semanas após a irradiação (Figuras 6.8 e 6.9, RABBANI *et al*, 2010).



**Figura 6.2:** Análise semi-quantitativa do HIF-1 $\alpha$ : foi observado aumento significativo da expressão do HIF-1 $\alpha$  em 4 semanas ( $p < 0.001$ ). Os níveis de HIF-1 $\alpha$  permaneceram significativamente elevados após a irradiação. Fonte: RABBANI *et al*, 2010.



**Figura 6.3:** A expressão do VEGF apresentou aumento significativo 6 semanas após a irradiação ( $p = 0,007$ ). Os níveis de VEGF permaneceram elevados durante todo o período de observação do estudo. Fonte: RABBANI *et al*, 2010.

## 6.2. As limitações do estudo

A discrepância entre os resultados demonstrados na literatura nas diversas circunstâncias descritas e os dados aqui apresentados pode ter fundamentação em algumas das etapas do projeto.

Uma limitação importante do estudo foi o pequeno número de pacientes inseridos. A convocação das pacientes irradiadas para a participação na pesquisa se mostrou um verdadeiro desafio. Apesar do grande número de mulheres submetidas à radioterapia para tratamento do câncer do colo do útero no HC II, as negativas para a participação eram frequentes. A inserção de uma única paciente, por exemplo, resultou da revisão de 148 prontuários, com todas as demais candidatas do grupo se negando a participar do estudo. A dificuldade na inserção de pacientes irradiadas, por sua vez, retardou a inserção de pacientes do grupo controle.

Outro problema encontrado foi a qualidade de amplificação do RNA em algumas amostras. A análise dos resultados obtidos sugere melhor qualidade amostral e melhor amplificação do RNA nas últimas amostras obtidas. As amostras coletadas nas etapas iniciais da pesquisa podem ter acumulado lesões no DNA e a perda da integridade molecular pode ter comprometido a ligação do primer. É preciso observar que todas as amostras coletadas foram preservadas em solução RNAlater® logo após sua obtenção, de acordo com todas as recomendações do fabricante, e que não era esperada diferença na capacidade de amplificação do RNA de acordo com o tempo entre a coleta e a análise.

Uma questão importante também é a possível contaminação nas análises realizadas, que pode ter ocorrido devido à eventual presença de células sanguíneas no material obtido pela biópsia. Algumas amostras, apesar de diminutas, apresentavam coloração predominantemente avermelhada, correspondendo à presença de hemácias no tecido obtido. A realização da biópsia parece ter formado pequeno hematoma em alguns dos fragmentos. As células sanguíneas presentes no hematoma da amostra teriam a expressão de HIF1A e VEGFA não relacionada aos efeitos locais da radioterapia e poderiam ter gerado efeito de diluição na expressão do HIF1A e do VEGFA.



É necessário considerar que, apesar da necessidade de normalização dos resultados através do estabelecimento da relação entre os genes alvo e o GAPDH, esse último também pode ter sofrido alteração de expressão induzida pela irradiação e pela hipóxia tecidual. Embora o GAPDH seja considerado um gene de referência clássico, já foi demonstrada a variabilidade de sua expressão entre diferentes tecidos, sendo a expressão no músculo esquelético 15 vezes maior que a do tecido mamário (BARBER *et al*, 2005). A hipóxia tecidual também já se provou responsável por interferir na expressão do GAPDH, podendo ser responsável por até 75% de aumento em sua transcrição (ZHONG & SIMONS, 1999). Também foi demonstrada a instabilidade do GAPDH 48 horas após a exposição à radiação ionizante em amostras de tumores de cabeça e pescoço, pulmão e pâncreas (IYER *et al*, 2017).

O aumento da expressão do GAPDH diante da hipóxia, no entanto, não foi demonstrado em culturas de células de leiomioma uterino (ISHIKAWA *et al*, 2018). Também já foi demonstrado que o aumento da expressão do GAPDH, que acontece em tecidos neoplásicos hipóxicos pode não ser encontrado em tecidos não tumorais (SIROVER, 2018).

É necessário reconhecer também que, considerando os riscos envolvendo a biópsia vesical em pacientes com cistite induzida por radioterapia, a obtenção das amostras não foi possível em todas as pacientes mais intensamente vascularizadas, bem como não foi direcionada às áreas vesicais mais afetadas. Dessa forma, inevitavelmente o estudo selecionou amostras que, a rigor, não apresentariam o aumento da expressão do HIF1A e do VEGFA em toda a sua magnitude. As amostras obtidas, por sua vez, também apresentaram dimensões reduzidas, o que dificultou seu processamento e a extração do RNA. A figura 6.10 demonstra um fragmento antes de seu processamento.



**Figura 6.4:** Exemplo de amostra vesical obtida por biópsia. Nota-se o tamanho diminuto do fragmento.

A possibilidade de complicações, eventualmente graves, da realização de biópsias em tecidos com dano induzido por radiação fica demonstrada pelo próprio comentário editorial que mereceu a pesquisa envolvendo pacientes portadores de proctopatia crônica induzida pela radiação (JONGEN, KAHLKE, PETERSEN, 2012). No entanto, considerando o ineditismo do estudo, tais limitações eram previstas. A evidência de resultados semelhantes na comparação da expressão do HIF1A e do VEGFA entre amostras de biópsia ou lavado vesical em pacientes não irradiadas (Figura 5.8), evidencia a utilidade da técnica menos invasiva em avaliações clínicas futuras.

Uma forma de contornar tanto a contaminação das amostras por células sanguíneas quanto os riscos da realização de biópsia seria a utilização de lavado vesical obtido por barbotagem com seleção celular através da citometria de fluxo.

Também não foi possível incluímos pacientes irradiadas em um único centro ou através de uma única técnica. Assim, eventuais diferenças de intensidade da hipóxia tecidual e de expressão do HIF1A e do VEGFA entre técnicas distintas de radioterapia externa podem ter resultado em diferenças nos valores detectados.

Foi constatado que os pacientes com maior escore na escala RTOG/EORTC apresentavam maior expressão de HIF1A e VEGFA (Figura 5.7). No entanto, a

análise de subgrupo contou com poucos pacientes e não foi capaz de demonstrar diferença estatisticamente significativa.

É importante ressaltar que várias das limitações listadas guardam relação com o fato de que não consta outro estudo que tenha avaliado a expressão do HIF1A ou do VEGFA em bexigas irradiadas.

## **6.5. Perspectivas**

Ainda que não tenha sido encontrada diferença estatisticamente significativa da expressão do HIF1A e do VEGFA entre as pacientes irradiadas e as sem tratamento, os esforços na elucidação dos mecanismos responsáveis pela proliferação vascular vesical submucosa responsável pela hematúria permanecem relevantes. A superação de entraves metodológicos, próprios do ineditismo desse estudo, poderia conduzir a resultados distintos dos aqui alcançados.

Importante avanço é a possibilidade de obtenção de material celular de maneira menos invasiva que a biópsia. A alternativa do lavado vesical não representa risco de complicações graves e poderia conduzir à participação de número maior de pacientes na pesquisa.

O material obtido pela barbotagem, contendo células vesicais descamativas junto a componentes sanguíneos proveniente da hematúria, demandaria a precisa identificação dos tipos celulares recolhidos para que não houvesse contaminação dos resultados. O método mais indicado para tanto seria a citometria de fluxo. Desta forma haveria, inclusive, a possibilidade de coleta de material de pacientes com sangramento macroscópico ativo.

## 7. Conclusão

Ainda que não tenha sido atingida a dose máxima restritiva de irradiação vesical, as complicações da radioterapia pélvica foram frequentes. A proctopatia induzida pela radiação foi encontrada em metade das pacientes incluídas. A pontuação alcançada nos escores de toxicidade RTOG/EORTC, LENT/SOMA e CTCAE foi relevante. Menos da metade das pacientes irradiadas incluídas apresentaram exame do sedimento urinário sem alterações. Os dados obtidos evidenciam a importante morbidade da radioterapia pélvica como tratamento do câncer do colo do útero.

Análise da expressão de RNA mensageiro por ddPCR de HIF1A e VEGFA nas pacientes controle e pacientes previamente submetidas à radioterapia pélvica não chegou a diferenças estatisticamente significativas. Entre as pacientes irradiadas, na análise de subgrupo de acordo com o escore de toxicidade RTOG/EORTC, foi observada relação direta entre o grau de morbidade tardia e a expressão do HIF1A e do VEGFA. Ainda assim, não foi demonstrada diferença estatisticamente significativa.

Entre as pacientes não irradiadas, foi possível observar que o lavado vesical, pode fornecer material adequado para a avaliação da expressão do HIF1A e do VEGFA.

A frequência e a gravidade dos efeitos adversos da radioterapia justificam a necessidade de novas pesquisas analisando o lavado vesical através de técnicas diversas na tentativa de elucidar o papel da via do HIF nas complicações da radioterapia pélvica.

## 8. Referências

ABU-RUSTUM, N. R. & SONODA, Y.. **Fertility-Sparing Surgery in Early-Stage Cervical Cancer: Indications and Applications**. Journal of the National Comprehensive Cancer Network, 2010. 8(12), 1435–1438.

ALESAWI, A. M. *et al.* **Radiation-induced hemorrhagic cystitis**. Current Opinion in Supportive and Palliative Care, 2014. 8(3), 235–240.

American Joint Committee on Cancer. Cervix Uteri. In: **AJCC Cancer Staging Manual**. 8th ed. New York, NY: Springer; 2017:649-659.

ANACAK, Y. *et al.* **Late radiation effects to the rectum and bladder in gynecologic cancer patients: the comparison of LENT/SOMA and RTOG/EORTC late-effects scoring systems**. International Journal of Radiation Oncology\*Biological\*Physics, 2001. 50(5), 1107–1112.

ANDIKYAN, V. *et al.* **Cervical Conization and Sentinel Lymph Node Mapping in the Treatment of Stage I Cervical Cancer**. International Journal of Gynecological Cancer, 2014. 24(1), 113–117.

ANOLUE, F. C. *et al.* **Carcinoma of the cervix at a university teaching hospital in Eastern Nigeria**. Niger J. Surg. Sci., 2014. 24:49-52.

ARRIZABALAGA, M. *et al.* **Treatment of Massive Haematuria with Aluminous Salts**. British Journal of Urology, 1987. 60(3), 223–226.

BARBER, R. D., *et al.* **GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues.** *Physiological Genomics*, 2005. 21(3), 389–395.

BHATLA, N. *et al.* **Cancer of the cervix uteri.** *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 2018a. 143, 22–36.

BHATLA, N. *et al.* **New revised FIGO staging of cervical cancer.** *International Journal of Gynecology & Obstetrics, Special Session Abstracts*. 2018b. 143, 43–157.

BOSCH, F. X. *et al.* **The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer.** *J. Clin. Pathol.*, 2002. 55:244–265.

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Informática do SUS. **Sistema de informações sobre mortalidade.** Brasília, DF, 2017. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/obt10uf.def>. Acesso em: 21 dez. 2018.

BROWNE, C., *et al.* **A Narrative Review on the Pathophysiology and Management for Radiation Cystitis.** *Advances in Urology*, 2015. 1–7.

BRYANT, A. K. *et al.* **Trends in Radiation Therapy among Cancer Survivors in the United States, 2000–2030.** *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 2017. 26(6), 963–970.

CHRISTIAANSEN, C. E. *et al.* **Alterations in Expression of HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , and VEGF by Idiopathic Overactive Bladder Urothelial Cells During Stretch Suggest Role for Hypoxia.** *Urology*, 2011. 77(5), 1266.e7–1266.e11.

D'AVERSA, E. *et al.* **Non-invasive fetal sex diagnosis in plasma of early weeks pregnant using droplet digital PCR.** *Molecular Medicine*, 2018. 24(1).

DE SANJOSÉ, S. *et al.* **Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis.** *Lancet. Infect. Dis.*, 2007. 7:453–459.

DENTON, A. S.; CLARKE, N. W. & MAHER, E. J.. **Non-surgical interventions for late radiation cystitis in patients who have received radical radiotherapy to the pelvis.** *Cochrane Database Syst Rev.*, 2002. (3):CD001773.

**Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero/Instituto Nacional de Câncer Jose Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Divisão de Detecção Precoce e Apoio à Organização de Rede. – 2. ed. rev. atual. – Rio de Janeiro: INCA, 2016.**

DISCHE, S. *et al.* **The recording of morbidity related to radiotherapy.** *Radiotherapy and Oncology*, 1989. 16(2), 103–108.

EIFEL, P. J. *et al.* **Time course and incidence of late complications in patients treated with radiation therapy for FIGO Stage IB carcinoma of the uterine cervix.** *International Journal of Radiation Oncology\*Biology\*Physics*, 1995. 32(5), 1289–1300.

EPSTEIN, A. C. R. *et al.* **C. elegans EGL-9 and Mammalian Homologs Define a Family of Dioxygenases that Regulate HIF by Prolyl Hydroxylation.** *Cell*, 2001. 107(1), 43–54.

**Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro: INCA, 2009.**

**Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil** / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro : Inca, 2011.

**Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil** / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro: INCA, 2014.

**Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil** / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro: INCA, 2015.

**Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil** / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro: INCA, 2017.

FERLAY, J. *et al.*. GLOBOCAN 2012 v1.0, cancer incidence and mortality worldwide. Lyon, France: IARC, 2013. (IARC CancerBase, 11). Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr>>. Acesso em: 14 set. 2013.

FERRARA N, GERBER HP & LECOUTER J.. **The biology of VEGF and its receptors.** Nat Med. 2003 Jun;9(6):669-76.

FERRELL, B. *et al.*. **Quality of life in long-term cancer survivors.** Oncol. Nurs Forum, 1995. 22: 915.

FORREST, J. L. *et al.*. **Patient Outcome Study of Concurrent Chemoradiation, External Beam Radiotherapy, and High-Dose Rate Brachytherapy in Locally Advanced Carcinoma of the Cervix.** International Journal of Gynecological Cancer, 2010. 20(6), 1074–1078.



FYLES, A. *et al.* **The effect of treatment duration in the local control of cervix cancer.** *Radiotherapy and Oncology*, 1992. 25(4), 273–279.

GLOBOCAN 2018: <https://gco.iarc.fr/today/home>. Acesso em: 21 dez. 2018.

GOFF, B. A. *et al.* **Impact of Surgical Staging in Women with Locally Advanced Cervical Cancer.** *Gynecologic Oncology*, 1999. 74(3), 436–442.

GOODMAN, G. P. *et al.* **Conservation of bladder function in patients with bladder function in patients with invasive bladder cancer treated by definitive irradiation and selective cystectomy.** *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 1981. 7, 569–573.

GREER, S. N. *et al.* **The updated biology of hypoxia-inducible factor.** *EMBO J.*, 2012. 30;31(11):2448-60.

GSTALDER, C.; ADER, I. & CUVILLIER, O.. **FTY720 (Fingolimod) Inhibits HIF1 and HIF2 Signaling, Promotes Vascular Remodeling, and Chemosensitizes in Renal Cell Carcinoma Animal Model.** *Molecular Cancer Therapeutics*, 2016. 15(10), 2465–2474.

HEMAL, A. K. *et al.* **Control of massive vesical hemorrhage due to radiation cystitis with intravesical instillation of 15 (s) 15-methyl prostaglandin F2-alpha.** *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.*, 1988. 26(10):477-8.

HEWITT, M.; GREENFIELD, S.; STOVALL, E.. **From cancer patient to cancer survivor: lost in transition.** Washington, DC: The National Academies Press, 2005.

HINDSON, B. J. *et al.* **High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number.** *Anal Chem.*, 2011. 15;83(22):8604-10.

Ministério da Saúde <http://portalms.saude.gov.br/vigilancia-em-saude/vigilancia-de-doencas-cronicas-nao-transmissiveis-dcnt/plano-de-acoes-estrategicas-para-o-enfrentamento-das-doencas-cronicas-nao-transmissiveis-dcnt>. Acesso em 20 de jan. de 2019.

RTOG Foundation  
<https://www.rtog.org/researchassociates/adverseeventreporting/rtogetherortclateradiationmorbidityscoringschema.aspx>. Acesso em 20 de jan. de 2019.

IARC (2012). Biological agents. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum, 100B:1– 441.

IARC Working Group. Human Papillomaviruses: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2007:90.

IGUCHI, N.; MALYKHINA, A. P. & WILCOX, D. T.. **Inhibition of HIF Reduces Bladder Hypertrophy and Improves Bladder Function in Murine Model of Partial Bladder Outlet Obstruction.** The Journal of Urology, 2016. 195(4), 1250–1256.

IOACHIM, E. *et al.*. **Hypoxia-Inducible Factors HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  Expression in Bladder Cancer and Their Associations with Other Angiogenesis-Related Proteins.** Urologia Internationalis, 2006. 77(3), 255–263.

ISHIKAWA, H. *et al.*. **Hypoxia Induces Hypoxia-Inducible Factor 1 $\alpha$  and Potential HIF-Responsive Gene Expression in Uterine Leiomyoma.** Reproductive Sciences, 2018.

IYER, G. *et al.*. **Identification of stable housekeeping genes in response to ionizing radiation in cancer research.** Scientific Reports, 2017. 7(1).

JONGEN, J.; KAHLKE, V. & PETERSEN, S.. **Letter to the Editor concerning “Gene expression analysis in chronic postradiation proctopathy” by Traub et al.** International Journal of Colorectal Disease, 2012. 27(12), 1689–1689.

KENNEDY, G. & HEISE, C.. **Radiation Colitis and Proctitis.** Clinics in Colon and Rectal Surgery, 2007. 20(1), 064–072.

KEYS, H. M. *et al.* **Cisplatin, radiation, and adjuvant hysterectomy compared with radiation and adjuvant hysterectomy for bulky stage IB cervical carcinoma.** N. Engl. J. Med., 1999. 340:1154–1161.

KIERAN, M. W.; KALLURI, R & CHO, Y. J.. **The VEGF Pathway in Cancer and Disease: Responses, Resistance, and the Path Forward.** Cold Spring Harb Perspect Med. 2012 Dec; 2(12): a006593.

KOKKA, F. *et al.* **Surgical treatment of stage 1A2 cervical cancer.** Cochrane Database of Systematic Reviews, 2013.

KORITSIADIS, G. *et al.* **The effect of alpha-blocker treatment on bladder hypoxia inducible factor-1 alpha regulation during lower urinary tract obstruction.** Int. Braz. J. Urol., 2010. 36(1):86-94.

KROCK, B. L.; SKULI, N. & SIMON, M. C.. **Hypoxia-Induced Angiogenesis: Good and Evil.** Genes Cancer. 2011 Dec; 2(12): 1117–1133.

KUMARI, A. *et al.* **Retrospective analysis of patients of cervical cancer a tertiary center in Bihar.** Indian J. Cancer, 2018. 55:70-3.

LANDO, D.. **Asparagine Hydroxylation of the HIF Transactivation Domain: A Hypoxic Switch.** Science, 2002. 295(5556), 858–861.

LANDONI, F. *et al.* **Randomised study of radical surgery versus radiotherapy for stage Ib-IIa cervical cancer.** The Lancet, 1997. 350(9077), 535–540.

LEE, J. D. & LEE, M. H.. **Increased Expression of Hypoxia-inducible Factor-1 $\alpha$  and Vascular Endothelial Growth Factor Associated With Glomerulation Formation in Patients With Interstitial Cystitis.** Urology, 2011. 78(4), 971.e11–971.e15.

LENT SOMA tables table of contents. (1995). Radiotherapy and Oncology, 35(1), 17–60.

LEVENBACK, C. *et al.* **Hemorrhagic Cystitis Following Radiotherapy for Stage Ib Cancer of the Cervix.** Gynecologic Oncology, 1994. 55(2), 206–210.

LOBODA A, JOZKOWICZ A, DULAK J.. **HIF-1 versus HIF-2--is one more important than the other?** Vascul Pharmacol. 2012 May-Jun;56(5-6):245-51.

LOWE, B. A. & STAMEY, T. A.. **Endoscopic Topical Placement of Formalin Soaked Pledgets to Control Localized Hemorrhage Due to Radiation Cystitis.** The Journal of Urology, 1997. 158(2), 528–529.

LUTZ, S. T. *et al.* **A review of hypofractionated palliative radiotherapy.** Cancer, 2007. 109(8), 1462–1470.

MANIKANDAN, R.; KUMAR, S. & DORAIRAJAN, L. N.. **Hemorrhagic cystitis: A challenge to the urologist.** Indian J. Urol., 2010. 26:159-66.

MARKS, L. B. *et al.* **The response of the urinary bladder, urethra, and ureter to radiation and chemotherapy.** International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics, 1995. vol. 31, no. 5, pp. 1257–1280.

MARKS, L. B. *et al.* **Use of normal tissue complication probability models in the clinic.** Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2010; 76(Suppl 3):10–9

MAXWELL, P. H. *et al.* **The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis.** Nature, 1999. 399(6733), 271–275.

MAYNARD, M. A. *et al.* **Multiple Splice Variants of the Human HIF-3 $\alpha$  Locus Are Targets of the von Hippel-Lindau E3 Ubiquitin Ligase Complex.** Journal of Biological Chemistry, 2003. 278(13), 11032–11040.

MICIC, S. & GENBAČEV, O.. **Post-Irradiation Cystitis Improved by Instillation of Early Placental Extract in Saline.** Eur. Urol., 1988. 14:291–293.

MILLER, K. D. *et al.* **Cancer treatment and survivorship statistics, 2016.** CA Cancer J. Clin., 2016. 66: 271–89.

MORRIS, M. *et al.* **Pelvic radiation with concurrent chemotherapy versus pelvic and para-aortic radiation for high-risk cervical cancer: a randomized Radiation Therapy Oncologic Group clinical trial.** N. Engl. J. Med., 1999. 340:1137–1143.

MULLAN, F.. **Seasons of survival: reflections of a physician with cancer.** N. Engl. J. Med., 1985. 313: 270–73.

MUTCH, D. G.. **The new FIGO staging system for cancers of the vulva, cervix, endometrium and sarcomas.** Gynecologic Oncology, 2009. 115(3), 325–328.

NATIONAL CANCER INSTITUTE (1999) NCI Clinical Announcement. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA.

NATIONAL CANCER INSTITUTE  
[https://evs.nci.nih.gov/ftp1/CTCAE/CTCAE\\_4.03/Archive/CTCAE\\_4.0\\_2009-05-29\\_QuickReference\\_8.5x11.pdf](https://evs.nci.nih.gov/ftp1/CTCAE/CTCAE_4.03/Archive/CTCAE_4.0_2009-05-29_QuickReference_8.5x11.pdf). Acesso em 21 dez. 2018.

NAYAK, B. K. *et al.* **HIF-1 Mediates Renal Fibrosis in OVE26 Type 1 Diabetic Mice.** Diabetes, 2016. 65(5), 1387–1397.

NCCN guidelines; [https://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/PDF/cervical.pdf](https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/PDF/cervical.pdf). Acesso em 15 dez. 2018.

NCCS. NCCS marks 30 years of cancer survivorship advocacy. <http://www.canceradvocacy.org/nccs-news/nccs-marks-30-years-cancer-survivorship-advocacy/>. Acesso em 21 dez. 2018.

NIU G, CHEN X. **Vascular endothelial growth factor as an anti-angiogenic target for cancer therapy.** Curr Drug Targets. 2010;11(8):1000-1017.

NOGUEIRA-RODRIGUES, A. *et al.* **Comparison of adenocarcinoma (ACA) and squamous cell carcinoma (SCC) of the uterine cervix in a sub-optimally screened cohort: A population-based epidemiologic study of 51,842 women in Brazil.** Gynecologic Oncology, 2014. 135(2), 292–296.

PASCOE, C. *et al.* **Current management of radiation cystitis: A review and practical guide to clinical management.** BJU International, 2018.

PEARCEY, R. *et al.* **Phase III trial comparing radical radiotherapy with and without cisplatin chemotherapy in patients with advanced squamous cell cancer of the cervix.** J. Clin. Oncol., 2002;20:966–972.

PECORELLI, S.; ZIGLIANI, L. & ODICINO, F.. **Revised FIGO staging for carcinoma of the cervix.** International Journal of Gynecology & Obstetrics, 2009. 105(2), 107–108.

PEREZ, C. A. *et al.* **Radiation therapy morbidity in carcinoma of the uterine cervix: dosimetric and clinical correlation.** International Journal of Radiation Oncology\*Biography\*Physics, 1999. 44(4), 855–866.

PETERS, W. A. *et al.* **Concurrent Chemotherapy and Pelvic Radiation Therapy Compared With Pelvic Radiation Therapy Alone as Adjuvant Therapy After Radical Surgery in High-Risk Early-Stage Cancer of the Cervix.** Journal of Clinical Oncology, 2000. 18(8), 1606–1613.

PHAN, J. *et al.* **Late rectal complications after prostate brachytherapy for localized prostate cancer.** Cancer, 2009. 115(9), 1827–1839.

PHILLIPS, R. M.. **Targeting the hypoxic fraction of tumours using hypoxia activated prodrugs.** Cancer Chemother. Pharmacol., 2016. 77, 441–457.

RABBANI, Z. N. *et al.* **Hypoxia Inducible Factor 1 $\alpha$  Signaling in Fractionated Radiation-Induced Lung Injury: Role of Oxidative Stress and Tissue Hypoxia.** Radiation Research, 2010. 173(2), 165–174.

ROSE, P. G. *et al.*. **Concurrent cisplatin based chemoradiation improves progression free and overall survival in an advanced cervical cancer: results of a randomized Gynecologic Oncology Group Study.** N. Engl. J. Med., 1999. 340:1144–1153.

ROSE, P. G.. **New treatment paradigm for locally advanced cervical cancer?** Nature Reviews Clinical Oncology, 2011. 8(7), 388–390.

SEMENZA, G. L.. **Oxygen sensing, hypoxia-inducible factors, and disease pathophysiology.** Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease, v. 9, p. 47-71, 2014.

SIMONS M, GORDON E & CLAEISSON-WELSH L.. **Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling.** Nat Rev Mol Cell Biol. 2016 Oct;17(10):611-25

SINGH, I. & LAUNGANI, G. B.. **Intravesical epsilon aminocaproic acid in management of intractable bladder hemorrhage.** Urology, 1992. 40(3), 227–229.

SIROVER, M. A.. ***Pleiotropic effects of moonlighting glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) in cancer progression, invasiveness, and metastases.*** Cancer and Metastasis Reviews. 2018.

SMIT, S. G. & HEYNS, C. F.. **Management of radiation cystitis.** Nature Reviews Urology, 2010. 7(4), 206–214.

STEWART, B. W.; WILD, C. P. (Ed.). World Cancer Report: 2014. Lyon: IARC, 2014.

STEWART, F. A.. **Mechanism of bladder damage and repair after treatment with radiation and cytostatic drugs.** British journal of cancer, 1986. vol. 7: 280-91.



TAYLOR, S. C., LAPERRIERE, G. & GERMAIN, H. **Droplet Digital PCR versus qPCR for gene expression analysis with low abundant targets: from variable nonsense to publication quality data.** Sci Rep., 2017. 25;7(1):2409.

THULER, L. C.. **Mortalidade por câncer do colo do útero no Brasil.** Rev. Bras. Ginecol. Obstet., 2008. 30(5):216-8.

THULER, L. C.; AGUIAR, S. S. & BERGMANN, A.. **Determinantes do diagnóstico em estadio avançado do câncer do colo do útero no Brasil.** Rev. Bras. Ginecol. Obstet., 2014. v. 36, n. 6, p. 237-243.

TICKOO, S. K. *et al.* **Hypoxia-inducible factor and mammalian target of rapamycin pathway markers in urothelial carcinoma of the bladder: possible therapeutic implications.** BJU International, 2010. 107(5), 844–849.

TIERNEY, J. F.; VALE, C. & SYMONDS, P.. **Concomitant and neoadjuvant chemotherapy for cervical cancer.** Clin. Oncol., 2008. 20:401–416.

TRAUB, F. *et al.* **Gene expression analysis in chronic postradiation proctopathy.** International Journal of Colorectal Disease, 2011. 27(7), 879–884.

VELDHUIJZEN N. J. *et al.* **Factors affecting transmission of mucosal human papillomavirus.** Lancet Infect Dis., 2010. 10:862–874.

VIDAL, J. P. C. B. *et al.* **Genetic diversity of HPV16 and HPV18 in Brazilian patients with invasive cervical cancer.** Journal of Medical Virology, 2016. 88(7), 1279–1287.

WENGER, R. H.; STIEHL, D. P. & CAMENISCH, G.. **Integration of oxygen signaling at the consensus HRE.** Sci STKE 2005: re12

WHITNEY, C. W. *et al.*. **A randomized comparison of fluorouracil plus cisplatin versus hydroxyurea as an adjunct to radiation therapy in stages IIB–IVA carcinoma of the cervix with negative para-aortic lymph nodes: a Gynecology Oncology Group and Southwest Oncology Group Study.** *J. Clin. Oncol.*, 1999. 17:1339–1348.

XIONG, A. & LIU, Y.. **Targeting Hypoxia Inducible Factors-1 $\alpha$  As a Novel Therapy in Fibrosis.** *Frontiers in Pharmacology*, 2017. 8.

ZHANG, X. *et al.*. **Insights into the therapeutic potential of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  small interfering RNA in malignant melanoma delivered via folate-decorated cationic liposomes.** *International Journal of Nanomedicine*, 2016. 991.

ZHONG, H. & SIMONS, J. W.. **Direct Comparison of GAPDH,  $\beta$ -Actin, Cyclophilin, and 28S rRNA as Internal Standards for Quantifying RNA Levels under Hypoxia.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1999. 259(3), 523–526.

ZIEGELMANN, M. J. *et al.*. **Intravesical formalin for hemorrhagic cystitis: A contemporary cohort.** *Canadian Urological Association Journal*, 2017. 11(3-4), 79.

ZWAANS, B. M. M.; CHANCELLOR, M. B. & LAMB, L. E.. **Modeling and Treatment of Radiation Cystitis.** *Urology*, 2016. 88, 14–21.

## 9. Anexos

Anexo 1 – Parecer de Aprovação do Comitê de Ética do INCA:



INSTITUTO NACIONAL DE  
CÂNCER/ INCA/ RJ



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** EXPRESSÃO DO FATOR INDUZIDO POR HIPÓXIA (HIF) E DO FATOR DE CRESCIMENTO DO ENDOTÉLIO VASCULAR (VEGF) EM BEXIGAS IRRADIADAS

**Pesquisador:** Ricardo Castellani de Mattos

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 37818114.8.0000.5274

**Instituição Proponente:** Hospital do Câncer II

**Patrocinador Principal:** Coordenação de Pesquisa

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 918.354

**Data da Relatoria:** 14/01/2015

#### Apresentação do Projeto:

- Conforme Parecer Consubstanciado do CEP-INCA de número 873.732, datado de 21 de Novembro de 2014.

#### Objetivo da Pesquisa:

- Conforme Parecer Consubstanciado do CEP-INCA de número 873.732, datado de 21 de Novembro de 2014.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

- Conforme Parecer Consubstanciado do CEP-INCA de número 873.732, datado de 21 de Novembro de 2014.

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

- Conforme Parecer Consubstanciado do CEP-INCA de número 873.732, datado de 21 de Novembro de 2014.

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

- Conforme Parecer Consubstanciado do CEP-INCA de número 873.732, datado de 21 de Novembro de 2014.

#### Recomendações:

Não se aplica.

**Endereço:** RUA DO RESENDE, 128 - SALA 203  
**Bairro:** CENTRO **CEP:** 20.231-092  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3207-4550 **Fax:** (21)3207-4556 **E-mail:** cep@inca.gov.br



INSTITUTO NACIONAL DE  
CÂNCER/ INCA/ RJ



Continuação do Parecer: 918.354

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

- Trata-se da análise das respostas às pendências apontadas no Parecer Consubstanciado do CEP-INCA de número 873.732, datado de 21 de Novembro de 2014:

1. No TCLE:

1.1 - Este documento deverá ser dirigido diretamente às participantes de pesquisa. Solicita-se adequação.

RESPOSTA: O TCLE foi corrigido e criada uma nova versão 2.0 em 12 de dezembro de 2014. As alterações encontram-se destacadas na página 1 do documento.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

1.2 - Deverá apresentar um documento para cada grupo de participantes da pesquisa: grupo dos casos e grupo dos controles, com informações completas e pertinentes a cada um.

RESPOSTA: Foram criados 2 TCLEs nomeados como Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - Grupo Controle e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - Grupo Irradiado ambos em versão 2.0 de 12 de dezembro de 2014.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

1.3 - Deverá apresentar informação sobre o processo de obtenção do TCLE.

RESPOSTA: A informação foi inserida na página 1 em ambos os TCLEs.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

1.4 - Deverá coletar na história clínica dos participantes da pesquisa informações da história clínica a respeito das alterações de coagulação.

RESPOSTA: O texto foi alterado para "Caso você apresente história de outro sangramento anormal ou qualquer alteração nos exames que comprovem a boa coagulação sanguínea, não poderá ser submetida à biópsia de bexiga. A capacidade do sangue de coagular é avaliada em exame convencional, coletado usualmente no braço." Encontra-se na página 2 do TCLE do Grupo Controle e do Grupo Irradiado versão 2.0 de 12 de dezembro de 2014.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

1.5 - Deverá apresentar os riscos da coleta das amostras de sangue periférico.

**Endereço:** RUA DO RESENDE, 128 - SALA 203  
**Bairro:** CENTRO **CEP:** 20.231-092  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3207-4550 **Fax:** (21)3207-4556 **E-mail:** cep@inca.gov.br

Página 02 de 05



INSTITUTO NACIONAL DE  
CÂNCER/ INCA/ RJ



Continuação do Parecer: 918.354

RESPOSTA: Este item foi inserido e se encontra no TCLE do Grupo Controle e do Grupo Irradiado versão 2.0 de 12 de dezembro de 2014, conforme segue: "Como qualquer exame de sangue, pode estar sujeito a complicações locais, tais como dor e formação de hematoma. Tais complicações costumam ser leves e transitórias."

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

1.6 - Deverá apresentar o CEP-INCA.

RESPOSTA: O texto sugerido aceito: "O Comitê de Ética em Pesquisa do INCA é um órgão institucional que tem por objetivo proteger o bem-estar dos participantes da pesquisa. Se você tem perguntas sobre os seus direitos como um participante da pesquisa, você pode entrar em contato: Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto Nacional de Câncer. Endereço: Rua do Resende 128 sala 203, Centro, Rio de Janeiro. Contatos: cep@inca.gov.br Telefones: (21) 3207-4550/4556 – Horário de Atendimento: 09:00 às 16:00 horas."

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2. No Projeto de Pesquisa:

2.1 - São citados procedimentos de coagulação. Solicita-se esclarecimento sobre esta etapa do projeto.

RESPOSTA: Foi inserida uma nova informação na página 6 do protocolo versão 2.0 de 12 de dezembro de 2014 conforme segue: "Antes de ser submetida à avaliação endoscópica, cada paciente terá sua coagulação sanguínea avaliada através de coagulograma completo com aferição do tempo de protrombina ativada e do tempo de tromboplastina parcial em coleta de sangue periférico."

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2.2 - São citados procedimentos de sedação. Solicita-se esclarecimento sobre esta etapa do projeto.

RESPOSTA: Foi inserida uma nova informação na página 6 do protocolo versão 2.0 de 12 de dezembro de 2014 conforme segue: Não há necessidade de sedação para a realização dos procedimentos referidos.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2.3 - Solicita-se melhor adequação da faixa de idade maior de 18 anos e da capacidade cognitiva

Endereço: RUA DO RESENDE, 128 - SALA 203  
Bairro: CENTRO CEP: 20.231-092  
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO  
Telefone: (21)3207-4550 Fax: (21)3207-4556 E-mail: cep@inca.gov.br

Página 03 de 05



INSTITUTO NACIONAL DE  
CÂNCER/ INCA/ RJ



Continuação do Parecer: 918.354

das pacientes como critério de inclusão ou exclusão.

RESPOSTA: Foi inserida uma nova informação na página 5 do protocolo versão 2.0 de 12 de dezembro de 2014 conforme segue: "Pacientes acima de 18 anos de idade e com capacidade cognitiva para compreender e participar das etapas do estudo."

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2.4 - Solicita-se melhor esclarecimento se a variabilidade da dose de radioterapia externa acarretará influência no efeito deletério actínico na mucosa vesical.

RESPOSTA: Foi inserida uma nova informação na página 4 do protocolo versão 2.0 de 12 de dezembro de 2014 conforme segue: A dose da radioterapia externa deverá variar com o efeito deletério actínico na mucosa vesical em razão direta: quanto maior a dose, maior o dano. No entanto detalhes dessa relação não estão disponíveis na literatura.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

2.5 - Deverá esclarecer se haverá necessidade de vindas extras ao hospital com previsão de cobertura das despesas extras, caso haja necessidade.

RESPOSTA: Foi inserida uma nova informação na página 6 do protocolo versão 2.0 de 12 de dezembro de 2014 conforme segue: As pacientes não deverão comparecer ao hospital em caráter extraordinário.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

3. No Formulário de Submissão de Estudos no INCA:

3.1 - Falta a assinatura da chefia da Divisão de Anatomia Patológica (DIPAT) do INCA. Solicita-se adequação.

RESPOSTA: Segue o formulário com a assinatura da chefia da Divisão de Anatomia Patológica (DIPAT) do INCA.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

Endereço: RUA DO RESENDE, 128 - SALA 203  
Bairro: CENTRO CEP: 20.231-092  
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO  
Telefone: (21)3207-4550 Fax: (21)3207-4556 E-mail: cep@inca.gov.br



INSTITUTO NACIONAL DE  
CÂNCER/ INCA/ RJ



Continuação do Parecer: 918.354

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer (CEP-INCA), de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12 e na Norma Operacional N° 001/2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Ressalto o(a) pesquisador(a) responsável deverá apresentar relatórios semestrais a respeito do seu estudo

RIO DE JANEIRO, 17 de Dezembro de 2014

---

**Assinado por:**  
**Carlos Henrique Debenedito Silva**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** RUA DO RESENDE, 128 - SALA 203  
**Bairro:** CENTRO **CEP:** 20.231-092  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)3207-4550 **Fax:** (21)3207-4556 **E-mail:** cep@inca.gov.br

Página 05 de 05

Anexo 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, grupo controle:

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Grupo Controle

EXPRESSÃO DO FATOR INDUZIDO POR HIPÓXIA (HIF) E DO FATOR DE  
CRESCIMENTO DO ENDOTÉLIO VASCULAR (VEGF) EM BEXIGAS IRRADIADAS

Nome da voluntária: \_\_\_\_\_

Você foi convidada a participar de um estudo e por isso está recebendo este documento chamado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Antes de decidir se quer participar é importante que leia e compreenda o que está escrito nele. Após ler este documento, você deverá ter entendido o porquê você foi convidada a participar, o porquê este estudo está sendo realizado, assim como conhecer seus benefícios, riscos, implicações e como suas informações serão utilizadas. Caso não tenha entendido, eu Dr Ricardo Castellani estarei disponível para retirar todas as suas dúvidas.

Você foi diagnosticada com câncer do colo do útero e está sendo submetida a exames que avaliam o estágio da sua doença. Durante seu tratamento um dos recursos empregados poderá ser a Radioterapia do colo do útero, que pode resultar em complicações urinárias. Por isso está sendo convidada a participar de um estudo que envolve a pesquisa da expressão de determinadas proteínas em bexigas que já receberam radioterapia.



A Radioterapia, além de atacar as células do câncer, pode gerar alterações nos tecidos vizinhos que não estão doentes. Tais alterações envolvem a diminuição nos níveis de oxigênio nesses tecidos, num fenômeno que se chama hipóxia. Como resposta, as paredes internas da bexiga podem apresentar grande aumento no número de vasos sanguíneos. O fator induzido por hipóxia e o fator de crescimento do endotélio vascular podem estar envolvidos neste processo.

#### Objetivo Do Estudo

Esse estudo tem como objetivo avaliar a expressão do fator induzido por hipóxia e o fator de crescimento do endotélio vascular em bexigas irradiadas em pacientes tratadas com câncer de colo de útero.

#### Procedimentos Do Estudo

Se você decidir participar do estudo será encaminhada ao setor de Urologia do Hospital do Câncer 2 por ter sido diagnosticada com câncer de colo do útero, e estar realizando exames que avaliam o estágio da sua doença.

Caso você apresente história de sangramento anormal ou qualquer alteração nos exames que comprovam a boa coagulação sanguínea, não poderá ser submetida à biópsia de bexiga.

A capacidade do sangue de coagular é avaliada em exame convencional, coletado usualmente no braço. Como qualquer exame de sangue, pode estar sujeito a complicações locais, tais como dor e formação de hematoma. Tais complicações costumam ser leves e transitórias.

Ao ser submetida à avaliação endoscópica no setor de Urologia, serão realizadas biópsias da sua bexiga. Os fragmentos obtidos serão encaminhados ao Serviço de Patologia e ao Banco de tumores do INCA.

Além da análise dos fragmentos da biópsia, os dados contidos em prontuário também serão usados para caracterizar a população em estudo. Estes dados incluem data de seu nascimento, seu sexo, dados sobre sua saúde ou condição física/mental e detalhes do seu tratamento para o câncer de colo de útero.

O resultado será disponibilizado a você.

Para participar você deverá fornecer esse termo de consentimento livre e esclarecido para o uso de suas amostras de biópsia e dados de prontuário.

#### Riscos

O procedimento de biópsia da bexiga pode resultar em sangramento na urina. Não se espera que tal sangramento seja intenso ou demorado. No entanto, caso o sangramento encontrado no seu caso se prolongue, você será tratada no setor de Urologia do Hospital do Câncer 2.

#### Benefícios

Não há inicialmente nenhum benefício direto esperado. Este estudo pode contribuir para entendermos melhor as alterações que a radioterapia gera na bexiga e dessa forma diminuir o sangramento urinário que ocorre como complicação desse

tratamento. Se qualquer nova informação sobre o seu tratamento com relação ao resultado do estudo tornar-se disponível, você será informado.

### Caráter Confidencial Dos Registros

Seus registros médicos poderão ser consultados pelo Comitê de Ética em Seres Humanos do Instituto Nacional de Câncer INCA e pela equipe de pesquisadores envolvidos. Seu nome não será revelado ainda que informações de seu registro médico sejam utilizadas para propósitos educativos ou de publicação, que ocorrerão independentemente dos resultados obtidos.

### Custos

Não haverá qualquer custo ou forma de pagamento para o paciente pela sua participação no estudo.

### Bases da Participação

É importante que você saiba que a sua participação neste estudo é completamente voluntária e que você pode recusar-se a participar ou interromper sua participação a qualquer momento sem penalidades ou perda de benefícios aos quais você tem direito. Em caso de você decidir interromper sua participação no estudo, a equipe assistente deve ser comunicada e a coleta de amostras para os exames relativos ao estudo será imediatamente interrompida.

## Garantia De Esclarecimentos

Nós estimulamos a você ou seus familiares a fazer perguntas a qualquer momento do estudo. Neste caso, por favor, ligue para o Dr. Ricardo Castellani de Mattos no telefone (21) 9385-7007. Se você tiver perguntas com relação a seus direitos como participante do estudo clínico, também pode contar com uma terceira pessoa imparcial, o Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional do Câncer. O Comitê de Ética em Pesquisa do INCA é um órgão institucional que tem por objetivo proteger o bem-estar dos participantes da pesquisa. Se você tem perguntas sobre os seus direitos como um participante da pesquisa, você pode entrar em contato: Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto Nacional de Câncer. Endereço: Rua do Resende 128 sala 203, Centro, Rio de Janeiro. Contatos: [cep@inca.gov.br](mailto:cep@inca.gov.br) Telefones: (21) 3207-4550/4556 – Horário de Atendimento: 09:00 às 16:00 horas.

## Declaração De Consentimento E Assinatura

Li as informações acima e entendi o propósito deste estudo assim como os benefícios e riscos potenciais da participação no mesmo. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas foram respondidas. Eu, por intermédio deste, dou livremente meu consentimento para participar neste estudo.

Entendo que não receberei compensação monetária por minha participação neste estudo.

Eu recebi uma cópia assinada deste formulário de consentimento.

\_\_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

(Assinatura do Paciente)

dia    mês    ano

---

(Nome do Paciente – letra de forma)

Eu, abaixo assinado, expliquei completamente os detalhes relevantes deste estudo ao paciente indicado acima e/ou pessoa autorizada para consentir pelo paciente.

\_\_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

(Assinatura da pessoa que obteve o consentimento)      dia    mês    ano

---

(Nome da pessoa que obteve o consentimento – letra de forma)

Anexo 3 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, grupo irradiado:

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Grupo Irradiado

EXPRESSÃO DO FATOR INDUZIDO POR HIPÓXIA (HIF) E DO FATOR DE CRESCIMENTO DO ENDOTÉLIO VASCULAR (VEGF) EM BEXIGAS IRRADIADAS

Nome da voluntária: \_\_\_\_\_

Você foi convidada a participar de um estudo e por isso está recebendo este documento chamado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Antes de decidir se quer participar é importante que leia e compreenda o que está escrito nele. Após ler este documento, você deverá ter entendido o porquê você foi convidada a participar, o porquê este estudo está sendo realizado, assim como conhecer seus benefícios, riscos, implicações e como suas informações serão utilizadas. Caso não tenha entendido, eu Dr. Ricardo Castellani estarei disponível para retirar todas as suas dúvidas.

Você foi submetida à Radioterapia para o tratamento de câncer de colo de útero. Por isso está sendo convidada a participar de um estudo que envolve a pesquisa da expressão de determinadas proteínas em bexigas que já receberam radioterapia.

A Radioterapia, além de atacar as células do câncer, pode gerar alterações nos tecidos vizinhos que não estão doentes. Tais alterações envolvem a diminuição nos níveis de oxigênio nesses tecidos, num fenômeno que se chama hipóxia. Como resposta, as paredes internas da bexiga podem apresentar grande aumento no número de vasos sanguíneos. O fator induzido por hipóxia e o fator de crescimento do endotélio vascular podem estar envolvidos neste processo.

#### Objetivo Do Estudo

Esse estudo tem como objetivo avaliar a expressão do fator induzido por hipóxia e o fator de crescimento do endotélio vascular em bexigas irradiadas em pacientes tratadas com câncer de colo de útero.

#### Procedimentos Do Estudo

Se você decidir participar do estudo será encaminhada ao setor de Urologia do Hospital do Câncer 2 por ter sido submetida a Radioterapia como tratamento para câncer de colo do útero, podendo ou não apresentar sangramento urinário.

Caso você apresente história de outro sangramento anormal ou qualquer alteração nos exames que comprovam a boa coagulação sanguínea, não poderá ser submetida à biópsia de bexiga.

A capacidade do sangue de coagular é avaliada em exame convencional, coletado usualmente no braço. Como qualquer exame de sangue, pode estar sujeito a complicações locais, tais como dor e formação de hematoma. Tais complicações costumam ser leves e transitórias.

Ao ser submetida à avaliação endoscópica no setor de Urologia, serão realizadas biópsias da sua bexiga, de acordo com as alterações vasculares apresentadas. Os fragmentos obtidos serão encaminhados ao Serviço de Patologia e ao Banco de tumores do INCA.

Além da análise dos fragmentos da biópsia, os dados contidos em prontuário também serão usados para caracterizar a população em estudo. Estes dados incluem data de seu nascimento, seu sexo, dados sobre sua saúde ou condição física/mental e detalhes do seu tratamento para o câncer de colo de útero.

O resultado será disponibilizado a você.

Para participar você deverá fornecer esse termo de consentimento livre e esclarecido para o uso de suas amostras de biópsia e dados de prontuário.

#### Riscos

O procedimento de biópsia da bexiga pode resultar em sangramento na urina. Não se espera que tal sangramento seja intenso ou demorado. No entanto, caso o sangramento encontrado no seu caso se prolongue, você será tratada no setor de Urologia do Hospital do Câncer 2.

#### Benefícios

Não há inicialmente nenhum benefício direto esperado. Este estudo pode contribuir para entendermos melhor as alterações que a radioterapia gera na bexiga e dessa forma diminuir o sangramento urinário que ocorre como complicação desse



tratamento. Se qualquer nova informação sobre o seu tratamento com relação ao resultado do estudo tornar-se disponível, você será informado.

#### Caráter Confidencial Dos Registros

Seus registros médicos poderão ser consultados pelo Comitê de Ética em Seres Humanos do Instituto Nacional de Câncer INCA e pela equipe de pesquisadores envolvidos. Seu nome não será revelado ainda que informações de seu registro médico sejam utilizadas para propósitos educativos ou de publicação, que ocorrerão independentemente dos resultados obtidos.

#### Custos

Não haverá qualquer custo ou forma de pagamento para o paciente pela sua participação no estudo.

#### Bases da Participação

É importante que você saiba que a sua participação neste estudo é completamente voluntária e que você pode recusar-se a participar ou interromper sua participação a qualquer momento sem penalidades ou perda de benefícios aos quais você tem direito. Em caso de você decidir interromper sua participação no estudo, a equipe assistente deve ser comunicada e a coleta de amostras para os exames relativos ao estudo será imediatamente interrompida.

#### Garantia De Esclarecimentos

Nós estimulamos a você ou seus familiares a fazer perguntas a qualquer momento do estudo. Neste caso, por favor, ligue para o Dr. Ricardo Castellani de Mattos no telefone (21) 9385-7007. Se você tiver perguntas com relação a seus direitos como participante do estudo clínico, também pode contar com uma terceira pessoa imparcial, o Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional do Câncer. O Comitê de Ética em Pesquisa do INCA é um órgão institucional que tem por objetivo proteger o bem-estar dos participantes da pesquisa. Se você tem perguntas sobre os seus direitos como um participante da pesquisa, você pode entrar em contato: Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto Nacional de Câncer. Endereço: Rua do Resende 128 sala 203, Centro, Rio de Janeiro. Contatos: [cep@inca.gov.br](mailto:cep@inca.gov.br) Telefones: (21) 3207-4550/4556 – Horário de Atendimento: 09:00 às 16:00 horas.

#### Declaração De Consentimento E Assinatura

Li as informações acima e entendi o propósito deste estudo assim como os benefícios e riscos potenciais da participação no mesmo. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas foram respondidas. Eu, por intermédio deste, dou livremente meu consentimento para participar neste estudo.

Entendo que não receberei compensação monetária por minha participação neste estudo.

Eu recebi uma cópia assinada deste formulário de consentimento.

\_\_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

(Assinatura do Paciente)

dia    mês    ano

---

(Nome do Paciente – letra de forma)

Eu, abaixo assinado, expliquei completamente os detalhes relevantes deste estudo ao paciente indicado acima e/ou pessoa autorizada para consentir pelo paciente.

---

\_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

(Assinatura da pessoa que obteve o consentimento)

dia    mês    ano

---

(Nome da pessoa que obteve o consentimento – letra de forma)