

Sheldon Rodrigo Botogoski

**Estudo imunoistoquímico e morfométrico comparativo da imunoreatividade das proteínas TGF- $\beta$ , p53, p21 e p27 em pólipos e endométrio adjacente de mulheres após a menopausa usuárias de tamoxifeno**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Medicina.

São Paulo

2008

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

Sheldon Rodrigo Botogoski

**Estudo imunoistoquímico e morfométrico comparativo da imunoreatividade das proteínas TGF- $\beta$ , p53, p21 e p27 em pólipos e endométrio adjacente de mulheres após a menopausa usuárias de tamoxifeno**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Medicina.

**Área de Concentração:**

Tocoginecologia

**Orientadora:** Profa. Dra. **Sônia Maria Rolim Rosa Lima**

**Co-Orientadora:** Profa. Dra. **Maria Antonieta Longo Galvão**

São Paulo

2008

Para os louros, é preciso pagar seu preço.  
Para uma grande realização, é preciso sacrifício e dedicação.

**Hsing Yun**

## DEDICATÓRIA

Aos meus amigos, **Carlos Rodolfo Sandrini** e **José Eldir Ost**, grandes colaboradores, incentivadores, modelos de dedicação, exemplos de dignidade, caráter e ilimitado sacrifício no apoio aos meus estudos.

## AGRADECIMENTOS

Chegou o momento de expressar sinceros agradecimentos a muitos que se revelaram ao longo desse tempo e esta tese é o resultado desse processo de construção, pois sozinho, simplesmente não seria possível.

À minha orientadora Profa. Dra. **Sônia Maria Rolim Rosa Lima**, exemplo de mulher, mãe generosa, incansável na busca pela perfeição, sempre estimuladora, ensinando-me e dando a coragem de prosseguir e a buscar o brilho a que todos merecemos. Obrigado por sua amizade e minha homenagem em uma eterna admiração e imperecível reconhecimento.

À minha co-orientadora Profa. Dra. **Maria Antonieta Longo Galvão**, obrigado pelo carinho e sua imensa disposição em me receber sempre pronta a me fornecer explicações e ajuda.

Ao Prof. Dr. **Ismael Dale Cotrim Guerreiro da Silva**, obrigado pelo incentivo desde o início, fornecendo orientações valiosas para minha pesquisa sobre biologia molecular, bem como considerações extremamente importantes na ocasião do Exame de Qualificação.

Ao Prof. Dr. **Roberto Adelino de Almeida Prado**, meus agradecimentos por estes anos de convívio, por ter me aceito como aluno da Pós-Graduação, acreditado em mim e por suas ricas sugestões e considerações na ocasião do Exame de Qualificação.

À Profa. Dra. **Vivian Ferreira do Amaral**, querida amiga, pelo incentivo a este trabalho e estímulo que muito me ajudaram a superar as situações-limite, dando-me forças a seguir em frente. Agradeço também suas considerações na ocasião do Exame de Qualificação.

Ao Prof. Dr. **Laerte Justino de Oliveira**, obrigado por acreditar que eu seria capaz e incentivar-me a prosseguir em meus estudos, contagiando-me com seu entusiasmo, com suas idéias na área da pesquisa científica e seu enorme afeto.

Ao Prof. Dr. **Sérgio Bruno Bonatto Hatschbach**, os mais profundos agradecimentos por permitir que minha pesquisa fosse realizado no Serviço de Ginecologia e Mama do Hospital Erasto Gaertner ao qual por sua grande competência é responsável.

Ao Prof. Dr. **José Clemente Linhares**, os mais profundos agradecimentos por sua amizade, incentivo e torcida na conclusão desta tese.

Ao Prof. Dr. **Paulo Augusto Ayrosa Galvão Ribeiro**, pelas orientações e apoio na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. **Tsutomu Aoki**, diretor do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia e chefe da Clínica de Endoscopia Ginecológica e Endometriose da Santa Casa de São Paulo por eu poder realizar minha tese neste serviço.

À bibliotecária **Sadia Hussen Mustafa e auxiliares de biblioteca** por sua paciência incansável na busca das informações que precisava para realizar este trabalho.

Às **mulheres** que participaram voluntariamente nesta pesquisa, mesmo em um momento de fragilidade, souberam superar o medo e com muita disposição dando uma parcela de contribuição à pesquisa médica científica.

Aos meus queridos pais **Enio e Rosilda**, por suas sábias lições de esperança infundindo-me a confiança necessária para realizar os meus sonhos.

Aos meus irmãos **Thaís e Luiz Gustavo**, amigos de todas as horas e grandes incentivadores.

Aos **Colegas, Médicos e Pós-graduandos** do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Santa Casa de São Paulo pelo carinho e companheirismo ao longo destes anos.

Aos **Funcionários** do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Santa Casa de São Paulo pelo companheirismo e amizade.

À **Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo e Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo** por me acolherem.

Ao **Hospital Erasto Gaertner** e a todos os seus colaboradores por permitirem que parte deste trabalho fosse realizada nesta importante instituição de tratamento, ensino e pesquisa de pessoas com câncer no estado do Paraná.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	SERMs e Receptores de Estrogênio.....	2
1.2	Tamoxifeno.....	4
1.3	Pólipos Endometriais.....	5
1.4	Ciclo Celular.....	6
1.5	Fator de Crescimento.....	7
1.6	Ciclinas e Quinases Protéicas Dependentes Ciclinas.....	10
1.7	Proteínas Inibidoras.....	12
1.8	Método Imunoistoquímico.....	13
1.9	Método Morfométrico.....	14
1.10	Revisão da Literatura.....	15
2	OBJETIVO.....	20
3	CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	22
3.1	Crítérios de Inclusão.....	23
3.2	Crítérios de Exclusão.....	24
3.3	Metodologia.....	24
3.3.1	Ultra-Sonografia Transvaginal.....	24
3.3.2	Histeroscopia Diagnóstica.....	25
3.3.3	Histeroscopia Cirúrgica.....	26
3.3.4	Método Histopatológico.....	28
3.3.5	Método Imunoistoquímico.....	30
3.3.6	Método Morfométrico.....	32
3.4	Método Estatístico.....	33

4	RESULTADOS.....	34
4.1	Dados Clínicos.....	35
4.2	Ultra-Sonografia Transvaginal.....	36
4.3	Histeroscopia Diagnóstica e Cirúrgica.....	36
4.4	Método Histopatológico.....	37
4.5	Método Imunoistoquímico.....	41
5	DISCUSSÃO.....	55
6	CONCLUSÕES.....	66
7	ANEXOS.....	68
	Anexo 1.....	69
	Anexo 2.....	70
	Anexo 3.....	73
	Anexo 4.....	74
	Anexo 5.....	75
	Anexo 6.....	76
	Anexo 7.....	77
	Anexo 8.....	78
	Anexo 9.....	79
	Anexo 10.....	80
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
9	RESUMO.....	95
10	SUMMARY.....	97

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

a.a.	Aminoácido
AF	Ativação Transcrição
ATP	Adenosina Tri-Fosfato
CAK	Quinases Ativadoras das Ciclinas Dependentes das Quinases
CDK	Ciclinas Dependentes das Quinases
CKI	Inibidores das Ciclinas Dependentes das Quinases
cel/mm <sup>2</sup>	Células por Milímetro Quadrado
cm	Centímetros
cm <sup>3</sup>	Centímetro cúbico
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DUM	Data da Última Menstruação
EC	Estadiamento Clínico
et al	Entre Outros
FDA	Food and Drug Administration
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
g	Gramas
G1	Gap – Intervalo 1
G2	Gap – Intervalo 2
GH	Grau Histológico
HE	Hematoxilina Eosina
IMC	Índice de Massa Corporal
kDa	KiloDaltons
M	Mitose
mUI	Miliunidade Internacional
mHz	Mega Hertz
min	Minutos
mm	Milímetros
mmHg	Milímetros de Mercúrio
mL	Mililitros

mm <sup>2</sup>	Milímetro Quadrado
n	Número de Casos
pRb	Proteína do Retinoblastoma
p53	Proteína 53
p21	Proteína 21
p27	Proteína 27
P	Fosforilação
P.P.	Projeto de Pesquisa
RE	Receptor de Estrogênio
RE $\alpha$	Receptor de Estrogênio Alfa
RE $\beta$	Receptor de Estrogênio Beta
RNA	Ácido Ribonucléico
S	Síntese do DNA
SERMs	Moduladores Seletivos de Receptores Estrogênicos
TAF 1	Ativador Funcional de Transcrição 1
TAF 2	Ativador Funcional de Transcrição 2
TGF- $\beta$	Fator de Crescimento de Transformação Beta
TPM	Tempo de Pós Menopausa
TMX	Tamoxifeno
TRL	Tamoxifen Related Lesion – Alteração em Decorrência Tamoxifeno
x	Vezes
%	Porcentagem
$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
>	Maior
$\geq$	Maior ou Igual
°	Graus
–	Até
<	Menor

## **1. INTRODUÇÃO**

## 1.1 SERMs E RECEPTORES DE ESTROGÊNIO

Os Moduladores Seletivos de Receptores Estrogênicos (SERMs), configuram um grupo heterogêneo de compostos que podem ligar-se a receptores estrogênicos e terem efeitos tecido-específico exercendo em alguns tecidos função agonista e em outros apresenta a função antagonista ( Servy et al,1970; Mc Donnell,2000; Mc Donnell et al, 2001;National Institute of Health,2006).

Na década de 60 o receptor de estrogênio foi descrito e somente em 1986 foi divulgada sua seqüência de aminoácidos (Jensen, Jacobson, 1962; Greene et al, 1986). Entre os receptores descritos dois subtipos celulares são os mais conhecidos o Receptor de Estrogênio alfa - RE  $\alpha$  e o Receptor de Estrogênio beta - RE  $\beta$  Kuiper et al (1996); Mosselman et al (1996), que diferem entre si no número de aminoácidos e apesar de exibirem significativa homologia em seus domínios de ligação, não são equivalentes (Enmark et al, 1997) (Fig. 1). O RE  $\alpha$  é predominantemente encontrado no útero e na glândula mamária e o RE  $\beta$  é mais prevalente no sistema nervoso central, aparelho cardiovascular, trato urogenital, osso, pulmão e rim (Kuiper et al, 1997).

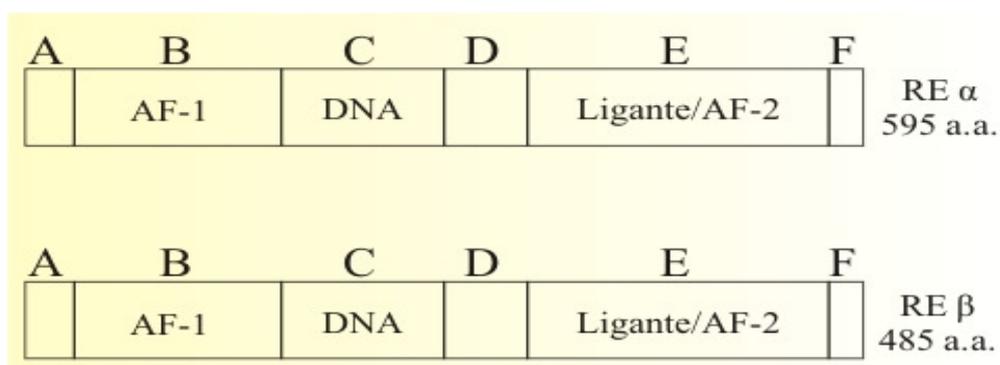


FIGURA 1: Receptores estrogênicos (RE) com suas seis regiões de A a F e cinco domínios estruturais de funções. A diferença entre os RE  $\alpha$  e RE  $\beta$  está na quantidade de aminoácidos. Os sítios de ativação da transcrição AF-1 é fixo ao contrário em AF-2 é variável dependendo da união com o ligante (modificado de Kuiper et al,1996).

Os domínios estruturais dos receptores estrogênicos apresentam funções específicas: na região aminoterminal A/B, o domínio regulador atua na área de fosforilação e ativação da transcrição AF-1(TAF-1); na região C, o domínio ligador de DNA exerce a função essencial para ativação da transcrição; na região D, o domínio região de dobradiça pode ser alterado sem interferir na função do receptor; na região E, o domínio ligador de hormônio tem ação para ligação dos co-fatores, dimerização e ativação da transcrição AF-2(TAF-2) e na região F, o domínio funciona como um modelador da transcrição dos estrogênios e antiestrogênios, com efeito, sobre a atividade da TAF-1 e TAF-2(Speroff & Fritz, 2005).

Através da biologia molecular foi possível conhecer melhor o mecanismo de ação hormonal no receptor estrogênico que seria:

- acoplamento do hormônio ao domínio de ligação hormonal que se encontra inativo pela ação das *heat shock proteins*;
- ativação do complexo hormônio-receptor pela alteração conformacional associada à separação das *heat shock proteins*;
- dimerização do complexo receptor-esteróide;
- acoplamento do dímero ao elemento de resposta esteroide do DNA através do domínio de ligação hormonal;
- estimulação da transcrição, mediada pelas TAF-1 e TAF-2 e influenciada pelas proteínas do contexto celular, e de fosforilação(Greene et al, 1986; Baker & Jaffe,1996).

Quando os receptores estrogênicos são ativados pelo hormônio esteróide, geram uma resposta, dependendo das diferentes afinidades aos vários tipos de SERMs(Servy et al,1970; Mosselman et al,1996) .

Observações clínicas claramente ilustram que os SERMs exercem comum e distinto efeito tecido-específico comparado aos estrogênios e que diferentes SERMs exibem seletividade no tecido( Kian Tee et al, 2004).

## 1.2 TAMOXIFENO

O Tamoxifeno (TMX), descrito por Arthur L. Walpole (Jordan, 1988) é SERM utilizado como tratamento adjuvante para mulheres com câncer de mama e receptor estrogênico positivo (Cohen et al, 1997; Siufi et al, 2003) e seu uso foi aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*), em 1977 (Haskell, 2003) (Fig. 2). No Brasil, aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, em 1996 (Brasil. Ministério da Saúde. ANVISA, 2005).

Caracteriza-se por ser uma substância lipossolúvel, com difusão livre através da célula e membrana nuclear, ligando-se aos RE no núcleo celular formando um metabólito hidroxilado (Ugwumagu et al, 1998). Apresenta um efeito antagonista no tecido mamário e agonista no tecido ósseo e endometrial (Baker & Jaffe, 1996; Kuiper et al, 1997; Tregón et al, 2003; Speroff & Fritz, 2005).

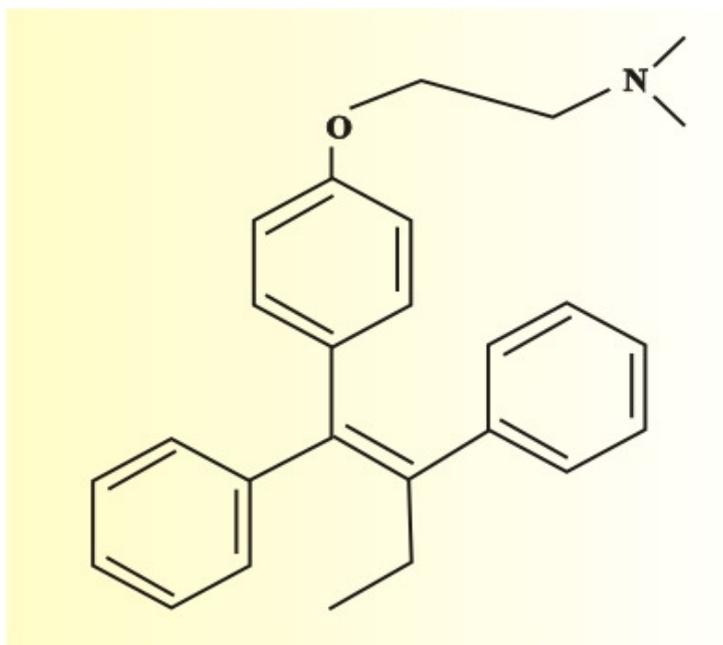


FIGURA 2: Estrutura química do tamoxifeno

(Modificado Haskell, 2003).

A indicação do TMX para o tratamento e prevenção do câncer de mama tem sido geralmente aceita como terapia endócrina de escolha (Baker & Jaffe, 1996; Kuiper et al, 1997, Kommoss et al, 1998; Elkas et al, 2000; Mourits et al, 2002).

Apesar de apresentar indicações precisas e específicas, o TMX no endométrio pode ocasionar aumento da incidência de proliferação de pólipos e risco de neoplasia endometrial (Assikis et al, 1996; Ugwumagu et al, 1998; Risberg et al, 2002; Stygar et al, 2003; Kian Tee et al, 2004).

### **1.3 PÓLIPOS ENDOMETRIAIS**

Os pólipos endometriais são neofomações benignas que se projetam da mucosa uterina, revestidos por epitélio e contêm quantidade variável de glândulas, estroma e vasos sanguíneos (Kurman & Mazur, 1994). Para o diagnóstico necessita do padrão estromal característico, vasos com paredes espessas e revestimento epitelial superficial em três de suas faces (Crum et al, 2006).

Em 80% dos casos são únicos podendo ser sésseis ou pediculados, com dimensões variáveis segundo Reslova (1999), podem estar localizados na porção cornual (29,4%), mas a grande maioria encontra-se na região fúndica (55,8%) (Pace et al, 1992; Bakour et al, 2002).

Segundo Kurman & Mazur (1994), histologicamente, os pólipos endometriais podem ser benignos (hiperplásico, funcional e atrófico) ou malignos (adenomioma polipóide atípico). O hiperplásico, mais frequentemente encontrado e sensível ao estímulo estrogênico. Já o atrófico é encontrado na mulher após a menopausa sendo a forma regressiva do pólipo hiperplásico e funcional. O pólipo funcional, menos freqüente, apresenta formas glandulares análogas às do endométrio que o circunda, dependendo do estímulo hormonal do ciclo menstrual.

Os pólipos que surgem nas mulheres usuárias do TMX são descritos como sendo diferentes daqueles usualmente encontrados no endométrio por apresentar características histológicas peculiares destacando a diferenciação epitelial aberrante, atividade proliferativa, condensação estromal focal periglandular sugerindo serem lesões intermediárias entre hiperplasia endometrial simples e câncer de endométrio. Há relatos de pólipos que apresentam volumes gigantes (Ismail, 1994; Menendez et al, 2004).

Segundo Tavassoli & Devilee (2003) os pólipos relacionados ao TMX diferem dos endometriais habituais por serem maiores, com base de implantação larga, geralmente no fundo uterino e frequentemente com aspecto em favo de mel. As glândulas apresentam em geral aspecto estrelado com metaplasia epitelial e estromal freqüentes.

#### **1.4 CICLO CELULAR**

A reprodução celular ocorre por uma série elaborada de eventos chamada de ciclo celular, onde cromossomos e outros componentes são duplicados. Os fenômenos do ciclo celular são ordenados, e a progressão de uma fase para outra só ocorrerá após o término e avaliação da fase precedente (Fig. 3). O produto final deverá ser duas células filhas com integridade genômica e com organelas íntegras, duplicadas e bem distribuídas (Koch & Nasmyth, 1994; Tregón et al, 2003).

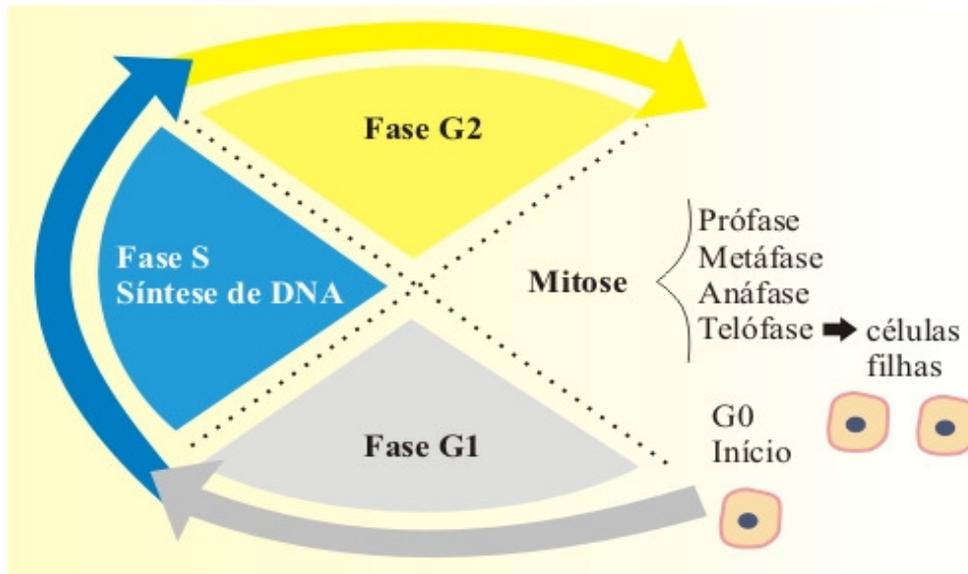


FIGURA 3: Ciclo celular: modelo esquemático do processo de divisão da célula. Fases funcionais: fase S (síntese do DNA) e mitose (separação do material em células-filhas). Fases preparatórias G1(intervalo 1 - *gap*) e G2 (intervalo 2 - *gap*) ajustam biologicamente as células para as fases seguintes.Cada fase só se inicia quando a anterior for completada (Lima et al, 2006).

O ciclo celular pode ser dividido em duas grandes etapas sucessivas: intérfase onde ocorre o crescimento celular e a preparação para uma nova divisão, e a mitose, com divisão do núcleo e citoplasma dando origem a duas células filhas (Hartwell & Weinert, 1989; Jordão & Andrade, 2005).

A mitose representa uma etapa no ciclo celular, mas é na intérfase que ocorre a duplicação dos componentes da célula-mãe e do DNA, e esta etapa gasta 95% do tempo da duplicação celular. A divisão da intérfase em três períodos sucessivos (G1, S e G2), ou a divisão do ciclo em quatro fases distintas, que são G1, S, G2 e M, possibilitou melhor estudo em cada uma delas (Glover et al, 1996).

No período S ocorre a duplicação ou síntese do DNA, daí o nome dessa fase. A abreviatura G provém do inglês *gap* que significa intervalo. O período G1 é o intervalo de tempo transcorrido desde o fim da mitose (M) até o início da síntese do DNA(S), também denominado período pós-mitótico ou pré-sintético. O G2 é o intervalo entre o término da síntese do DNA e a próxima mitose (Murray, 1995).

A fase G1 tem duração variável na maioria das células, pois é o período que mais sofre influência de fatores extracelulares, bem como inibidores e mutações do DNA que podem bloquear a proliferação. Esta fase apresenta como característica o reinício da síntese de RNA e proteínas, interrompidos na mitose, proporcionando crescimento celular. A grande importância está na decisão da célula em continuar proliferando-se ou entrar em repouso. Sinais extracelulares, como fatores de crescimento, desencadeiam respostas intracelulares que são monitoradas por controladores internos do ciclo, constituídas por componentes protéicos, que agem induzindo ou impedindo sua progressão (Glover et al, 1996).

## **1.5 FATOR DE CRESCIMENTO**

A ligação de um fator de crescimento com seus receptores específicos sejam na superfície da célula ou em seu interior, iniciam o processo de proliferação celular. Os fatores de crescimento atuam sinalizando de maneira endócrina, parácrina ou autócrina, mais comumente de maneira parácrina. O efeito parácrino se caracteriza pela propriedade de um fator produzido por um tipo celular apresentar ação nas células adjacentes (Campos, 1999).

O Fator de Crescimento de Transformação Beta (TGF- $\beta$  – *Transforming Growth Factor* –  $\beta$ ) faz parte de uma superfamília de proteínas diméricas secretadas e estruturalmente relacionadas que atuam como mediadores locais regulando as funções biológicas das células dos animais. A influência que exercem sobre as células em desenvolvimento envolve processos proliferativos, produção de matriz extracelular, diferenciação e morte. Nos adultos suas funções

são diferentes estando envolvidas a regulação imune e reparação de tecidos (Frolik et al, 1983; Roberts et al, 1983a; Sporn & Roberts, 1990; Sporn, 1999; Elkas et al, 2000; Gonçalves et al, 2004; Bachman & Park, 2005).

A história do TGF-  $\beta$  provém de questionamentos científicos do entendimento do processo fisiológico, entre os quais a inflamação e a resposta imune. Em 1970 com o descobrimento e isolamento desta molécula ocorreu um esforço subsequente em descrever sua atividade e defini-la individualmente como um fator de crescimento peptídico; observou-se que apresenta a propriedade de conferir transformação fenotípica, em células não malignas, dando capacidade destas crescerem em cultura (Sporn, 1999).

Estudando-se o fator de crescimento do Sarcoma em células normais de fibroblastos de ratos em meio de cultura, observou-se que o desenvolvimento celular era dependente de certos fatores que, após a purificação do extrato, constatou-se ser dois peptídeos responsáveis pelo desenvolvimento celular e foram denominados TGF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ , sendo esta a descrição mais original e importante (DeLarco, 1978). Novos estudos definiram que o fator responsável em causar o crescimento celular é o TGF-  $\beta$  (Roberts et al, 1983b). A primeira isoforma humana purificada, com definição estrutural, extraída de placenta humana, rim bovino, com peso molecular de 25 kDa e uma seqüência única de aminoácidos foi chamada de TGF-  $\beta$ 1 (Frolik et al, 1983; Roberts et al, 1983b).

Subsequentemente, a segunda isoforma, chamada de TGF-  $\beta$ 2 e isolada de osso bovino, células de glioblastoma humano mostrou ter uma seqüência diferente de aminoácidos do TGF-  $\beta$ 1. A terceira isoforma humana distinta, TGF-  $\beta$ 3, foi clonada e identificada também em galinhas. Entretanto a quarta e quinta isoformas já foram descritas, mas somente encontradas em animais como galinhas e rãs (Sporn & Roberts, 1990).

O TGF-  $\beta$  estimula o crescimento celular do tecido mesenquimal e apresenta potentes efeitos inibidores sobre células epiteliais, tecido linfóide e endotélio (Sun et al, 1994). Também regula a expressão da matriz protéica extracelular, as proteases que degradam a matriz, e os componentes envolvidos na adesão celular (Fig. 4) (Frolik et al, 1983; Kuiper et al, 1996; Ugwumagu et al, 1998; Bachman & Park, 2005).

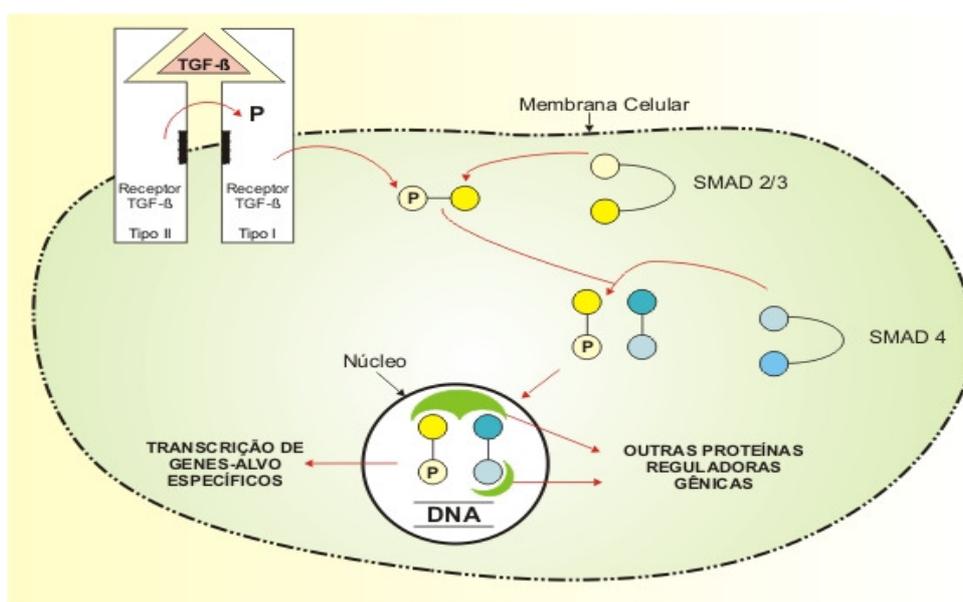


FIGURA 4: Modelo esquemático da via de sinalização demonstrando a ligação do TGF- $\beta$  no receptor de membrana tipo II que induz o recrutamento e fosforilação do receptor tipo I que fosforila SMAD 2 ou SMAD 3. Estes se ligam com SMAD 4, migram para o núcleo, recrutam outras proteínas reguladoras gênicas e ativam a transcrição de genes –alvo específicos (Modificado Alberts et al, 2004).

O TGF- $\beta$  também pode atuar através de um mecanismo celular autônomo por ação nas células cancerosas com promoção de invasão celular e a formação de metástases (Engle et al, 1999; Ye et al, 1999; Tremain et al, 2000). Muitos tumores avançados não somente adquirem resistência aos efeitos inibidores do crescimento do TGF- $\beta$ , mas também secretam um grande número de citocinas,

que constituem um fator prognóstico negativo em muitos tipos de câncer (Oft et al, 1998; Prunier et al, 1999; Park et al, 2000; Janji et al, 2000).

## **1.6 CICLINAS E QUINASES PROTÉICAS DEPENDENTES DAS CICLINAS**

Os sinais mitogênicos que levam a célula à divisão são controlados por mudanças na concentração intracelular e atividade de dois grupos de proteínas: as ciclinas e as quinases protéicas dependentes das ciclinas (*Cyclin-dependent kinase* - CDK) (Kuiper et al, 1996; Tregón et al, 2003).

As ciclinas são uma família diversa de proteínas que tem a característica de ligarem e ativarem as CDK. Muitas apresentam um padrão cíclico de acúmulo e degradação durante o ciclo celular e sua regulação ocorre primariamente pela expressão gênica e sua destruição se dá por proteólise ao final da mitose (Evans, 1983; Koepp et al, 1999). Foram descritas cerca de dez diferentes tipos em células animais, denominadas A, B, C, D, E, F, G, H, I e J sendo divididas em quatro classes, baseada na expressão e funções no ciclo da célula (Murray, 2004).

As três primeiras classes de ciclinas de G1/S (ciclinas E em vertebrados), ciclinas de S e ciclinas de M estão diretamente envolvidas na coordenação da progressão do ciclo celular. A quarta classe, ciclinas de G1 (ciclinas D em vertebrados), contribui para o controle de disparo de entrada da célula no ciclo celular em resposta a fatores extracelulares (Morgan, 1997).

Quinases protéicas dependentes das ciclinas formam um pequeno grupo de enzimas que dependem das mesmas para serem ativadas, caso contrário são inativas (Pavletich, 1999). Os complexos CDK-ciclina fosforilam um número de substratos protéicos, ou seja, transferem um fosfato de ATP para os aminoácidos serina ou treonina de outras proteínas, envolvidos na duplicação do DNA e formação do fuso mitótico, entre outros eventos (Russo, 1996).

Após o estímulo para a célula entrar em ciclo celular (G1, S, G2), existe uma maior concentração intracelular de ciclinas na fase inicial G1 (ciclinas D) e fase final G1/S (ciclinas E) que aumentam agudamente antes da entrada da célula para a fase S (Morgan, 2006).

O complexo CDK-ciclina D e CDK-ciclina E são controlados pelo padrão cíclico de acúmulo e degradação das ciclinas e por outro lado, este complexo pode ter sua eficiência aumentada pela ação de outras quinases protéicas que são as quinases ativadoras de CDK (*CDK activating kinase* - CAK) (Fig. 5). A ativação do complexo com a ciclina D fosforila a proteína do retinoblastoma, também pode ser ajudada pela ativação do complexo com a ciclina E sendo que esta fosforilação libera fatores transcricionais que são necessários para que a célula entre em fase S, com duplicação do DNA (Jackman et al, 2002; Ubersax et al, 2003).

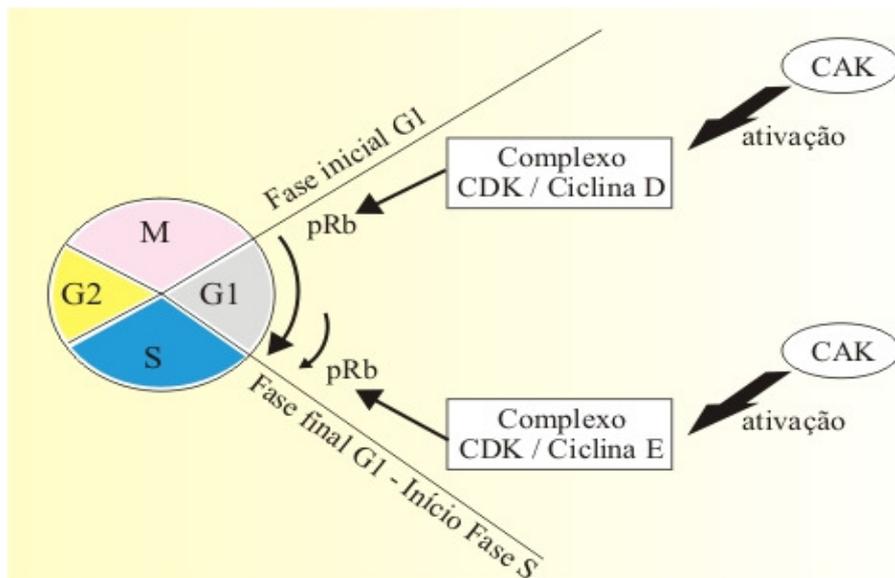


FIGURA 5: Representação esquemática da fosforilação da proteína do Retinoblastoma (pRb) durante a fase G1 do ciclo celular para a entrada da célula em fase S (síntese do DNA). O complexo CDK-Ciclina D é mais estimulado pela ativação por CAK (quinase ativadora de CDK) resultando na fosforilação da pRb (proteína do retinoblastoma) e da mesma maneira a CAK pode aumentar a eficiência do complexo CDK-Ciclina E contribuindo para maior fosforilação da pRb.

## 1.7 PROTEÍNAS INIBIDORAS

Sinais fisiológicos são capazes de impedir a proliferação celular e atualmente já foram identificados dois grupos destes inibidores das CDK (*Cyclin-dependent kinases inhibitor* - CKI). O primeiro grupo: as proteínas que inibem as ciclinas D e E que são as proteínas p21 e p27, serão abordadas neste estudo (Fig. 6) (Bunz et al,1998; Sherr & Roberts,1999).

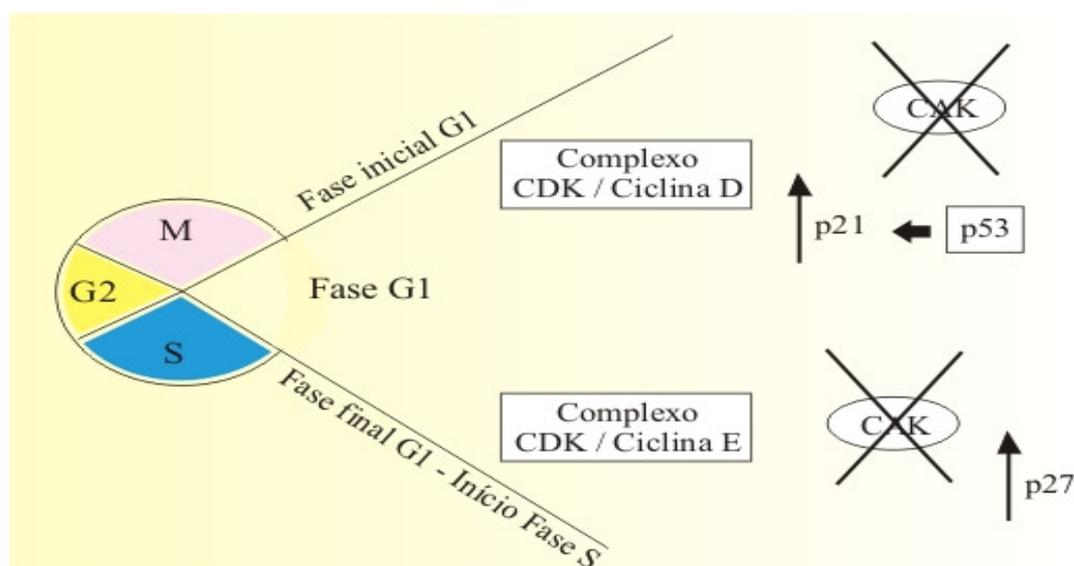


FIGURA 6: Inibidores das quinases protéicas dependentes das ciclinas (CKI). O aumento da p53, por lesão no DNA, leva a inibição da quinase ativadora de CDK (CAK) e aumenta expressão da p21 com conseqüente inibição do complexo CDK-ciclina, paralisando a célula em G1. O aumento expressão da p27, por fatores de crescimento, tem efeito semelhante.

Este grupo de proteínas inibidoras das quinases evita a ativação do complexo CDK-ciclina, interferindo em sua atividade e provocando a parada da célula em G1. Agentes que danificam o DNA levam o aumento da p53 e esta age como fator de transcrição sendo responsável à elevação dos níveis da p21 (Noda et al, 2002; Borges & Rehen, 2007).

Quanto à proteína p53, é uma fosfoproteína nuclear com massa molecular de 53 kDa (Vojtesek et al,1992), é expressa pelo gene p53, localizado no braço curto do cromossomo 17, o qual é considerado um gene supressor de tumor devido à sua função reguladora da proliferação celular (Lane, 1992; Shackelford et al, 1999; Bargonetti & Manfredi, 2002) e a proteína p53 está envolvida na apoptose (Nieder et al, 2001).

Dotto (2000) descreveu que a p21 é uma proteína com 21 kDa e sua redução drástica ou ausência total tem sido demonstrada em linhagem de células tumorais com deficiência da p53 ou contendo uma forma mutante não funcional desta (El-Deiry et al,1993). Além disto, estudos têm revelado que expressão decrescente da p21 é freqüente em cânceres gástrico, colo retal e endométrio (Liu et al,2001; Li et al,2001).

O aumento da p21 leva à inibição de todas as atividades essenciais das CDK, que contribui para paralisar a célula em G1. O acréscimo da p27 apresenta efeito semelhante ao p21, entretanto, a sua ativação é dada pela interação célula-célula e pelo TGF-  $\beta$  (Kato, 1999; Sgambato et al, 2000).

Toyoshima & Hunter (1994) descreveram que a p27 é uma proteína com 27 kDa clonada em fungos ; de onde vem a origem de seu nome.

## **1.8 MÉTODO IMUNOISTOQUÍMICO**

A imunoistoquímica surgiu com as pesquisas em imunopatologia que começaram na década de 1940, mas somente a partir da década de 1970 ganhou um sentido prático com utilização em maior escala. Com a criação dos anticorpos monoclonais, que proporcionam reagentes de alta especificidade, a técnica teve grande desenvolvimento e aumentou sua participação em pesquisas bem como no uso diagnóstico e prognóstico (Schmitt et al, 1992).

O princípio básico da imunistoquímica refere-se à capacidade de desenvolver anticorpos específicos para proteínas estranhas ao organismo. Em consequência de sua ação altamente específica para cada proteína são estes anticorpos denominados monoclonais (Schmitt et al, 1995).

As técnicas de coloração imunistoquímica permitem que se faça a visualização de antígenos por meio da aplicação seqüencial de um anticorpo específico do antígeno ou anticorpo primário, de um anticorpo secundário ao anticorpo primário, e de um complexo enzimático com um substrato cromogênico e etapas de lavagem de permeio. A ativação enzimática do complexo resulta em um produto de reação visível no local do antígeno. A amostra pode então ser contrastada e coberta com uma lamínula. Os resultados são interpretados por meio de um microscópio de luz, e ajudam a formular o diagnóstico diferencial dos processos fisiopatológicos, os quais podem ou não estar associados a antígenos específicos (Carvalho, 2006).

## **1.9 MÉTODO MORFOMÉTRICO**

Este método tem por função tornar mais objetiva e precisa a coleta, a apresentação e a análise dos resultados obtidos em pesquisas e na rotina de laboratório, permitindo ainda se relacionar as diferentes estruturas anatômicas com as funções (Montes et al, 1989).

Deve-se salientar que o emprego da morfometria evidentemente não invalida as consagradas técnicas de morfologia clássica, ou mesmo da análise qualitativa e semi-quantitativa empregadas pelos morfologistas e patologistas. A finalidade das técnicas de morfometria é de tornar mais objetiva e rápida a apresentação e a tabulação dos resultados obtidos em pesquisas e mesmo na rotina diagnóstica. A aplicação desta metodologia melhora a capacidade do patologista estabelecer o diagnóstico e freqüentemente até mesmo o prognóstico de alguns processos patológicos estudados.

## 1.10 REVISÃO DA LITERATURA

A freqüência dos pólipos endometriais na população geral varia entre 9% e 25% (Kurman & Mazur, 1994). Incidem preferencialmente em multíparas, com maior prevalência na perimenopausa ao redor dos 40 a 50 anos, aumentando progressivamente com a idade (Orvieto et al, 1999; Bakour et al, 2002; Van den Bosch et al, 2003; Campaner et al, 2006). Nas mulheres usuárias de TMX varia entre 8% e 36% (Gal et al,1991; Lahti et al, 1993; Kedar et al, 1994; Gibson et al, 1996; Reslová et al,1999).

No Brasil, Lima et al, (1979) estudando pólipos em 811 mulheres concluíram que a faixa etária de prevalência para o aparecimento foi de 40 a 50 anos. Melki & Tostes Filho(1992), estudando a incidência de pólipos endometriais por faixa etária, verificaram que 15,8% ocorreram entre os 45 a 54 anos e 13,6% em mulheres acima dos 54. Nas mulheres brasileiras usuárias de TMX, Feitosa et al, (2002) encontraram 26,6% de freqüência de pólipos endometriais e faixa etária de prevalência de 53 anos.

McGonigle et al (1998) estudando o endométrio de 35 mulheres após a menopausa tratadas com TMX com endométrio superior a 5 mm mensurado pela ultra-sonografia transvaginal foram submetidas a histeroscopia e os achados mais comuns foram pólipos endometrial em 65,7% seguido de endométrio atrófico cístico em 4,1%.

Kennedy et al (1999) em revisão de biópsia endometrial de 102 mulheres tratadas com TMX comparadas com 110 com terapia hormonal combinada demonstraram alta incidência de pólipos endometriais (40%) nas primeiras.

Gonçalves et al (2000) em estudo prospectivo de 20 mulheres com câncer de mama e usuárias de TMX comparado com 26 do grupo controle, foram avaliadas por histeroscopia associada à biópsia endometrial antes e após o uso do fármaco

e os achados mais freqüentes foram à atrofia cística em 75% e 11% de pólipos endometriais.

Nishimura et al (2001) em estudo com oito mulheres que desenvolveram câncer endometrial usuárias de TMX não demonstraram piora na sobrevida ou no tipo tumoral, mas foi observada em cinco (62,5%) delas a presença de pólipos endometriais.

Feitosa et al (2002) estudando trinta mulheres com câncer de mama e usuárias de TMX foram avaliadas por exame ultra-sonográfico, histeroscopia e biópsia endometrial e os achados mais freqüentes foram à atrofia cística em 46,6% seguida de pólipos em 26,6%.

O volume e as alterações histológicas também foram motivos de diversos estudos como o observado por Cascheto et al (2000) onde foi relatado dois casos de mulheres após a menopausa usuárias de tamoxifeno 20 mg/dia que desenvolveram pólipos endometriais de dimensões incomuns, sendo um com 9 cm e outro com 8 cm, laudados histologicamente como pólipos adenomatosos endometriais, sem alterações malignas. Ansbacher e Advincula (2003) em relato de caso de mulher após a menopausa usuária de TMX que desenvolveu pólipo endometrial de dimensão 9 x 3,2 cm e histologicamente ausente de malignidade após 11 meses de uso da medicação. Takeuchi et al (2005) relatou caso de mulher menopausada usuária de TMX que desenvolveu pólipo endometrial gigante e histologicamente diagnosticado como adenomiomatoso.

Em relação aos trabalhos em que foram avaliadas somente as alterações histológicas dos pólipos observamos que Bakour et al (2002) descreveram sete usuárias de TMX comparadas com 29 do grupo controle e observaram uma maior incidência de pólipos hiperplásicos, porém os resultados não foram estatisticamente significantes. Yamazawa et al (2002) em relato de caso de pólipo endometrial maligno em mulher usuária de tamoxifeno, concluiu que alterações

malignas nos pólipos podem ocorrer e em revisão literária encontrou 29 estudos que apresentavam os mesmos resultados.

Sington et al (2002) descreveram quatro casos de atipia citológica em pólipos endometriais, sendo que duas mulheres eram usuárias de TMX, e concluíram que a atipia pode representar um passo inicial no processo carcinogénico.

Savelli et al (2003), estudando 509 mulheres com pólipos endometriais e submetidas à histeroscopia cirúrgica encontraram taxa muito baixa de pólipos com hiperplasia e atipia ou malignos. Tendo observado também que a idade, tempo de menopausa e hipertensão como fatores adjuvantes podem aumentar o risco de pré-malignidade e pólipos malignos.

Foram também descritas metástase nos pólipos de mulheres com câncer de mama usuárias de tamoxifeno nos direcionando para esta outra possibilidade. Houghton et al (2003) relataram dois casos de carcinoma lobular metastático de mama em pólipo endometrial de mulheres após a menopausa usuárias de TMX e concluíram que a possibilidade de metástase nestes é rara. Acikalin et al (2005) no relato de caso de carcinoma ductal infiltrante de mama metastático em pólipo endometrial de mulher após a menopausa usuária de TMX revelou no exame histológico agrupamento de células em anel de cinete no estroma do mesmo.

Al-Brahim & Elavathil (2005) observaram o caso de carcinoma lobular de mama metastático em um ponto focal do pólipo endometrial de mulher após a menopausa usuária de TMX e concluíram que a análise histológica de todo o tecido sempre se torna necessária.

Achados semelhantes foram descritos por Tate et al (2004) que observaram em 515 mulheres japonesas usuárias de TMX, cinco casos de tipo histológico incomum de adenocarcinoma endometrial e que pólipos endometriais podem conter áreas de câncer endometrial.

Estudos relacionados ao fator de transformação de crescimento beta e pólipo endometrial não foram encontrados na literatura médica.

Menendez et al (2004), estudando a expressão da p27 descreveu que esta proteína parece ser essencial para o controle da proliferação normal do endométrio, e sua redução ou ausência pode ser um importante passo na carcinogênese endometrial.

O papel das proteínas envolvidas no ciclo celular também foi estudado por Eto (2006) analisando células em cultura e a questão de agentes quimiopreventivos no ajuste da expressão da p27 em células pré-neoplásicas ou neoplásicas de câncer de mama concluiu que eles atuam na regulação da proteína podendo levar a inibição do ciclo celular.

A análise da imuno-expressão da proteína p53 nos pólipos endometriais de mulheres após a menopausa foi demonstrado por Albuquerque Neto et al (2004) em tese de doutorado com 38 pólipos comparado com 20 do grupo controle que apresentavam endométrio atrófico e concluíram que esta proteína constitui um marcador da atividade biológica do pólipo endometrial.

Não encontramos na literatura estudos relacionados às proteínas p21 e p27 em pólipos endometriais, assim como não foram encontrados estudos das proteínas TGF  $\beta$ , p53, p21 e p27 em endométrio adjacente de pólipos.

Muitas drogas têm sido descobertas graças ao avanço na área de pesquisa para prevenção, cura ou controle de doenças, mas não isentas de riscos. O tamoxifeno, que é um medicamento usado para prevenção e na adjuvância do tratamento do câncer de mama em mulheres após a menopausa também pode apresentar efeitos colaterais e dentre eles o que nos interessa são os efeitos no endométrio, principalmente referente à formação de pólipos endometriais (Kurman

& Mazur, 1994; Kommoss et al, 1998; Elkas et al, 2000; Bakour et al, 2002; Mourits et al, 2002; Risberg et al, 2002; Stygar et al, 2003).

Sabemos que em mulheres após a menopausa com pólipos endometriais a expressão dos receptores de estrogênio e progesterona é significativamente maior quando comparado o epitélio glandular do pólipo com o endométrio adjacente assim como a expressão da proteína Ki67 (Carvalho, 2006). McGurgan et al, 2006, em usuárias de TMX após a menopausa, encontraram uma expressão reduzida no receptor de estrogênio e uma expressão elevada no receptor de progesterona e marcador de apoptose nos pólipos endometriais. De acordo com os dados apresentados, nos interessou saber se haveria diferença entre outros marcadores celulares que pudesse esclarecer a patogênese dos pólipos.

O estudo da biologia molecular dos fatores envolvidos na resposta endometrial que culminam com o aparecimento do pólipo é motivo de constantes questionamentos. Foram descritas alterações que podem levar estes pólipos a apresentarem câncer endometrial (Pace et al, 1992; Assikis et al, 1996; Bakour et al, 2002; Risberg et al, 2002). O enfoque específico de marcadores imunistoquímicos nos pólipos endometriais através da expressão do TGF-  $\beta$  e das proteínas p53, p21 e p27 ainda não foram descritos, assim é objetivo de nosso trabalho analisar o comportamento dessas proteínas nos pólipos endometriais e endométrio adjacente de mulheres usuárias de tamoxifeno, após a menopausa, visando colaborar com sua etiopatogenia ainda desconhecida.

## **2.OBJETIVO**

Verificar e comparar a expressão do TGF-  $\beta$  e das proteínas p53, p21 e p27 por estudo imunoistoquímico e morfométrico nos pólipos endometriais e no endométrio adjacente em mulheres usuárias de tamoxifeno após a menopausa.

### **3. CASUÍSTICA E MÉTODOS**

Foram incluídas para este estudo prospectivo 74 mulheres após a menopausa com diagnóstico de câncer de mama, usuárias de tamoxifeno (20mg/dia), que apresentavam diagnóstico de pólipos endometrial suspeito através da ultra-sonografia transvaginal, no período de abril 2005 a maio 2007 no Ambulatório de Mastologia do Hospital Erasto Gaertner – Curitiba – Paraná – Brasil. Destas 30 preencheram os critérios de inclusão. O diagnóstico de pólipos endometrial suspeito através de ultra-sonografia transvaginal foi comprovado pela histeroscopia diagnóstica, cirúrgica e estudo histopatológico (Anexo 1).

Todas as mulheres foram informadas e assinaram termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 2). O estudo foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Erasto Gaertner, P.P. n ° 1135/2005 (Anexo 3).

A menopausa foi definida como a parada definitiva da menstruação, resultante da perda da atividade folicular ovariana, diagnosticada após 12 meses consecutivos de amenorréia e FSH > 30 mUI/mL (*The North American Menopause Society*, 2002).

### **3.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO**

1. Mulheres com tumor maligno de mama primário usuárias de tamoxifeno.
2. Menopausa confirmada (DUM  $\geq$  um ano e FSH > 30 mUI/mL).
3. Mulheres com pólipos endometriais suspeitos através da ultra-sonografia transvaginal.
4. Pólipos endometriais e endométrio adjacente retirados através da histeroscopia e confirmado pelo estudo histopatológico.

## **3.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO**

1. Mulheres usuárias de terapia hormonal.
2. Mulheres usuárias de inibidores da aromatase.
3. Ultra-sonografia transvaginal anormal prévia ao uso do tamoxifeno.

## **3.3 METODOLOGIA**

### **3.3.1 ULTRA-SONOGRAFIA TRANSVAGINAL**

Nos exames ultra-sonográficos utilizou-se equipamento da marca *Hitachi*, modelo 405 acoplado a um transdutor setorial transvaginal convexo com frequência de 6,5 MHz. A mulher tendo esvaziado a bexiga, vestido um avental, foi colocada em posição ginecológica em uma mesa com suporte para as pernas e coberta. Em seguida introduzido na vagina o transdutor revestido por um preservativo de látex de borracha natural vulcanizada com enxofre.

Realizaram-se três movimentos primários do transdutor: movimento de lado a lado para imagens no plano sagital, movimentos ântero-posteriores para imagens em plano coronal e variação de profundidade para imagens do útero e anexos em vários graus de planos semicoronais.

O exame consistiu inicialmente da avaliação morfológica do útero e da cavidade uterina e do volume uterino, através das medidas no sentido dos seus eixos longitudinal, antero-posterior e transversos.

A mensuração do eco endometrial foi realizada, com a imagem congelada, no sentido ântero-posterior, em secções longitudinais do útero, incluindo as duas camadas endometriais, a partir da interface ecogênica da junção miométrio-endométrio, de um lado ao outro. Foi realizada medida, na maior espessura possível, desde a interface miométrio-endométrio da parede anterior do útero até a interface miométrio-endométrio da parede posterior.

O exame ainda avaliou morfológicamente os ovários e o volume ovariano através das medidas no eixo longitudinal, ântero-posterior e transversal (Kepple, 2000).

### **3.3.2 HISTEROSCOPIA DIAGNÓSTICA**

Nos exames histeroscópicos utilizou-se o microcolpo-histeroscópio de Hamou I e II, marca *Storz®*, *Germany*, constituído por óptica de 4.0 mm de diâmetro com ângulo de inclinação visual de 30° e camisa de 5.0 mm de diâmetro. Essa camisa possui um canal para passagem do meio distensor e cabo de fibra óptica flexível com 6.0 mm de diâmetro e 120 cm de comprimento.

Utilizou-se também um micro-histeroflator de Hamou (Hamou micro-histeroflator; *Storz®*). Para a distensão da cavidade uterina utilizou-se meio gasoso CO<sub>2</sub>(20 a 80 ml/min), com controle eletrônico do fluxo e da pressão de insuflação, fonte de luz *Xenon* de 300w e videocâmara (*Telecam NTSC*; *Storz®*).

O exame consistiu na avaliação da cavidade uterina, das características do endométrio, do diagnóstico da lesão pelo aspecto histeroscópico. Os pólipos endometriais foram definidos como lesão nodular de superfície lisa, consistência amolecida, sésil ou pediculada, única ou múltipla, com vascularização superficial. O aspecto da mucosa endometrial foi definido como com pregas, edemaciado branco-amarelado, fino cístico e fino esbranquiçado. As mulheres com diagnóstico de pólipo a histeroscopia diagnóstica foram submetidas imediatamente a histeroscopia cirúrgica para remoção completa da lesão e seu endométrio adjacente (Pinheiro et al, 1997).

### 3.3.3 HISTEROSCOPIA CIRÚRGICA

Os pólipos endometriais e o endométrio adjacente foram obtidos pela ressecção histeroscópica em ambiente cirúrgico com anestesia raquidiana, pelo pesquisador. Foi realizada dilatação do canal cervical com velas de Hegar até número oito quando a atrofia do canal impossibilitava a passagem do aparelho. Para a ressecção, utilizou-se equipamento *Storz®* com sistema óptico de 5.0 mm de diâmetro e ângulo de inclinação visual de 30°, inserido em elemento de trabalho acoplado a alça diatérmica, que perfaz um diâmetro total de 10 mm.

Para a distensão e lavagem contínua da cavidade foi utilizado solução de manitol a 3% infundido, usando bomba infusora com controle automático de fluxo e pressão intra-uterina *Endomat, Storz®, Germany*, a pressão variou de 80 a 100 mmHg e a lesão focal foi identificada e completamente removida; em seguida, foi realizada biópsia do endométrio adjacente sendo fixados em solução de formaldeído tamponado a 10% (Albuquerque Neto & Motta, 1997) (Fig.7, 8, 9 e 10).

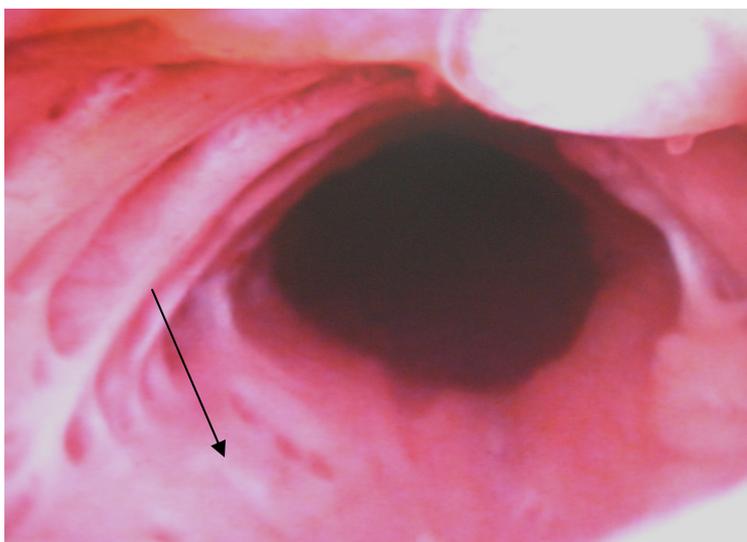


FIGURA 7: Canal endocervical. Observar na ponta da seta a atrofia do tecido (Caso 15).

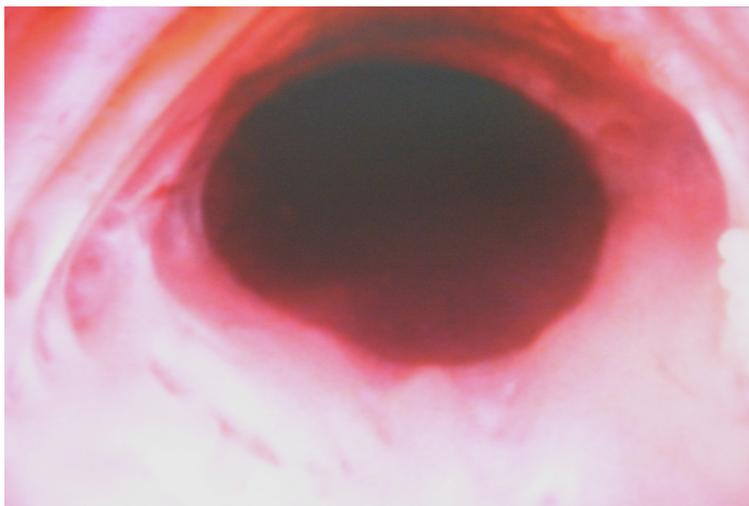


FIGURA 8: Óstio interno do colo uterino (Caso 15).

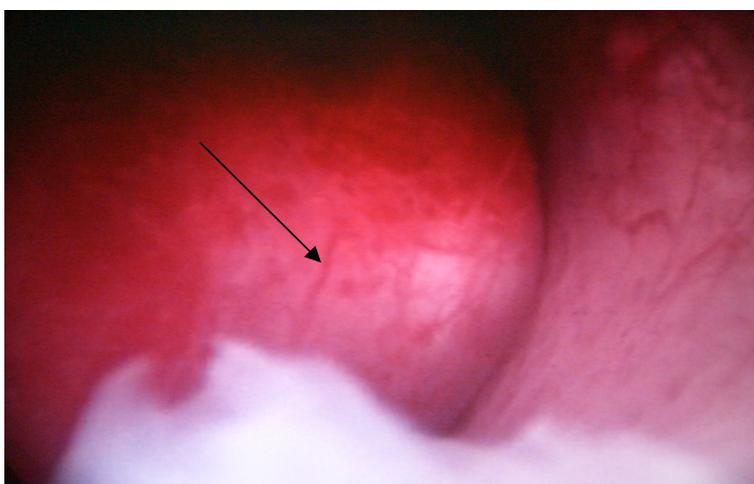


FIGURA 9: Pólipo endometrial. Observar na seta a presença de vaso na superfície (Caso 15).

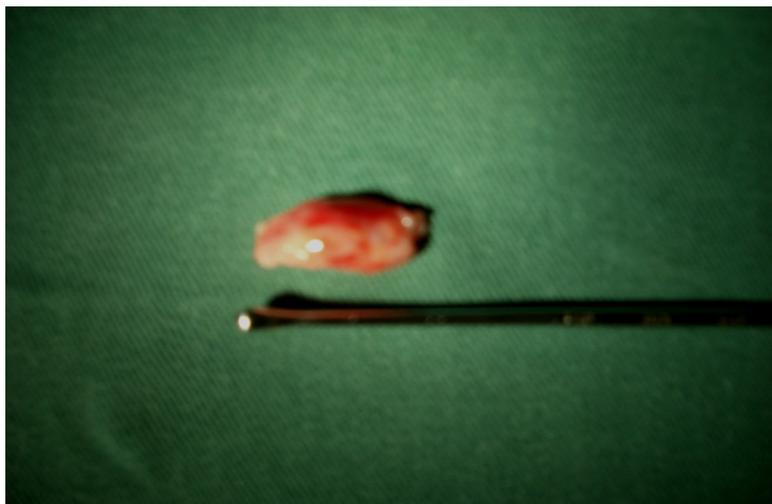


FIGURA 10: Pólipo endometrial de 1,5 cm (Caso 15).

### 3.3.4 MÉTODO HISTOPATOLÓGICO

O material obtido foi fixado em solução de formaldeído tamponado a 10% e desidratado em álcool etílico, diafinizado em xilol e embebidos em parafina para confecção dos blocos. Os espécimes foram processados no Serviço de Anatomia Patológica Professor Dr. Sérgio Ossamu Ioshii do Hospital Erasto Gaertner – Curitiba – Paraná.

Cortou-se o bloco parafinado em micrótomo rotativo de parafina em espessura aproximada de 4 micra, corando-o pela técnica de Hematoxilina de Harris e Eosina.

A solução de Hematoxilina de Harris é conseguida dissolvendo-se hematoxilina 0,5g no álcool absoluto 5 ml, e o alúmen de potássio 10g a quente na água. Misturam-se as duas soluções. Levar a mistura à ebulição o mais breve possível; depois remover do fogo e ajuntar o óxido vermelho de mercúrio 0,25g. Aquecer novamente a solução até ficar de cor vermelha escura, durante 1 minuto; em seguida, remover do fogo o recipiente e deixar esfriar rapidamente em água fria ou na geladeira.

A solução de eosina é conseguida dissolvendo eosina Y (amarela hidrossolúvel) 0,5g em água destilada 10 ml e juntar o álcool a 95º 90 ml. A adição do ácido acético 1 gota aumenta a intensidade da coloração. O diferenciador é conseguido com álcool a 95º 100ml e ácido clorídrico 5 gotas.

A seqüência de coloração foi:

- Desparafinar, alcoolizar e hidratar
- Hematoxilina durante 10 minutos
- Lavar em água corrente até azulecer os cortes
- Diferenciar rapidamente em álcool-ácido
- Lavar em água corrente, por 5 a 10 minutos
- Lavar rapidamente em álcool a 95º
- Eosina, por 1 a 2 minutos
- Diferenciar em álcool a 95º
- Desidratar, diafinizar e montar na lâmina com lamínula

Determinou-se o tipo histológico do pólipo e do endométrio adjacente através da leitura em microscópio óptico da marca *Nikon®*, modelo *Eclipse E- 400* (Brancroft & Stevens, 1977; Tolosa et al, 2003). Para a determinação anatomopatológica, foram adotados os critérios estabelecidos por Mazur & Kurman (1995), Tavassoli & Devilee (2003) e Crum et al (2006), conforme alterações estromais e glandulares bem estabelecidas na literatura, sendo o diagnóstico firmado por dois patologistas do Serviço.

As amostras dos pólipos, conforme as alterações glandulares presentes, foram classificadas em:

- Pólipo hiperplásico
- Pólipo atrófico
- Pólipo funcional
- Pólipo misto (endocervical – endometrial)
- Pólipo com alteração condizente, com efeito, hormonioterápico – *TRL (Tamoxifen Related Lesion)*

As categorias diagnósticas utilizadas para classificar os endométrios adjacentes foram:

- Atrofia endometrial, simples e cística
- Hiperplasia endometrial, simples e complexa
- Endométrio proliferativo
- Endométrio secretor
- Endométrio descamativo
- Endométrio misto (dissociação estrômato-glandular)
- Endométrio com alterações condizentes, com efeito, hormonioterápico – *TRL (Tamoxifen Related Lesion)*
- Endométrio não classificável

### **3.3.5 MÉTODO IMUNOISTOQUÍMICO**

Os blocos parafinados foram processados no Anticorpos Laboratório em Niterói – Rio de Janeiro para a técnica de imunoistoquímica.

Os blocos parafinados foram cortados em micrótomo rotativo de parafina e os cortes de 5 micra de espessura foram estendidos em lâminas previamente lavadas em solução sulfocrômica, emulsionadas com adesivo à base de poli - L - lisina ( *Poly-L Lysine*, marca *Sigma®*, USA, código P8920) a 10% e colocadas em estufa a 60° C durante 12 horas para melhor aderência destes às lâminas.

Depois de identificadas por cada anticorpo as lâminas voltaram à estufa a 60° C por 20 minutos e, a seguir, foram colocadas em três banhos de xilol por cinco minutos cada e em três banhos de álcool, durante cinco minutos cada, em concentrações decrescentes de 95%, 70% e 50%, conforme procedimento histotécnico usual, em temperatura ambiente. Em seguida a atividade da peroxidase endógena foi bloqueada através da imersão em peróxido de hidrogênio a 3% e metanol a 70% durante 20 minutos, então, as lâminas foram lavadas em água destilada.

Conforme os anticorpos a recuperação antigênica seguiu os procedimentos descritos nos *data-sheet* destes.

As lâminas dos anticorpos P27(diluição 1:250) marca *Dako*® código M7203, P53( diluição 1:250) marca *Dako*® código M7001, foram mergulhadas em tampão citrato de sódio a 0,01 mol com pH igual a 6.0 e as lâminas do anticorpo P21( diluição: 1:100) marca *Dako*® código M7202 foram mergulhadas em tampão EDTA/TRIS com pH igual a 9.0. Em seguida colocadas em câmara de pressão *PASCAL*® com o seguinte protocolo: pressão de 20 a 23 psi, temperatura 123° C durante 20 segundos. Esperar chegar a 90° C e pressão zero psi para continuar os procedimentos.

As lâminas do anticorpo TGF- $\beta$  (diluição 1:100) marca Santa Cruz *Biotechnology*®, INC código sc-90 foram mergulhadas em tampão citrato de sódio a 0,01 mol com pH igual a 6.0 em banho-maria a temperatura de 97,5° C por 40 minutos. Depois de retiradas do banho-maria foram deixadas resfriando em temperatura ambiente por 20 minutos.

Após esta etapa, as lâminas foram lavadas em água destilada e colocadas em tampão PBS pH 7,4 com *TWIN 20* marca *Sigma*® código P7949. A seguir os cortes foram circulados por uma caneta hidrofóbica da marca *Dako*® código S2002 para evitar que a solução com o anticorpo diluído escorresse, e incubadas com bloqueador de proteínas inespecíficas da marca *Dako*® código X0909 para inibir as reações inespecíficas, por 20 minutos. Foi somente escorrido o excesso e aplicados os anticorpos previamente diluídos em solução de *PBS-TWIN20* + BSA a 0,1% sendo que esta solução também possui a função de bloqueadora das proteínas inespecíficas. Após 40 minutos de reação em temperatura ambiente foi aplicado o kit da *Dako Advance*® código K4068, sendo que ao fim de cada etapa as lâminas são lavadas em tampão *PBS-TWIN20*.

A seguir foi adicionado o cromógeno DAB marca *Dako*® código K3466 por 30 segundos a no máximo 1 minuto. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água destilada e contra coradas em hematoxilina de Harris, azuladas em água corrente, desidratadas em álcool com concentrações crescente 50%, 70%, 90% e álcool puro

e depois quatro banhos de xilol e finalmente montadas com goma de Damar da marca *Proquímios®* para fixação das lamínulas e posterior observação ao microscópio óptico.

### **3.3.6 MÉTODO MORFOMÉTRICO**

Foram confeccionadas lâminas de cada amostra de pólo endometrial (quatro) e endométrio adjacente (quatro) para estudo imunoistoquímico, perfazendo total de 240. Cada lâmina preparada pela reação de imunoistoquímica específica foi avaliada por meio de microscópio de luz (*Axioskop 40 – Zeiss*), com objetiva de 400 vezes de aumento original, adaptado à microcâmara e monitor de vídeo (*LG Flatron 14 polegadas*). O cálculo da área em milímetros quadrados por campos de grande aumento foi feito com auxílio da câmara graduada de Neubauer, que consiste em lâmina espessa de vidro, de forma retangular, onde se encontra área reticulada central. Nesta, cada quadrado apresenta área de 0,0025 mm<sup>2</sup> (Lima et al, 1985). Por fim, calculou-se que um campo de grande aumento (400 vezes) corresponde a 0,094 mm<sup>2</sup>.

Conhecida a área examinada, contou-se o número de membranas com expressão da proteína TGF- $\beta$  e contaram-se o número de núcleos com expressão da proteína p53, p21 e p27, por campo de grande aumento, identificados pela coloração marrom sépia. Em cada corte foram registrados 10 campos de leitura em microscópio de luz.

A contagem celular foi determinada por área epitelial total definida e expressa como densidade numérica, isto é, o número de membranas celulares ou núcleos positivos corados por milímetro quadrado (mm<sup>2</sup>). A quantificação celular foi feita de maneira controlada e reprodutível. A contagem das células foi realizada por dois observadores conjuntamente, desconhecedores da identidade da mulher e de suas características clínicas.

### 3.4 MÉTODO ESTATÍSTICO

Utilizou-se o programa Microsoft Excel 2003 para arquivamento de informações e contagem de campos: pacote estatístico SPSS for Windows versão 12.0 para as análises estatísticas. A seguinte técnica estatística foi utilizada para análise dos dados em estudo.

Análises descritivas para as variáveis qualitativas, foram apresentadas em tabelas de frequência.

A associação entre as medidas obtidas em pólipos e endométrio adjacente foi avaliada com uso do coeficiente de correlação linear de Pearson.

As médias atingidas em pólipos e endométrio adjacente foram comparadas para cada uma das variáveis de interesse com o uso dos testes *t de Student* e *Kruskal-Wallis* para as amostras relacionadas.

## **4. RESULTADOS**

## 4.1 DADOS CLÍNICOS

A idade média da população estudada foi de  $61,7 \pm 9,2$  anos. O tempo transcorrido após a menopausa  $12,2 \pm 8$  anos. A idade da menopausa  $49,5 \pm 4,5$  anos. Da população em estudo, 29 (96,7%) eram da raça branca e 1 (3,3%) era parda. O número de gestações foi de  $2,7 \pm 2,5$  nas que relataram parto normal;  $0,4 \pm 0,7$  partos cesáreas e  $0,5 \pm 0,7$  abortamentos. Na análise do tempo de uso do tamoxifeno foi de  $25,3 \pm 13,6$  meses (Anexos 4 e 7).

O peso foi de  $67,3 \pm 10$  kg; a altura  $1,63 \pm 7$  m e o índice de massa corpórea  $25,3 \pm 3,5$ . Na análise da frequência de mulheres hipertensas antes de iniciarem a tomada do tamoxifeno encontramos que 6 (19,9%) com pressão arterial  $\geq 140/90$  mmHg e 24 (80,1%) apresentavam-se normotensas (Sociedade Brasileira de Cardiologia et al, 2006). Ao se analisar os níveis pressóricos no momento do procedimento histeroscópico encontramos que 6 (19,9%) hipertensas e 24 (80,1%) apresentavam pressão arterial normal (Anexo 4).

Na análise da frequência do estadiamento clínico (EC) encontramos 1 caso (3,3%) no EC zero; 13 (43,3%) no EC I; 10 (33,3%) no EC II; 6 (20%) no EC III (Anexo 5).

O tipo de cirurgia mais realizado foi a quadrantectomia com esvaziamento axilar 15 (50%) e a seguir com 14 (46,7%) a mastectomia radical modificada. Apenas 1 (3,3%) foi submetida a quadrantectomia com a técnica do linfonodo sentinela (Anexo 5).

O laudo anatomopatológico das cirurgias realizadas sobre a glândula mamária revelou que 20 (66,7%) tinham carcinoma ductal infiltrante; 3 (10%) carcinoma intraductal; 3 (10%) carcinoma lobular infiltrativo; 3 (10%) carcinoma mucinoso e 1 (3,3%) carcinoma medular infiltrante. O grau histológico (GH) II foi o mais encontrado com 24 (80%); 4 (13,3%) o GH I e finalmente 2 (6,7%) o GH III (Anexo 5). A avaliação dos linfonodos axilares acometidos demonstrou 22 (73,6%) das mulheres submetidas a esvaziamento axilar não tinham acometimento linfonodal e 8 (26,4%) apresentavam comprometimento de um ou mais linfonodos (Anexo 7).

Os resultados demonstraram que o tratamento adjuvante mais realizado foi 13 (43,3%) a radioterapia associada à hormonioterapia; 9 (30%) quimioterapia, radioterapia e hormonioterapia; 5 (16,7%) somente hormonioterapia e 3 (10%) quimioterapia e hormonioterapia. Na reatividade do receptor estrogênico 14 (46,7%) moderada; 11 (36,7%) forte e 5 (16,7%) fraca (Anexo 7).

## **4.2 ULTRA-SONOGRAFIA TRANSVAGINAL**

Na avaliação dos dados encontrados na ultra-sonografia transvaginal obtivemos que a espessura do endométrio foi de  $15,6 \pm 8,1$  mm. O volume uterino  $104,2 \pm 68,6$  cm<sup>3</sup>; o volume ovariano direito  $2,7 \pm 2,1$  cm<sup>3</sup> e o volume ovariano esquerdo  $2,4 \pm 1,6$  cm<sup>3</sup>. Quanto à ecotextura endometrial 30 (100%) eram heterogêneos. Na ecotextura miometrial obtivemos que 23 (76,7%) homogêneos sem leiomiomas; 2 (6,7%) heterogêneo com leiomioma de 1,5 cm; 1 (3,3%) heterogêneo com leiomioma de 2,8 cm; 1 (3,3%) heterogêneo com leiomioma 2,5 cm; 1 (3,3%) heterogêneo com leiomioma 2,4 cm; 1 (3,3%) heterogêneo com leiomioma de 1,3 cm e 1 (3,3%) heterogêneo com leiomiomas de 1,2 e 1,4 cm. Na avaliação da ecotextura ovariana direita 21 (70%) eram considerados atroficos; 7 (23,3%) homogêneos e 2 (6,7%) heterogêneos com cisto simples. A ecotextura ovariana esquerda demonstrou 22 (73,3%) eram atroficos e 8 (26,7%) homogêneos (Anexo 6).

## **4.3.HISTEROSCOPIA DIAGNÓSTICA E CIRÚRGICA**

Os achados histeroscópicos dos pólipos uterinos revelaram que 10 (33,4%) eram pólipos com 1,0 cm de tamanho; 7 (23,2%) de pólipos com 1,5 cm; 5 (16,7%) de pólipos com 0,5 cm; 3 (9,9%) pólipos com 3,0 cm; 2 (6,7%) pólipos com 2,0 cm; 2 (6,7%) pólipos com 4,0 cm e 1 (3,3%) com 3,5 cm. Quanto a localização no endométrio 9 (30%) no fundo uterino; 9(30%) na parede posterior; 6(20%) parede anterior e 6(20%) parede lateral direita (Anexo 6).

Os achados histeroscópicos do endométrio adjacente mostrou que 16 (53,3%) endométrio fino esbranquiçado; 10 (33,3%) endométrio fino cístico; 3 (10%)

endométrio edemaciado branco-amarelado e 1 (3,3%) endométrio com pregas (Anexo 6).

#### 4.4 MÉTODO HISTOPATOLÓGICO

A avaliação histológica dos 30 espécimes cirúrgicos incluídos no estudo confirmou pólipos endometriais e endométrio em todos os casos.

O diagnóstico anatomopatológico dos pólipos retirados por visão direta histeroscópica revelou que 16 (53,3%) eram atróficos; 8 (26,7%) atróficos /TRL (*Tamoxifen Related Lesion*); 4 (13,3%) hiperplásicos e 2 (6,7%) funcionais (Fig. 11, 12 e 13). No endométrio adjacente 11 (36,7%) apresentavam epitélio atrófico; 8 (26,7%) epitélio TRL; 5 (16,7%) epitélio atrofia cística; 2 (6,7%) epitélio proliferativo; 1 (3,3%) epitélio secretor; 1 (3,3%) epitélio descamativo; 1 (3,3%) epitélio hiperplasia simples e 1 (3,3%) epitélio hiperplasia complexa (Anexo 8) ( Fig. 14, 15, 16, 17 e 18).

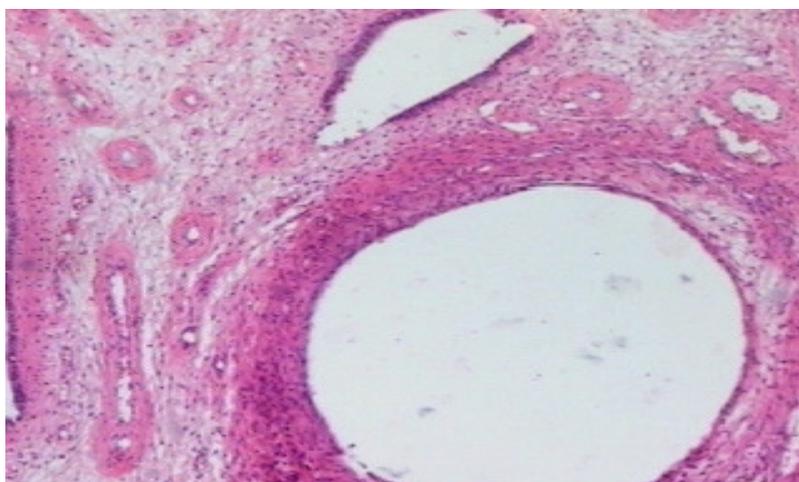


FIGURA 11: Corte histológico de pólipo endometrial atrófico (Hematoxilina Eosina – 100x). Caso 19. Hospital Erasto Gaertner – Curitiba – 2007.

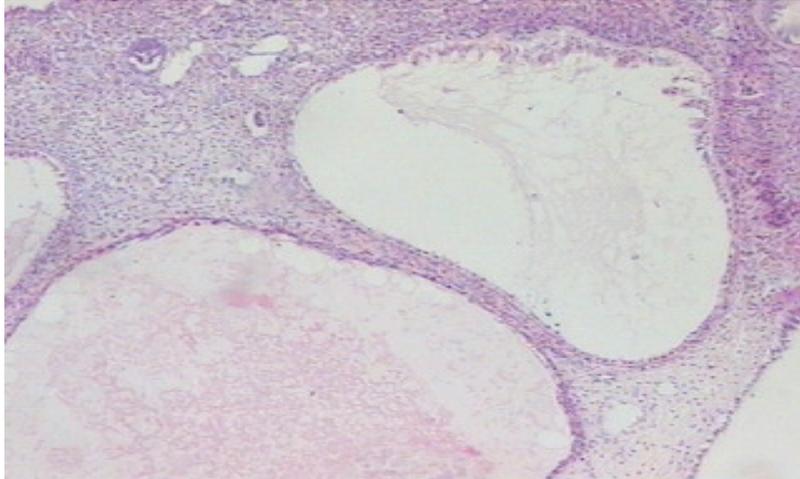


FIGURA 12: Corte histológico de pólipo atrófico/TRL (Hematoxilina Eosina - 100 x). Caso 10. Hospital Erasto Gaertner – Curitiba – 2007.

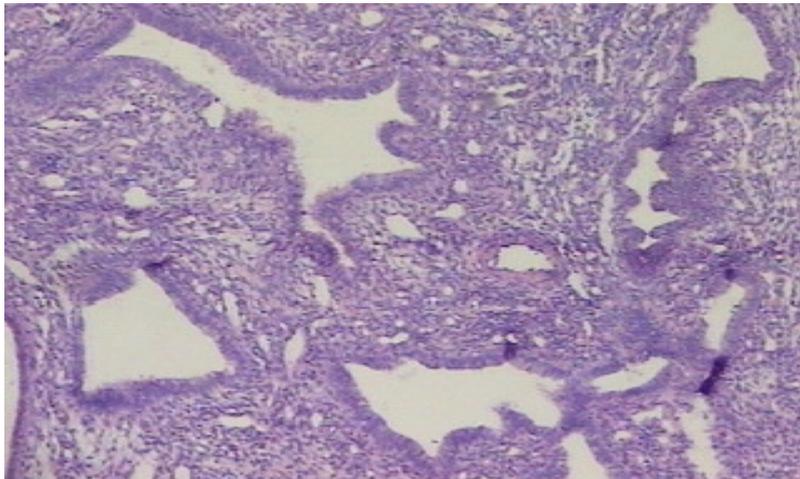


FIGURA 13: Corte histológico de pólipo hiperplásico (Hematoxilina Eosina - 100x). Caso 22. Hospital Erasto Gaertner – Curitiba – 2007.

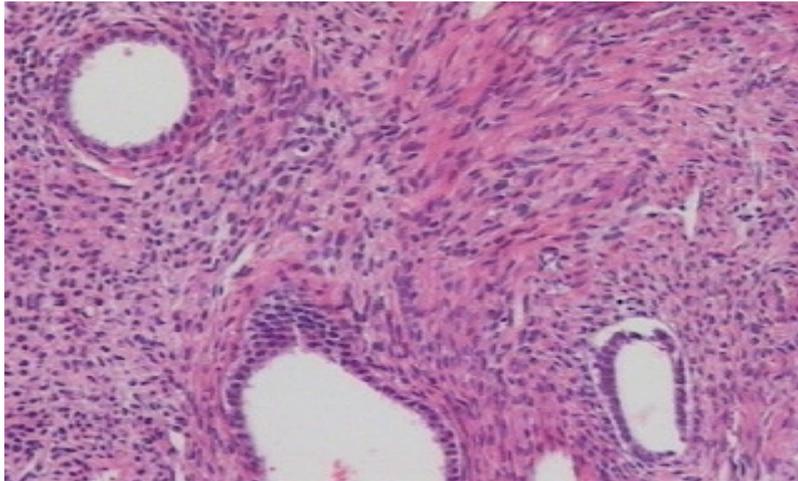


FIGURA 14: Corte histológico de endométrio adjacente: epitélio atrófico (Hematoxilina Eosina - 100x). Caso 1. Hospital Erasto Gaertner – Curitiba – 2007.

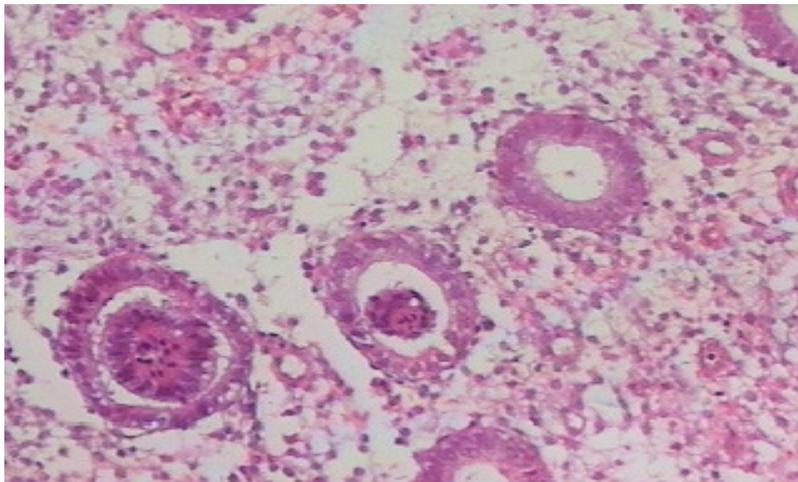


FIGURA 15: Corte histológico de endométrio adjacente: epitélio TRL (Hematoxilina Eosina - 200x). Caso 5. Hospital Erasto Gaertner – Curitiba – 2007.

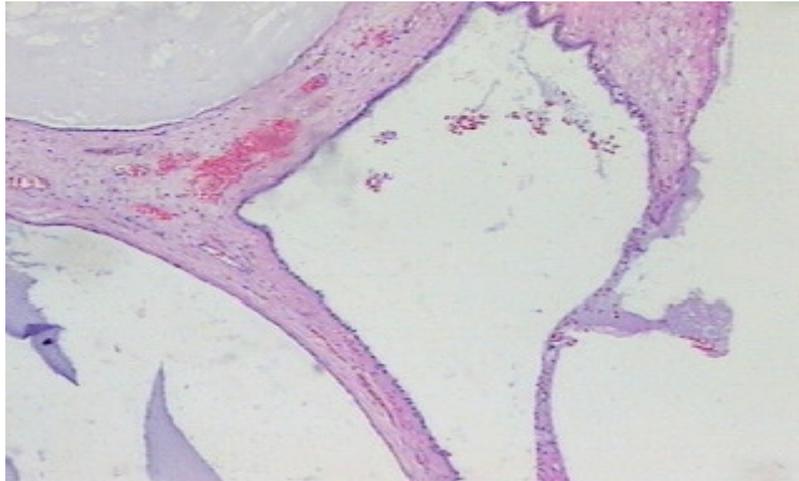


FIGURA 16: Corte histológico de endométrio adjacente: epitélio atrofia cística (HE - 100x).Caso 28.  
Hospital Erasto Gaertner – Curitiba – 2007.

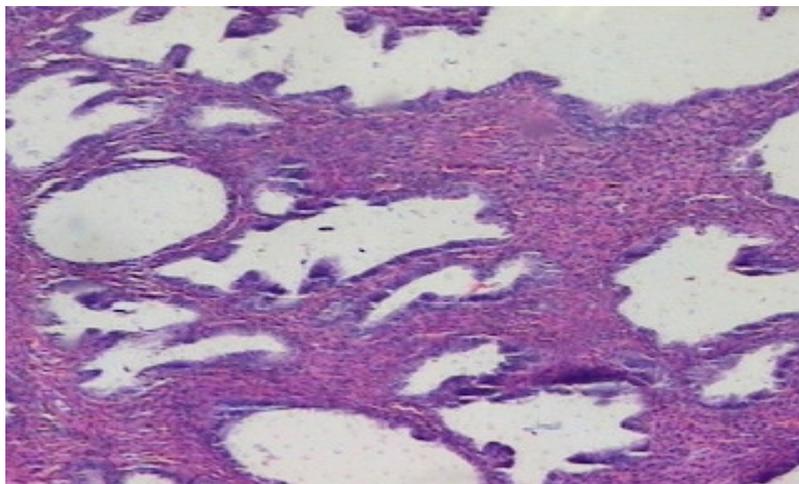


FIGURA 17: Corte histológico de endométrio adjacente: epitélio hiperplasia simples (HE - 100x). Caso 27.  
Hospital Erasto Gaertner – Curitiba – 2007.

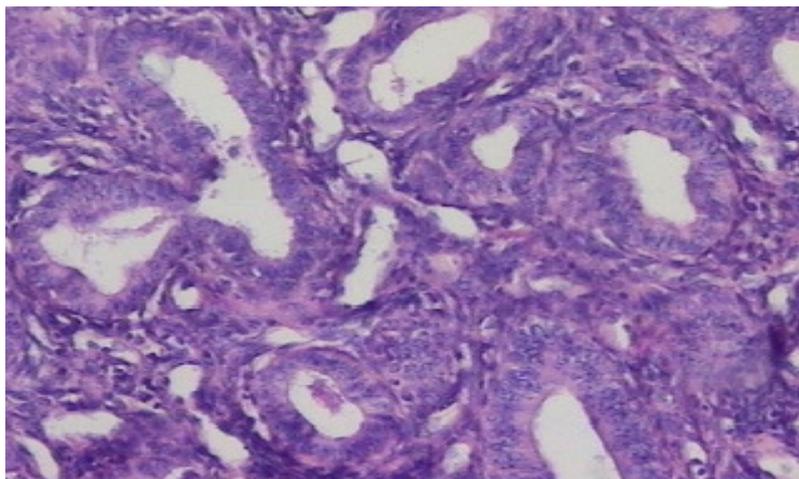


FIGURA 18: Corte histológico de endométrio adjacente: epitélio hiperplasia complexa (HE – 400x). Caso 16. Hospital Erasto Gaertner – Curitiba – 2007.

#### 4.5 MÉTODO IMUNOISTOQUÍMICO

O TGF- $\beta$  e as proteínas p53, p21 e p27 marcados pela reação de imunohistoquímica por meio da utilização de marcadores específicos foram identificados pela coloração marrom sépia das células (Fig. 19, 20, 21 e 22).

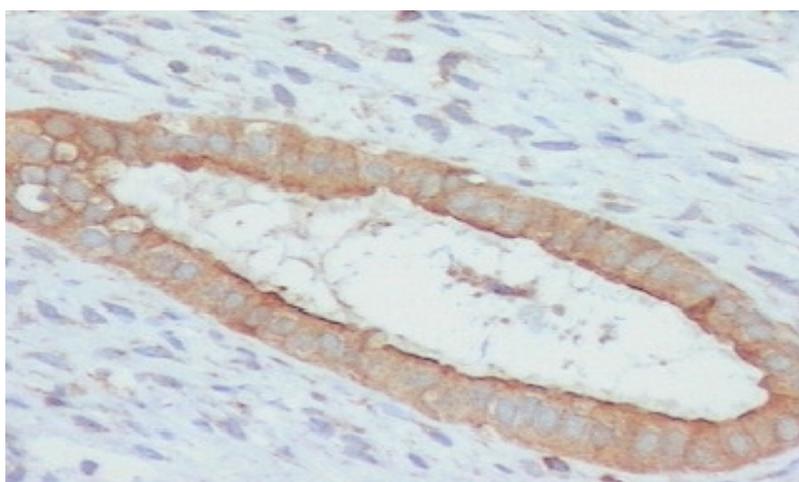


FIGURA 19: Corte histológico de pólipo endometrial com expressão do TGF- $\beta$  no epitélio glandular: observar a coloração marrom sépia da membrana celular e os núcleos não corados(400x). Serviço de Anatomia Patológica – ISCMSP – 2007.

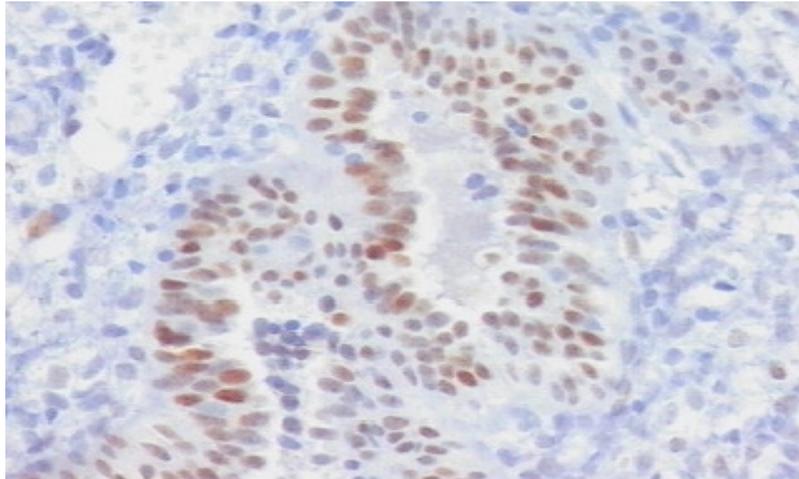


FIGURA 20: Corte histológico de pólipo endometrial com expressão da p53: observar a coloração marrom sépia em alguns núcleos do epitélio glandular, citoplasma e membrana celular não corados (400x). Serviço de Anatomia Patológica – ISCMSP – 2007.

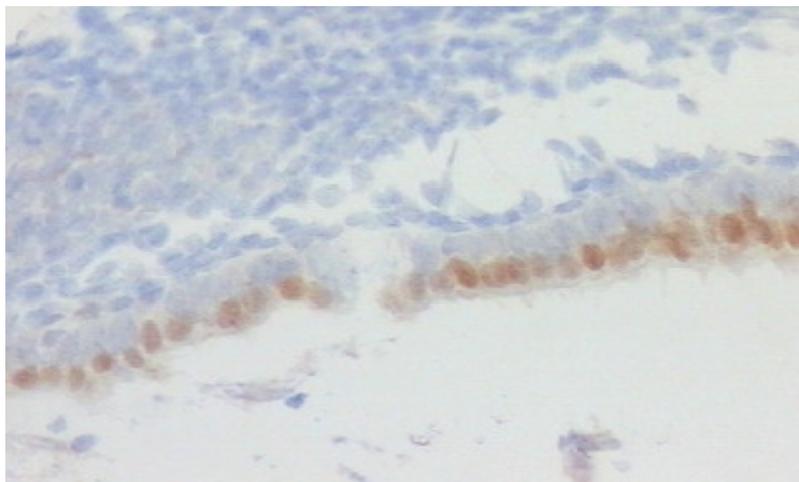


FIGURA 21: Corte histológico de pólipo endometrial com expressão da p21: observar a fraca coloração marrom sépia no núcleo do epitélio glandular. Citoplasma e membrana celular não corados (400x). Serviço de Anatomia Patológica – ISCMSP – 2007.

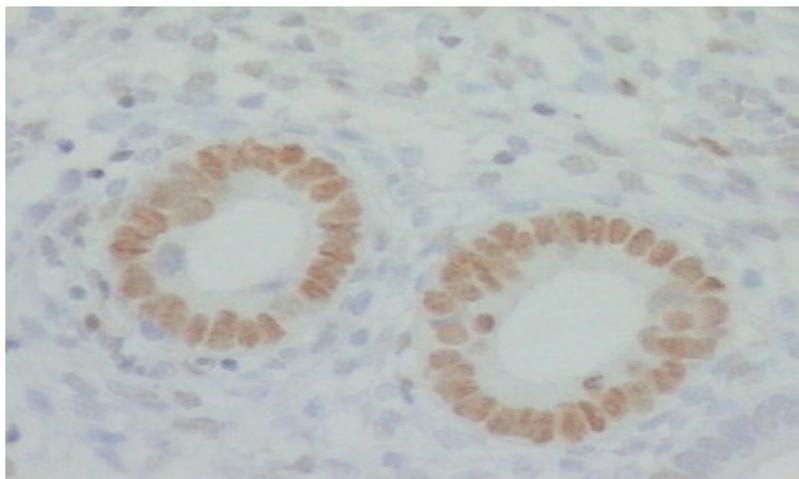


FIGURA 22: Corte histológico com expressão da p27: observar a coloração marrom sépia no núcleo do epitélio glandular sendo citoplasma e membrana celular não corados ( 400x).  
Serviço de Anatomia Patológica – ISCMSP – 2007.

Quanto à distribuição da concentração média de células imunocoradas da proteína TGF- $\beta$  no pólipo epitélio glandular e estroma foi de  $62,63 \pm 4,57$  cel/mm<sup>2</sup> e endométrio adjacente epitélio glandular e estroma foi de  $62,10 \pm 12,01$  cel/mm<sup>2</sup>.

Para a proteína p53 no pólipo epitélio glandular foi de  $3,23 \pm 3,39$  cel/mm<sup>2</sup> e estroma não houve células imunocoradas. No endométrio adjacente o epitélio glandular variou  $1,90 \pm 1,80$  cel/mm<sup>2</sup> e estroma não houve células imunocoradas.

Na distribuição da concentração média de células da proteína p21 no pólipo epitélio glandular foi de  $23,53 \pm 20,99$  cel/mm<sup>2</sup> e estroma  $15,93 \pm 14,81$  cel/mm<sup>2</sup>. Já no endométrio adjacente o epitélio glandular variou  $11,93 \pm 16,86$  cel/mm<sup>2</sup> e estroma  $7,47 \pm 11,15$  cel/mm<sup>2</sup>.

Para a proteína p27 no pólipo epitélio glandular foi de  $24,27 \pm 18,67$  cel/mm<sup>2</sup> e estroma  $19,23 \pm 15,22$  cel/mm<sup>2</sup>. No endométrio adjacente o epitélio glandular foi de  $17,73 \pm 18,46$  cel/mm<sup>2</sup> e estroma  $13,60 \pm 14,34$  cel/mm<sup>2</sup> (Anexos 9 e 10) (Tabela 1).

**TABELA 1** Distribuição da concentração média e desvio padrão (cel/mm<sup>2</sup>) das proteínas TGF- $\beta$ , p53, p21 e p27 nos pólipos e endométrio adjacente pela quantificação de células positivas da expressão destes antígenos.

Serviço de Anatomia Patológica - ISCMSP, 2007

<b>células/mm<sup>2</sup></b>	<b>Pólipo</b>	<b>Endométrio adjacente</b>
<b>TGF-<math>\beta</math></b>		
Epitélio Glandular	62,63 (4,57)	62,10 (12,01)
Estroma	62,63 (4,57)	62,10 (12,01)
<b>p53</b>		
Epitélio Glandular	3,23 (3,39)	1,90 (1,80)
Estroma	0,0	0,0
<b>p21</b>		
Epitélio Glandular	23,53 (20,99)	11,93 (16,86)
Estroma	15,93 (14,81)	7,47 (11,15)
<b>p27</b>		
Epitélio Glandular	24,27 (18,67)	17,73 (18,46)
Estroma	19,23 (15,22)	13,60 (14,34)

Foram analisadas as expressões das proteínas TGF- $\beta$ , p53, p21 e p27 em relação ao tempo transcorrido após a menopausa (1-|5, 6-|10, > 10 anos); tanto no pólipo quanto no endométrio adjacente e não se encontrou diferença estatística significativa em nossa população (Tabelas 2 e 3).

**TABELA 2** Distribuição da concentração média e desvio padrão (cel/mm<sup>2</sup>) das proteínas TGF- $\beta$ , p53, p21 e p27 no pólipo segundo tempo de pós menopausa. Serviço de Anatomia Patológica - ISCMSP, 2007

cel/mm <sup>2</sup>	TPM*			p**
	1-  5	6 –  10	> 10	
<b>TGF-<math>\beta</math></b>				
Ep. Glandular	62,67 (6,24)	62,75 (4,27)	62,59 (3,87)	0,998
Estroma	62,67 (6,24)	62,75 (4,27)	62,59 (3,87)	0,998
<b>p53</b>				
Ep. Glandular	2,44 (1,59)	5 (5,41)	3,24 (3,59)	0,471
Estroma	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	
<b>p21</b>				
Ep. Glandular	19,67 (20,35)	46 (13,29)	20,29 (20,32)	0,066
Estroma	15,11 (16,66)	31 (11,16)	12,82 (12,95)	0,081
<b>p27</b>				
Ep. Glandular	23,89 (21,02)	16,75 (17,09)	26,24 (18,39)	0,672
Estroma	15,44 (14,65)	13,75 (16,07)	22,53 (15,40)	0,406

TPM\* = Tempo de Pós Menopausa (anos)

p\*\* <0,05 (Kruskall-Wallis)

**TABELA 3** Distribuição da concentração média e desvio padrão (cel/mm<sup>2</sup>) das proteínas TGF- $\beta$ , p53, p21 e p27 no endométrio adjacente segundo tempo de pós menopausa.

Serviço de Anatomia Patológica - ISCMSP, 2007

cel/mm <sup>2</sup>	TPM*			p**
	1-  5	6 –  10	> 10	
<b>TGF-<math>\beta</math></b>				
Ep. Glandular	55 (20,36)	67 (3,16)	64,71 (3,27)	0,097
Estroma	55 (20,36)	67 (3,16)	64,71 (3,27)	0,097
<b>p53</b>				
Ep. Glandular	1,56 (1,23)	2,50 (1,73)	1,94 (2,10)	0,693
Estroma	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	
<b>p21</b>				
Ep. Glandular	18,78 (17,07)	1,75 (1,70)	10,71 (17,7)	0,225
Estroma	10,44 (10,78)	1,25 (1,89)	7,35 (12,32)	0,403
<b>p27</b>				
Ep. Glandular	21,78 (19,22)	25,25 (28,01)	13,82 (15,69)	0,409
Estroma	17,33 (14,60)	17,25 (20,61)	10,76 (12,91)	0,480

TPM\* = Tempo de Pós Menopausa (anos)

p\*\* <0,05 (Kruskall-Wallis)

Ao se fazer a relação entre a expressão das proteínas TGF- $\beta$ , p53, p21 e p27 e o índice de massa corporal (IMC) – separando os grupos entre mulheres com IMC até 24,9 (Grupo I) e mulheres com IMC  $\geq$  25 (Grupo II) – não foram estabelecidas diferenças significativas entre esses grupos (Tabelas 4 e 5).

**TABELA 4** Distribuição da concentração média e desvio padrão (cel/mm<sup>2</sup>) das proteínas TGF- $\beta$ , p53, p21 e p27 no pólipo segundo seu índice de massa corporal (IMC).  
Serviço de Anatomia Patológica - ISCMSP, 2007

cel/mm <sup>2</sup>	Pólipo		p*
	Grupo I n=13	Grupo II n=17	
<b>TGF-<math>\beta</math></b>			
Ep. Glandular	63,23 (4,74)	62,18 (4,53)	0,541
Estroma	63,23 (4,74)	62,18 (4,53)	0,541
<b>p53</b>			
Ep.Glandular	2,92 (2,46)	3,47 (4,01)	0,669
Estroma	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	
<b>p21</b>			
Ep. Glandular	16,77 (18,67)	28,71 (21,72)	0,125
Estroma	12,38 (13,53)	18,65 (15,56)	0,258
<b>p27</b>			
Ep.Glandular	24,15 (16,95)	24,35 (20,41)	0,978
Estroma	19,92 (13,35)	18,71 (16,91)	0,833

Grupo I = Mulheres com IMC até 24,9, Grupo II = Mulheres com IMC  $\geq$ 25

p\* < 0,05 (teste t de Student)

**TABELA 5** Distribuição da concentração média e desvio padrão (cel/mm<sup>2</sup>) das proteínas TGF- $\beta$ , p53, p21 e p27 no endométrio adjacente segundo seu índice de massa corporal (IMC).  
Serviço de Anatomia Patológica - ISCMSP, 2007

cel/mm <sup>2</sup>	Endométrio Adjacente		p*
	Grupo I n=13	Grupo II n=17	
<b>TGF-<math>\beta</math></b>			
Ep. Glandular	58,77 (17,60)	64,65 (3,63)	0,189
Estroma	58,77 (17,60)	64,65 (3,63)	0,189
<b>p53</b>			
Ep.Glandular	2,23 (2,20)	1,65 (1,45)	0,390
Estroma	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	
<b>p21</b>			
Ep. Glandular	15,38 (18,90)	9,29 (15,18)	0,336
Estroma	10,85 (13,20)	4,88 (8,83)	0,150
<b>p27</b>			
Ep.Glandular	14,46 (13,96)	20,24 (21,36)	0,406
Estroma	12,08 (12,55)	14,76 (15,85)	0,620

Grupo I = Mulheres com IMC até 24,9, Grupo II = Mulheres com IMC  $\geq$  25

p\* < 0,05 (teste t de Student)

Procedendo a análise entre a relação da expressão das proteínas TGF- $\beta$ , p53, p21 e p27 dos pólipos e endométrio adjacente com a imunoreatividade do receptor de estrogênio no tecido tumoral mamário (fraco, moderado e forte) observamos que não houve diferença estatisticamente significativa na população estudada (Tabelas 6 e 7).

**TABELA 6** Distribuição da concentração - média e desvio padrão (cel/mm<sup>2</sup>) - das proteínas TGF- $\beta$ , p53, p21 e p27 no pólipo segundo a imunoreatividade do receptor de estrogênio (RE). Serviço de Anatomia Patológica - ISCMSP, 2007

cel/mm <sup>2</sup>	RE*			p**
	Fraco n=5	Moderado n=14	Forte n=11	
<b>TGF-<math>\beta</math></b>				
Ep.Glandular	61,40 (3,36)	64,71 (3,62)	60,55 (5,24)	0,057
Estroma	61,40 (3,36)	64,71 (3,62)	60,55 (5,24)	0,057
<b>p53</b>				
Ep. Glandular	2,40 (1,67)	2,07 (1,43)	5,09 (4,84)	0,068
Estroma	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	
<b>p21</b>				
Ep. Glandular	14,40 (14,96)	25,79 (22,83)	24,82 (21,46)	0,580
Estroma	10,40 (15,37)	15,64 (13,95)	18,82 (16,24)	0,587
<b>p27</b>				
Ep. Glandular	27,20 (22,37)	25,86 (18,05)	20,91 (19,16)	0,761
Estroma	23,00 (18,39)	18,36 (13,36)	18,64 (17,21)	0,841

RE\*= imunoreatividade do receptor de estrogênio, p\*\* <0,05 (teste *t* de Student)

**TABELA 7** Distribuição da concentração média e desvio padrão (cel/mm<sup>2</sup>) das proteínas TGF- $\beta$ , p53, p21 e p27 no endométrio adjacente segundo a imunoreatividade do receptor de estrogênio (RE). Serviço de Anatomia Patológica - ISCMSP, 2007

cel/mm <sup>2</sup>	RE*			p**
	Fraco n=5	Moderado n=14	Forte n=11	
<b>TGF-<math>\beta</math></b>				
Ep.Glandular	64,60 (4,61)	58,64 (16,94)	65,36 (2,24)	0,347
Estroma	64,60 (4,61)	58,64 (16,94)	65,36 (2,24)	0,347
<b>p53</b>				
Ep. Glandular	1,60 (1,34)	1,34 (1,15)	2,73 (2,41)	0,158
Estroma	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	
<b>p21</b>				
Ep. Glandular	15,00 (13,92)	14,64 (21,83)	7,09 (9,34)	0,505
Estroma	7,60 (10,40)	7,93 (11,82)	6,82 (11,60)	0,972
<b>p27</b>				
Ep. Glandular	4,20 (5,67)	23,43 (19,57)	16,64 (18,42)	0,131
Estroma	3,40 (3,43)	17,64 (14,74)	13,09 (15,30)	0,162

RE\*= imunoreatividade do receptor de estrogênio, p\*\*< 0,05 (teste *t* de Student)

Quando analisamos a expressão das proteínas TGF- $\beta$ , p53, p21 e p27 em relação à espessura do endométrio (1-|10, 11-|20 e > 20 mm) verificada através da ultra-sonografia transvaginal; tanto no pólipo quanto no endométrio adjacente não encontramos diferença estatística significativa (Tabelas 8 e 9).

**TABELA 8** Distribuição da concentração média e desvio padrão (cel/mm<sup>2</sup>) das proteínas TGF- $\beta$ , p53, p21 e p27 no pólipo segundo a espessura do endométrio (mm) verificada na ultra-sonografia transvaginal. Serviço de Anatomia Patológica - ISCMSP, 2007

cel/mm <sup>2</sup>	EE*	EE*	EE*	p**
	1-  10 n=10	11 –  20 n=14	> 20 n=6	
<b>TGF-<math>\beta</math></b>				
Ep. Glandular	64,10 (4,70)	62,79 (3,96)	59,83 (5,19)	0,197
Estroma	64,10 (4,70)	62,79 (3,96)	59,83 (5,19)	0,197
<b>p53</b>				
Ep. Glandular	4,30 (3,94)	3,21(3,49)	1,50 (1,04)	0,287
Estroma	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	
<b>p21</b>				
Ep. Glandular	26,90 (22,60)	26,71 (22,22)	10,50 (9,93)	0,242
Estroma	19,80 (17,98)	16,43 (14,04)	8,33 (8,80)	0,332
<b>p27</b>				
Ep. Glandular	26 (16,18)	26,07 (20,83)	17,17 (18,63)	0,598
Estroma	20,40 (13,88)	20 (15,39)	15,50 (19)	0,808

EE\* = espessura endométrio (mm)

p\*\* <0,05 (Kruskall-Wallis)

**TABELA 9** Distribuição da concentração média e desvio padrão (cel/mm<sup>2</sup>) das proteínas TGF- $\beta$ , p53, p21 e p27 no endométrio adjacente segundo a espessura do endométrio (mm) verificada na ultrasonografia transvaginal.

Serviço de Anatomia Patológica - ISCMSP, 2007

cel/mm <sup>2</sup>	EE*			p**
	1-  10 n=10	11 –  20 n=14	> 20 n=6	
<b>TGF-<math>\beta</math></b>				
Ep. Glandular	65,20 (3,52)	59,43 (17,20)	63,17 (2,13)	0,511
Estroma	65,20 (3,52)	59,43 (17,20)	63,17 (2,13)	0,511
<b>p53</b>				
Ep. Glandular	2,90 (2,23)	1,64(1,49)	0,83 (0,75)	0,061
Estroma	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)	
<b>p21</b>				
Ep. Glandular	19,20 (20,15)	7,57 (14,32)	10 (14,90)	0,245
Estroma	12 (14,31)	5,14 (9,61)	5,33 (7,09)	0,299
<b>p27</b>				
Ep. Glandular	8 (14,87)	22 (19,48)	24 (17,43)	0,120
Estroma	5,30 (10,60)	16,29 (13,78)	21,17 (16,42)	0,058

EE\* = espessura endométrio (mm)

p\*\* < 0,05(Kruskall-Wallis)

#### 4.6. CORRELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DO TGF- $\beta$ , p53, p21 E p27 NO PÓLIPO E ENDOMÉTRIO ADJACENTE

Quando estudamos a correlação da expressão do TGF- $\beta$ , p53, p21 e p27 nos epitélios glandulares dos pólipos e do endométrio adjacente observamos que houve correlação estatisticamente significativa na proteína p53 (Tabela 10).

**TABELA 10** Distribuição da concentração média e desvio padrão (cel/mm<sup>2</sup>) e correlação das proteínas TGF- $\beta$ , p53, p21 e p27 no epitélio glandular e estromal do pólipo e endométrio adjacente. Serviço de Anatomia Patológica - ISCMSP, 2007

cel/mm <sup>2</sup>	Pólipo	Endométrio	p*	r**
<b>TGF-b</b>				
Ep. Glandular	62,63 (4,57)	62,10 (12,01)	0,115	-0,294
Estroma	62,63 (4,57)	62,10 (12,01)	0,115	-0,294
<b>p53</b>				
Ep. Glandular	3,23 (3,39)	1,90 (1,80)	0,000	0,814
Estroma	0,0 (0,0)	0,0 (0,0)		
<b>p21</b>				
Ep. Glandular	23,53 (20,99)	11,93 (16,86)	0,641	-0,089
Estroma	15,93 (14,81)	7,47 (11,15)	0,624	0,093
<b>p27</b>				
Ep. Glandular	24,27 (18,67)	17,73 (18,46)	0,636	-0,090
Estroma	19,23 (15,22)	13,60 (14,34)	0,628	-0,092

p\* <0,05(teste t de Student) r\*\*= -1 a 1 (correlação de Pearson)

Quando realizamos a correlação das proteínas do pólipo e endométrio adjacente com os seus respectivos epitélios glandular e estromal observamos que há uma diferença estatística significativa na proteína p21 e p27 (Tabela 11).

**TABELA 11** Distribuição da concentração média e desvio padrão (cel/mm<sup>2</sup>) e correlação das proteínas TGF- $\beta$ , p53, p21 e p27 no epitélio glandular e estromal do pólipo e do endométrio adjacente. Serviço de Anatomia Patológica - ISCMSP, 2007

cel/mm <sup>2</sup>	Ep.Glandular	Estroma	p*	r**
<b>TGF-b</b>				
Pólipo	62,63 (4,57)	62,63 (4,57)		1
Endométrio	62,10 (12,01)	62,10 (12,01)		1
<b>p53</b>				
Pólipo	3,23 (3,39)	0,0 (0,0)		
Endométrio	1,90 (1,80)	0,0 (0,0)		
<b>p21</b>				
Pólipo	23,53 (20,99)	15,93 (14,81)	0,000	0,893
Endométrio	11,93 (16,86)	7,47 (11,15)	0,000	0,822
<b>p27</b>				
Pólipo	24,27 (18,67)	19,23 (15,22)	0,000	0,920
Endométrio	17,73 (18,46)	13,60 (14,34)	0,000	0,954

p\* < 0,05 (teste t de Student)

r\*\* = -1 a 1 (correlação de Pearson)

## **5. DISCUSSÃO**

O tamoxifeno (TMX) tem sido aceito até o momento como droga de primeira escolha no tratamento adjuvante hormonioterápico de mulheres após a menopausa com tumores mamários malignos e receptores de estrogênio positivo. Atua como agente preventivo no aparecimento de câncer de mama contra lateral e melhora da sobrevida (Jordan, 1988; Baker & Jaffe, 1995; Cohen et al, 1997; Kuiper et al, 1997; Kommos et al, 1998; Veronesi et al, 1998; Elkas et al, 2000; Mourits et al, 2002; Siufi et al, 2003; American Cancer Society, 2005).

O TMX apresenta diferentes ações na dependência do tipo de tecido e quantidade de receptor de estrogênio (RE); assim nas mamas inibe o crescimento das células cancerosas por competitividade antagonista com o estrogênio, por outro lado, no endométrio exerce atividade ora agonista ora antagonista podendo apresentar como efeito colateral a alta taxa de incidência de proliferação endometrial, com aparecimento de alterações tais como pólipos, hiperplasias, carcinomas e sarcomas (Ismail, 1994; Assikis et al, 1996; Mosselman et al, 1996; Ugwumagu et al, 1998; Mc Donnell et al, 2001; Risberg et al, 2002; Wickerham et al, 2002; Haskel, 2003; Stygar et al, 2003; Tregón et al, 2003; Kian Tee et al, 2004; Cohen, 2004; Botogoski et al, 2005; Botogoski et al, 2007).

Na literatura encontramos que a média de aparecimento de pólipos endometriais nas mulheres não usuárias de tamoxifeno está entre 40 a 50 anos (Lima et al, 1979; Orvieto et al, 1999; Bakour et al, 2002; Van den Bosch et al, 2003; Campaner et al, 2006), com uma incidência menor acima dos 54 anos (Melki & Tostes Filho, 1992; Carvalho, 2006). Já nas usuárias de tamoxifeno, Feitosa et al, (2002) encontraram uma faixa etária de prevalência de 53 anos discordante de nossos achados que foi de 61,7 anos, porém outros autores relataram dados semelhantes aos nossos (Reslova et al, 1999; Kennedy et al, 1999; Caschetto et al, 2000; Deligdisch et al, 2000; Yamazawa et al, 2002; Ansbacher & Advincula, 2003; Houghton et al, 2003; Tate et al, 2004; Garuti et al, 2005; Morales et al, 2005; Takeuchi et al, 2005).

Sabe-se que diversos métodos são eficazes para investigação da mucosa uterina como biópsia endometrial, curetagem uterina de prova, histeroscopia, ultrasonografia e histerossonografia. Um dos métodos imprescindíveis que atualmente

faz parte da propedêutica ginecológica é a ultra-sonografia via transvaginal, utilizado em nosso estudo, pois constitui método acessível, inócuo, pouco invasivo e de baixo custo possibilitando análise imediata das imagens. A mucosa uterina pode ser avaliada quanto a sua espessura e textura (Fung et al, 2003; Markovitch et al, 2004; Develioglu et al, 2004).

Em diversos estudos, caso a espessura endometrial medida pela ultra-sonografia via transvaginal apresentar-se  $\geq 5$  mm ou com alterações focais em mulheres usuárias de tamoxifeno após a menopausa, faz-se necessária à investigação por metodologia invasiva (Fong et al, 2001; Juneja et al, 2002; Vosse et al, 2002). Em nosso estudo todos os endométrios avaliados pela ultra-sonografia via transvaginal foram heterogêneos e a espessura endometrial variou de 6,0 – 44,0 ( $15,6 \pm 8,1$ ) mm. Todas as mulheres de nossa pesquisa foram submetidas à histeroscopia diagnóstica e cirúrgica pelo pesquisador.

A histeroscopia, utilizada em nosso trabalho é considerada o método de escolha no diagnóstico de lesões endometriais, pois nos fornece melhores resultados com sensibilidade acima de 90% e baixa taxa falso-positivo (McGonigle et al, 1998; Ivanov et al, 1998; Gerber et al, 2000; Strauss et al, 2000; Maugeri et al, 2001; Giorda et al, 2002; Feitosa et al, 2002; Garuti et al, 2005; Duffy et al, 2006).

Os nossos achados histeroscópicos dos pólipos uterinos revelaram que 10 (33,4%) eram pólipos com 1,0 cm de tamanho; 7 (23,2%) pólipos com 1,5 cm; 5 (16,7%) pólipos com 0,5 cm; 3 (9,9%) pólipos com 3,0 cm; 2 (6,7%) pólipos com 2,0 cm; 2 (6,7%) pólipos com 4,0 cm e 1 (3,3%) com 3,5 cm. Quanto aos achados histeroscópicos do endométrio adjacente mostrou que 16 (53,3%) apresentavam endométrio fino esbranquiçado; 10 (33,3%) endométrio fino cístico; 3 (10%) endométrio edemaciado branco-amarelado e 1 (3,3%) endométrio com pregas.

Quanto ao tamanho dos pólipos nenhum deles apresentou-se acima 4 cm tendo a maioria 1 cm (33,4%). Relatos de pólipos com tamanhos  $\geq 8$  e 9 cm já foram escritos (Cascheto et al (2000); Ansbacher e Advincula (2003); Takeuchi et al (2005). Quanto as alterações histológicas hiperplásicas, atípicas celulares e câncer descritas por alguns autores Bakour et al (2002); Yamazawa et al (2002); Sington et al (2002);

Savelli et al (2003); Tate et al (2004) não encontramos em nossos resultados fato este também observado por Antunes Jr et al (2007).

Descrições de metástases nos pólipos endometriais de mulheres com câncer de mama usuárias de tamoxifeno descritas por Houghton et al (2003); Acikalin et al (2005); Al-Brahim & Elavathil (2005) não foram encontradas nos pólipos analisados em nosso estudo.

A atividade endometrial do TMX irá depender da ação de co-fatores que, ligando-se ao complexo formado RE-TMX, poderá exercer ação repressora ou ativadora, com efeito, atrófico ou proliferativo e este mecanismo de ação está fortemente associado à carcinogênese endometrial. Contudo, o mecanismo molecular que regula de forma negativa o crescimento das células do endométrio não está bem esclarecido (Brzozowski et al, 1997; Shang et al, 2000; Mc Donnell, 2004; Menendez et al, 2004).

Avanços nos estudos da compreensão do ciclo celular têm revelado que a proliferação celular é regulada pela interação entre as ciclinas e ciclinas dependentes das quinases, dos inibidores das ciclinas dependentes das quinases (CKI) e produtos dos genes supressores dos tumores (Koch & Nasmyth, 1994; Glover et al, 1996; Kuiper et al, 1996; Russo, 1996; Palvetich, 1999; Jackman et al, 2002; Ubersax et al, 2003; Morgan, 2006).

Acredita-se que o TGF- $\beta$  apresenta uma via dupla no processo da carcinogênese com habilidade de inibir a proliferação celular e suprimir o desenvolvimento do tumor nos estágios iniciais, porém no curso da progressão tumoral de células malignas estas adquirem resistência aos fatores inibidores do crescimento pelos TGF- $\beta$  (Reiss, 1999; Blobel et al, 2000; Wieser, 2001).

Nossos dados demonstraram que o tratamento com o TMX resultou em uma indução de TGF- $\beta$  tanto no epitélio glandular do pólipo quanto no seu estroma 50 – 70 ( $62,63 \pm 4,57$ ) cel/mm<sup>2</sup>. No epitélio glandular e estromal do endométrio adjacente o TGF- $\beta$  esteve altamente expresso em todos os compartimentos estudados, 1 – 71

(62,10 ± 12,01) cel/mm<sup>2</sup>, porém não se notou diferença estatisticamente significativa quando foram comparados os respectivos compartimentos entre si.

Sartor et al (1995) estudando útero de ratas ooforectomizadas com uso de TMX observaram que houve aumento da imunoreatividade do TGF-β tanto no epitélio glandular quanto no estroma, sendo mais pronunciado no estroma endometrial. Em mulheres, Carmichael et al (2000) relataram que houve uma elevação da proteína TGF-β no epitélio glandular do endométrio e isto pode estar associado a uma maior incidência de hiperplasias endometriais nas usuárias de TMX. Estes achados foram semelhantes aos nossos, porém não houve comparação entre o epitélio glandular e estroma do endométrio. Não encontramos na literatura estudo que faça correlação entre pólipos endometriais, endométrio adjacente e TGF-β de mulheres usuárias de tamoxifeno.

A p53 regula a inibição do ciclo celular e apoptose em resposta a um dano no DNA e mutação no gene p53, sendo reportado ser o mais comum defeito genético em cânceres humanos (Olson et al, 1997; Sadot et al, 2001). Em células normais esta proteína é rapidamente degradada, contudo por influência de fatores externos pode tornar-se resistente à degradação, acumulando-se no núcleo celular. A p53 pode ser detectada pela técnica de imunoistoquímica; em células normais sua expressão é fraca, porém em células com mutação da p53, se expressa fortemente. A imunoreatividade da proteína p53 foi detectada em cerca de 90% das alterações do gene p53 (Lane, 1992; Vojtesek et al, 1992; Shackelford et al, 1999; Nieder et al, 2001; Bargonetti & Manfredi, 2002).

Nossos dados demonstraram que, com o tratamento com TMX, houve expressão celular fraca da proteína p53 no epitélio glandular do pólipo com variação de 1 – 14 (3,23 ± 3,39) cel/mm<sup>2</sup> e no epitélio glandular do endométrio adjacente de 0 – 8 (1,90 ± 1,80) cel/mm<sup>2</sup>. No estroma tanto do pólipo quanto do endométrio, não houve células imunocoradas.

Olson et al (1997); Kuwashima et al (1998); Ramondetta et al (1998) estudando carcinoma endometrial de mulheres usuárias de tamoxifeno observaram uma forte expressão de p53 no endométrio, sugerindo que mutações podem estar associadas a desenvolvimento de tumores agressivos no tecido endometrial.

Isakson et al (1999) em estudo morfométrico, observaram uma expressão positiva de p53 no epitélio glandular do endométrio de macacas com uso de TMX e não no estroma, dados semelhantes aos nossos achados, porém diferiu do nosso trabalho tanto pela população estudada quanto a falta de estudo em pólipos.

Pesquisas que investigam a expressão da proteína p53 nos pólipos e seu endométrio adjacente de mulheres usuárias de tamoxifeno não foram encontrados na literatura.

O DNA danificado ativa genes reguladores da proteína p53, a qual estimula a transcrição de vários genes, sendo que um destes codifica uma proteína inibidora das quinases dependentes das ciclinas (CKI) denominada p21 que se liga aos complexos ciclina-quinase dependente das ciclinas e inibe a progressão do ciclo celular.

A importância de estudarmos a proteína p21 está na interação com a p53 que apresenta função de suprimir a evolução tumoral por controlar a progressão do ciclo celular.

O DNA danificado ativa genes reguladores da proteína p53, a qual estimula a transcrição de vários genes, sendo que um destes codifica uma proteína inibidora das quinases dependentes das ciclinas (CKI) denominada p21 que se liga aos complexos ciclina-quinase dependente das ciclinas e inibe a progressão do ciclo celular.

A importância de estudarmos a proteína p21 está na interação com a p53 que apresenta função de suprimir a evolução tumoral por controlar a progressão do ciclo celular.

Nossos dados demonstraram que o tratamento com o TMX resultou em expressão celular positiva da proteína p21 no epitélio glandular do pólipo de 1 – 62 ( $23,53 \pm 20,99$ ) cel/mm<sup>2</sup> e no estroma de 0-46 ( $15,93 \pm 14,81$ ) cel/mm<sup>2</sup>. Já no endométrio adjacente o epitélio glandular apresentou de 0- 57 ( $11,93 \pm 16,86$ ) cel/mm<sup>2</sup> e no estroma de 0 – 37 ( $7,47 \pm 11,15$ ) cel/mm<sup>2</sup>. Quando comparamos o epitélio glandular do pólipo com o endométrio adjacente não observamos diferença estatística significativa, mas quando realizamos a comparação entre o epitélio glandular do pólipo com seu estroma e os mesmos tecidos no endométrio adjacente observamos que houve uma diferença estatística significativa, havendo maior imunoreatividade da p21 no pólipo.

Fredersdorf et al (1996) estudaram a expressão da proteína p21 em vários tecidos normais do organismo. No tecido endometrial observaram que houve uma maior positividade no epitélio da fase secretora em relação à proliferativa, descrevendo que quando ocorre no tecido normal redução da expressão da proteína p21, há proliferação tecidual.

Quando pesquisados na literatura dados envolvendo o estudo da proteína p21, em usuárias de TMX não encontramos dados na literatura.

A p27 é um dos membros do grupo das proteínas identificado como inibidora das ciclinas dependentes das quinases. Sabe-se que apresenta a propriedade de supressão tumoral, reguladora da resistência a drogas nos tumores sólidos e promotora da apoptose celular. Concentrações teciduais normais da p27 são importantes no controle da proliferação celular, oposição à progressão tumoral e quando baixas, estão associadas com pior prognóstico em uma variedade de tumores ginecológicos incluindo mama, ovários, cérvix. No endométrio sua redução ou ausência pode ser importante passo na carcinogênese endometrial (Kato, 1999; Sgambato et al, 2000; Zhu et al, 2001; Siufi et al, 2003; Lahav-Baratz et al, 2004).

Nossos dados demonstraram que o tratamento com o TMX resultou em expressão celular positiva da proteína p27 no epitélio glandular do pólipo de 1 – 56 ( $24,27 \pm 18,67$ ) cel/mm<sup>2</sup> e no estroma 0 - 47 ( $19,23 \pm 15,22$ ) cel/mm<sup>2</sup>. No endométrio adjacente o epitélio glandular apresentou de 1- 56 ( $17,73 \pm 18,46$ ) cel/mm<sup>2</sup> e

estroma 0 – 37 ( $13,60 \pm 14,34$ ) cel/mm<sup>2</sup>. Quando comparamos somente o epitélio glandular do pólipo com o do endométrio adjacente não observamos diferença estatística significativa, mas quando realizamos a comparação entre o epitélio glandular do pólipo com seu estroma e os mesmos tecidos no endométrio adjacente observamos que houve uma diferença estatística significativa maior no pólipo.

Shiozawa et al (1998) em estudo de 49 endométrios de mulheres entre 35 a 45 anos não usuárias de TMX concluíram que há maior expressão da proteína p27 na fase secretora. Neste mesmo estudo, em outras sete mulheres entre 43 e 55 anos com diagnóstico prévio de hiperplasia endometrial, realizado por biópsia, e submetidas a uso oral de acetato de medroxiprogesterona 400 mg/dia por oito a doze semanas, submetidas após a biópsia, observaram que a expressão da proteína p27 estava ausente antes do uso do medicamento e fortemente expressa depois.

Siufi et al (2003) estudando 53 endométrios de mulheres após a menopausa usuárias de TMX concluíram que a terapia com o tamoxifeno não esteve diretamente envolvida na carcinogênese endometrial desde que a expressão da proteína p27 não esteja diminuída.

Masciullo et al (2003) em estudo de 217 adenocarcinomas de mulheres não usuárias de tamoxifeno encontraram uma expressão reduzida da proteína p27. Ozkara & Corakci (2004) estudando endométrio normal, hiperplásico e com carcinoma de mulheres, não usuárias de TMX, observaram que há uma maior expressão da proteína p27 na fase secretora do endométrio; já no endométrio com hiperplasia simples ou complexa a p27 sempre se apresenta super-expressa e significativamente reduzida no carcinoma endometrial. Shiozawa et al (1998) obtiveram os mesmos achados, porém só estudaram endométrio normal.

Estudos que fazem a investigação de pólipos endometriais e endométrio adjacente com a expressão da proteína p27 em usuárias de tamoxifeno não foram encontrados na literatura.

Quando comparamos as proteínas com o epitélio glandular do pólipo e do endométrio adjacente observamos que houve expressão significativamente maior da

proteína p53 no pólipo. Não houve diferença estatística significativa das proteínas TGF- $\beta$ , p21 e p27 no pólipo quando comparado ao endométrio. A proteína p53 regula a inibição do ciclo celular e apoptose em resposta a um dano ocorrido no DNA e mutação no gene p53, isto nos leva a refletir que os pólipos em mulheres usuárias de TMX, apesar de, neste estudo, apresentarem-se como lesões proliferativas focais e sem alterações histológicas, devemos levar em consideração a presença da imunoreatividade do epitélio glandular, pois podemos estar frente a uma lesão com alterações carcinogênicas iniciais.

Quando comparamos o estroma do pólipo e do endométrio adjacente observamos que não houve diferença significativa em nenhuma das proteínas estudadas. Analisando os estudos publicados anteriormente citados, nos deparamos que as alterações das proteínas ocorrem principalmente no epitélio glandular, assim notamos que as alterações celulares iniciais principalmente são encontradas no epitélio glandular e não no estroma.

Quando comparamos o epitélio glandular e estroma tanto no pólipo quanto no endométrio observamos que houve expressão significativamente maior das proteínas p21 e p27 no epitélio glandular. Tendo conhecimento de que o epitélio glandular é mais afetado que o estroma e que estas proteínas imunoreativas tem relação com o controle do ciclo celular, podemos pensar que está havendo uma tentativa de correção pelas células do dano devido ao uso do tamoxifeno, evitando assim que a célula sofra alteração definitiva e que possa gerar uma célula filha com gene alterado.

Nossos dados fazem supor que o TGF- $\beta$  e as proteínas p53, p21 e p27 por dependerem de outros mecanismos no processo celular, apresentam múltiplas variáveis, não sendo possível correlacionar que elas *per se* sejam as responsáveis no desenvolvimento de patologias endometriais como pólipos, hiperplasias e até mesmo o câncer de endométrio. O uso do TMX, como a primeira droga de escolha no tratamento adjuvante do cancer de mama e com atuação endometrial, surge como outra variável a ser levada em consideração.

Trabalhos que investigam a patogênese dos pólipos endometriais após a menopausa em mulheres usuárias de tamoxifeno são raros na literatura bem como à metodologia utilizada para o estudo da distribuição da expressão das proteínas por imunistoquímica.

Neste estudo, utilizamos um único parâmetro: o número de membranas imunocoradas no caso da proteína TGF- $\beta$  ou núcleos corados para as proteínas p53, p21 e p27 por milímetro quadrado, em vez de se empregar a metodologia de escore para a gradação da coloração. Esta última necessita de controle rigoroso de tempo do tecido no formol, o que seria difícil, pois, nossa pesquisa foi realizada em um complexo hospitalar; assim sendo, não se possuía controle absoluto sob tempo de permanência do material obtido no formol, fato este que, reconhecidamente, pode alterar a intensidade da coloração (Nadais et al, 2006).

Poucos estudos têm investigado a distribuição da imunoreatividade das proteínas por imunistoquímica nos pólipos endometriais e endométrio adjacente em mulheres usuárias de TMX; todavia, a metodologia utilizada neste estudo que avalia a morfometria da expressão das proteínas difere da encontrada na literatura. Com a padronização da metodologia aqui utilizada, que é de fácil reprodutibilidade e confiável, poder-se-iam realizar estudos comparativo retrospectivo e prospectivo de forma mais objetiva.

Nosso trabalho visa trazer uma contribuição ao estudo da fisiopatologia dos pólipos endometriais sob a ação do TMX em mulheres após a menopausa, haja vista, que está associado ao desenvolvimento de patologias endometriais benignas e ao câncer do endométrio. Os avanços no estudo da biologia molecular tem-nos levado a surpreendentes revelações, porém notamos que ainda há escassez de trabalhos em relação ao aparecimento dos pólipos sob ação hormonal. No futuro uma análise combinada e associada das diferentes proteínas envolvidas tanto na supressão quanto na proliferação celular poderão levar-nos a maiores esclarecimentos.

## **6. CONCLUSÕES**

O estudo imunoistoquímico e morfométrico comparativo da imunoreatividade das proteínas TGF- $\beta$ , p53, p21 e p27 em pólipos e endométrio adjacente de mulheres após a menopausa usuárias de tamoxifeno demonstraram que:

No epitélio glandular do pólipo e do endométrio adjacente observamos:

- Houve expressão significativamente maior da proteína p53 no pólipo quando comparado ao endométrio.
- Não houve diferença significativa das proteínas TGF- $\beta$ , p21 e p27 do pólipo quando comparado ao endométrio.

No estroma do pólipo e do endométrio adjacente observamos:

- Não houve diferença significativa em nenhuma das proteínas estudadas.

No epitélio glandular e estroma tanto no pólipo quanto no endométrio adjacente observamos:

- Houve expressão significativamente maior das proteínas p21 e p27 no epitélio glandular.

## **7. ANEXOS**

## ANEXO 1. PROTOCOLO DE ESTUDO

Estudo Imunoistoquímico e Morfométrico Comparativo da Expressão do TGF- $\beta$  e das Proteínas p53, p21 e p27 em Pólipo e Endométrio Adjacente de Mulheres Usuárias de Tamoxifeno

Nome:.....Registro:.....Idade:.....Raça:.....

Data entrada hospital:.....

G.....P.....C.....A.....DUM:.....Peso(Kg):.....

Altura(m):..... IMC:..... PA antes início TMX(mmHg):..... PA atual:.....

Estadiamento: T.....N.....M..... Estadiamento Clínico:..... Data da Cirurgia:.....

Tipo de Cirurgia:.....Anatomopatológico

Tumor:.....

Grau histológico:..... Linfonodos acometidos:.....Linfonodos retirados:.....

Qual o tratamento

adjuvante:.....

Receptor E +, reatividade: .....fraco .....moderado .....forte

Data início TMX:.....Data Atual uso TMX:..... Tempo uso

TMX(meses):.....Dose de uso do

TMX:.....mg/dia

Avaliação ultra-sonografia transvaginal: .....Rotina ou

.....Queixa.Qual?.....

.....

.....

Data da realização da ultra-sonografia:.....Endométrio:medida.....mm

Ecotextura.....

.....

Útero:.....x.....x.....Volume total:.....cm<sup>3</sup> Ecotextura

Miométrio:.....

.....

.....

Ovário Direito:.....x.....x..... Volume total.....cm3

Ecotextura.....

.....

.....

Ovário Esquerdo:.....x.....x..... Volume total.....cm3

Ecotextura.....

.....

.....

Data de realização da histeroscopia:.....Achados na histeroscopia  
diagnóstica e

cirúrgica:.....

.....

.....

Diagnóstico anatomopatológico do pólipo

endometrial:.....

Diagnóstico anatomopatológico do endométrio

adjacente:.....

## **ANEXO 2. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Senhora

\_\_\_\_\_,  
eu, Sheldon Rodrigo Botogoski, peço a sua autorização para incluí-la na pesquisa "Estudo Imunoistoquímico e Morfométrico Comparativo da Expressão do TGF- $\beta$  e das Proteínas p53, p21 e p27 em Pólipos e Endométrio Adjacente de Mulheres Usuárias de Tamoxifeno".

Esta pesquisa tem como objetivo estudar as alterações do tecido do endométrio do útero em mulheres usuárias de tamoxifeno através de estudo histopatológico e imunoistoquímico. As pacientes que são usuárias do medicamento chamado tamoxifeno para tratamento adjuvante do câncer de mama devem ser submetidas a exame anual de ultra-sonografia transvaginal para avaliar seu endométrio, pois esta medicação pode causar alterações neste tecido podendo ocasionar até um câncer endometrial. Se em sua avaliação anual apresentar alguma alteração no exame de ultra-sonografia existe a indicação médica de se estudar este tecido e para se coletar material da cavidade uterina dispomos de um exame chamado histeroscopia diagnóstica e cirúrgica

O procedimento de histeroscopia diagnóstica e cirúrgica que é feito para todas as mulheres que, como à senhora, possuem uma alteração visível no exame de ultra-sonografia é por vezes desconfortável, mas, realizado sob anestesia e, no entanto a retirada do fragmento não aumenta a sua duração, nem agrava o seu desconforto.

No procedimento de histeroscopia diagnóstica e cirúrgica é introduzido um material metálico tubular de aproximadamente 30 cm de comprimento que possui uma câmera de vídeo na extremidade e revestido por uma camisa metálica, este conjunto recebe o nome de histeroscópio. Este material apresenta diâmetro de 5 mm e está ligado a um monitor de vídeo para acompanhamento do médico, uma fonte de luz fria e a um insuflador para expandir a cavidade uterina.

Este tipo de procedimento é realizado sob anestesia geral endovenosa ou de bloqueio, que pode ocasionar parada cardíaco-respiratória, mas a senhora será acompanhada a todo o momento por um médico anestesista para se evitar quaisquer intercorrências. O risco na realização deste procedimento é considerado mínimo, mas alguns deles podem ocorrer como: perfuração do canal endocervical e

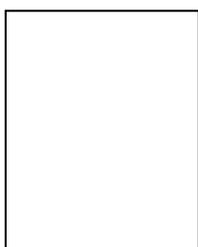
do útero por uma manobra forçada do histeroscópio, extravasamento de ar e líquido para a cavidade peritoneal podendo ocasionar cólicas no pós-operatório e infecção no tecido intra-uterino.

Garantimos que seu nome não será exposto em nenhuma apresentação ou qualquer tipo de publicação e que poderá deixar de participar da pesquisa em qualquer momento que desejar. Caso não concorde com a participação no estudo ou deseje sair do mesmo, não haverá prejuízo em seu tratamento e seguimento. Ressaltamos ainda que tenha liberdade de retirar este consentimento em qualquer momento que desejar sem prejuízo para seu tratamento e seguimento neste serviço e que estamos à disposição para maiores esclarecimentos a qualquer momento que desejar.

Este estudo que tem como pesquisador responsável o Sr. Sheldon Rodrigo Botogoski, especialmente no que diz respeito ao objetivo da pesquisa, aos procedimentos que serei submetida, aos riscos e aos benefícios, declaro que tenho pleno conhecimento dos direitos e das condições que me foram assegurados, a seguir relacionados:

1. A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de qualquer dúvida a respeito dos procedimentos, riscos, benefícios e de outras situações relacionada com a pesquisa e o tratamento a que serei submetida.
2. A liberdade de retirar o meu consentimento e deixar de participar do estudo, a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo à continuidade do meu tratamento.
3. A segurança de que não serei identificada e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada à minha privacidade.
4. O compromisso de que me será prestada informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar a minha vontade de continuar dele participando.
5. O compromisso de que serei devidamente acompanhada e assistida durante todo o período de minha participação no projeto, bem como de que será garantida a continuidade do meu tratamento, após a conclusão dos trabalhos de pesquisa.

Declaro, ainda, que concordo inteiramente com as condições que me foram apresentadas e que, livremente, manifesto a minha vontade em participar do referido projeto.



Curitiba, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 200\_\_.

Digital ou

---

Assinatura da Mulher

---

Sheldon Rodrigo Botogoski  
Pesquisador Responsável  
Telefone de contato (41)9917-0022

---

Profa. Dra. Sônia Maria Rolim Rosa Lima  
Orientadora

## ANEXO 3.PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS DO HOSPITAL ERASTO GAERTNER – CURITIBA - PARANÁ

### PARECER CONSUBSTANCIADO

No dia 22 de março de 2005, o Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição avaliou o projeto intitulado como: “**Estudo Imunoistoquímico e Morfométrico Comparativo da Expressão do TGF- $\beta$  e das Proteínas p53, p21 e p27 em Pólipo e Endométrio Adjacente de Mulheres Usuárias de Tamoxifeno**”, P.P.

nº 1135, cujo pesquisador principal, responsável pela condução do estudo é **Dr. Sheldon Rodrigo Botogoski**, médico ginecologista e obstetra e mestre em princípios da cirurgia e, sem representante institucional, tendo o seguinte parecer:

**OBJETIVOS:** Verificar as alterações histopatológicas encontradas nos endométrios que estão sob efeito do tamoxifeno.

Verificar os achados ultra-sonográficos no endométrio, útero e ovários causados pelo tamoxifeno.

Comparar a expressão do TGF- $\beta$  e das Proteínas nos Pólipos e Endométrio Adjacente.

**AMOSTRA:** Os sujeitos da pesquisa serão pacientes pertencentes ao ambulatório de mastologia do Hospital Erasto Gaertner de Curitiba com patologias intra-uterinas verificadas através de ultra-sonografia, histeroscopia diagnóstica e cirúrgica.

**CONSIDERAÇÕES:** Sugere-se:

- a) Substituir no termo de consentimento a palavra droga por medicamento.

**PARECER: APROVADO**

Dr. Jordan Zanetti Silva

Presidente do CEP

---

Membros do CEP:

Andréa Silvana Rossi – Psicóloga Mestre  
Dr. Ariovaldo Donizetti de Abreu – Fisioterapeuta  
Dr. Edson Luiz Michalkiewicz – Médico Especialista (Mestre e Doutorando)  
Dr. Fausto Rohnelt Durante – Médico Especialista  
Dr. Flávio Daniel Saavedra Tomasich – Médico Especialista e Mestre  
Dr. Gyl Henrique Albrecht Ramos – Médico Especialista e Mestre  
Dr. Jordan Zanetti Silva – Médico Especialista e Advogado  
Dr. Luiz Antonio Negrão Dias – Médico Especialista e Mestre

Dra. Ana Luiza Wiermann – Médica Especialista  
Dra. Ieda N. O. Fernandes – Física Médica  
Enfª Andréa Melo Tratch – Enfermeira Especialista  
Enfª Luciana Puchalski Kalinke – Enfª Especialista e Mestre  
Enfª Telma Pelaes – Enfermeira Especialista  
Regina Célia Anastácio da Silva – Jornalista  
Vânia Mari Andrzejewski – Farmacêutica Especialista  
Jose Carlos Wiederkehr – Representante da Comunidade

## **8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Acikalin MF, Oner U, Tekin B, Yavuz E, Cengiz O. Metastasis from breast carcinoma to a tamoxifen-related endometrial polyp. *Gynecol Oncol.* 2005; 97:946-8.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Organização interna da célula. In: Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P *Biologia molecular da célula.* 4ª. ed. Porto Alegre: Artmed; 2004. p.887-8.

Al-Brahim N, Elavathil LJ. Metastatic breast lobular carcinoma to tamoxifen-associated endometrial polyp: case report and literature review. *Ann Diagn Pathol.* 2005; 9:166-8.

Albuquerque Neto LC, Motta ELA. Pólipo endometrial. In: Ueno J, Santos NC, Pinheiro W, Pinotti JA. *Cirurgia vídeo-endoscópica em ginecologia.* São Paulo: Roca; 1997. p. 349–51.

Albuquerque Neto LC. Análise da imuno-expressão da proteína p53 no pólipo endometrial de mulheres após a menopausa. Tese (Doutorado). São Paulo: Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina; 2004.

American Cancer Society. Hormonal therapy for breast cancer. *CA Cancer J Clin.* 2005; 55:195-8.

Ansbacher R, Advincula AP. Endometrial polyp secondary to tamoxifen therapy. *Fertil Steril.* 2003; 80:216-7.

Antunes Jr A, Costa-Paiva L, Arthuso M, Costa JV, Pinto-Neto AM. Endometrial polyps in pre-and postmenopausal women: factors associated with malignancy. *Maturitas.* 2007; 57:415-21.

Assikis VJ, Neven P, Jordan VC, Vergote I. A realistic clinical perspective of tamoxifen and endometrial carcinogenesis. *Eur J Cancer.* 1996; 32:1464-76.

Bachman KE, Park BH. Dual nature of TGF-beta signaling: tumor suppressor vs. tumor promoter. *Curr Opin Oncol.* 2005; 17:49-54.

Baker VL, Jaffe RB. Clinical uses of antiestrogens. *Obstet Gynecol Surv.* 1996; 51:45-59.

Bakour SH, Khan KS, Gupta JH. The risk of premalignant and malignant pathology in endometrial polyps. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2002; 81:182-3.

Bargonetti J, Manfredi JJ. Multiple roles of the tumor suppressor p53. *Curr Opin Oncol.* 2002; 14:86-91.

Blobe GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med.* 2000; 342:1350-8.

Borges HL, Rehen SK. Controle do ciclo celular. In: Carvalho HF, Recco-Pimentel SM. *A célula.* 2ª ed. Barueri, SP: Manole; 2007. p.329.

Botogoski SR, Lima SMRR, Hatschback SB, Linhares JC. Estudo dos efeitos do tamoxifeno no endométrio, útero e ovários: achados ultra-sonográficos e histopatológicos. [Anais – Poster] In: 51º Congresso Brasileiro de Ginecologia e Obstetrícia, 2005; Rio de Janeiro. Federação Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia; 2005.

Botogoski SR, Lima SMRR, Aoki T. Alterações endometriais ultra-sonográficas, histopatológicas, estado hormonal e tempo de uso do tamoxifeno. In: 21ª Jornada de Obstetrícia e Ginecologia da Santa Casa de São Paulo, 2007; São Paulo. [Tema Livre] Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo – Centro de Estudos Ayres Netto; 2007.

Brancroft JD, Stevens A. Theory and practice of histological techniques. New York: Churchill Livingstone; 1977. 436p.

Brasil. Ministério da Saúde. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE 3230, de 09 de dezembro de 2005. Determina a liberação para importação dos medicamentos TECNOTAX (tamoxifeno) 10 mg e 20 mg comprimido e TECNOFLUT (flutamida) 250 mg comprimido, fabricados pela empresa ASOFARMA DE MÉXICO S.A., importados e distribuídos no Brasil pela empresa ZODIAC PRODUTOS FARMACÊUTICOS S.A. [on line] Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/inspecao/medicamentos/liberados\\_2005.htm](http://www.anvisa.gov.br/inspecao/medicamentos/liberados_2005.htm) (20 out 2007)

Brzozowski AM, Pike AC, Dauter Z, Hubbard RE, Bonn T, Engstrom O, et al. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. Nature. 1997; 389:753-8.

Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C, Waldman T, Zhou S, Brown JP, et al. Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. Science. 1998; 282:1497-501.

Campaner AB, Carvalho S, Lima SMRR, Santos RE, Galvão MAL, Ribeiro PAG, et al. Avaliação histológica de pólipos endometriais em mulheres após a menopausa e correlação com o risco de malignização. Rev Bras Ginecol Obstet. 2006;28:18-23.

Campos ES. O ciclo celular. In: Rossi BM, Pinho M. Genética e biologia molecular para o cirurgião. São Paulo: Lemar; 1999. p.57-73.

Carmichael PL, Pole JCM, Neven P. Modulation of endometrial transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) by tamoxifen. European Journal of Cancer. 2000; 36:S39-S46.

Carvalho S. Estudo imunoistoquímico e morfométrico da expressão dos receptores de estrogênio, progesterona e ki67 em pólipos e endométrio adjacente de mulheres após a menopausa Tese (Mestrado). São Paulo: Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo; 2006.

Caschetto S, Cassaro N, Consalvo P, Caragliano L. Tamoxifene e polipi endometriali giganti. Minerva Ginecol. 2000; 52:459-63.

- Cohen I, Beyth Y, Altaras MM, Shapira J, Tepper R, Cardoba M, et al. Estrogen and progesterone receptor expression in postmenopausal tamoxifen-exposed endometrial pathologies. *Gynecol Oncol.* 1997; 67:8-15.
- Cohen I. Endometrial pathologies associated with postmenopausal tamoxifen treatment. *Gynecol Oncol.* 2004; 94:256-66.
- Crum CP, Hornstein MD, Stewart EA. Endometrial carcinoma and carcinosarcomas. In: Crum CP, Lee KR. *Diagnostic and obstetric pathology.* Philadelphia: Elsevier; 2006. p.476.
- DeLarco JE, Todaro GJ. Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1978; 75:4001-5.
- Deligdisch L, Kalir T, Cohen CJ, de Latour M, Le Bouedec G, Penault-Llorca F. Endometrial histopathology in 700 patients treated with tamoxifen for breast cancer. *Gynecol Oncol.* 2000; 78:181-6.
- Develioglu OH, Omak M, Bilgin T, Esmer A, Tüfekçi M. The endometrium in asymptomatic breast cancer patients on tamoxifen: value of transvaginal ultrasonography with saline infusion and Doppler flow. *Gynecol Oncol.* 2004; 93:328-35.
- Dotto GP. p21(WAF1/Cip1) more than a break to the cell cycle? *Biochim Biophys Acta.* 2000; 1471:M43-56.
- Duffy S, Jackson TL, Lansdown M, Philips K, Wells M, Pollard S, et al. The ATAC (Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination) adjuvant breast cancer trial: first results of the endometrial sub-protocol following 2 years of treatment. *Hum Reprod.* 2006; 21:545-53.
- El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, et al. WAF-1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell.* 1993; 75:817-25.
- Elkas J, Armstrong A, Pohl J, Cuttitta F, Martínez A, Gray K. Modulation of endometrial steroid receptors and growth regulatory genes by tamoxifen. *Obstet Gynecol.* 2000; 95:697-703.
- Engle SJ, Hoying JB, Boivin GP, Ormsby I, Gartside PS, Doetschman T. Transforming growth factor beta1 suppresses nonmetastatic colon cancer at an early stage of tumorigenesis. *Cancer Res.* 1999; 59:3379-86.
- Enmark E, Pelto-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, et al. Human estrogen receptor beta – gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997; 82:4258-65.
- Eto I. Nutritional and chemopreventive anti-cancer agents up-regulate expression of p27Kip 1, a cyclin-dependent kinase inhibitor, in mouse JB6 epidermal and human MCF-7, MDA-MB-321 and AU565 breast cancer cells. *Cancer Cell Int.* 2006; 6:20.

Evans T, Rosenthal ET, Youngblom J, Distel D, Hunt T. Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell*. 1983; 33: 389-96.

Feitosa FEL, Juaçaba SF, Medeiros FC. Alterações endometriais em pacientes com câncer de mama tratadas com tamoxifeno. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2002; 24: 233-9.

Fong K, Kung R, Lytwyn A, Trudeau M, Chapman W, Nugent P, et al. Endometrial evaluation with transvaginal US and hysterosonography in asymptomatic postmenopausal women with breast cancer receiving tamoxifen. *Radiology*. 2001;220:765-73.

Fredersdorf S, Milne AW, Hall PA, Lu X. Characterization of a panel of novel and anti-p21Waf1/Cip1 monoclonal antibodies and immunochemical analysis of p21Waf1/Cip1 expression in normal human tissues. *Am J Pathol*. 1996; 148: 125-35.

Frolik CA, Dart LL, Meyers CA, Smith DM, Sporn MB. Purification and initial characterization of a type beta transforming growth factor from human placenta. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1983; 80:3676-80.

Fung MF, Reid A, Faught W, Le T, Chenier C, Verma S, Brydon E, Fung KF. Prospective longitudinal study of ultrasound screening for endometrial abnormalities in women with breast cancer receiving tamoxifen. *Gynecol Oncol*. 2003; 91:154-9.

Gal D, Kopel S, Bashevikin M, Lebowicz J, Lev R, Tancer ML. Oncogenic potential of tamoxifen on endometria of postmenopausal women with breast cancer-preliminary report. *Gynecol Oncol*. 1991; 42:120-3.

Garuti G, Cellani F, Centinaio G, Sita G, Nalli G, Luerti M. Baseline endometrial assessment before tamoxifen for breast cancer in asymptomatic menopausal women. *Gynecol Oncol*. 2005; 98:63-7.

Gerber B, Krause A, Muller H, Reimer T, Kulz T, Makovitzky J, et al. Effects of adjuvant tamoxifen on the endometrium in postmenopausal women with breast cancer: a prospective long-term study using transvaginal ultrasound. *J Clin Oncol*. 2000; 18:3464-70.

Gibson LE, Barakat RR, Venkatraman ES, Hoskins WJ. Endometrial pathology at dilatation and curettage in breast cancer patients. Comparison of tamoxifen users and nonusers. *Cancer J Sci Am*. 1996; 2:35-8.

Giorda G, Crivellari D, Veronesi A, Perin T, Campagnutta E, Carbone A, et al. Comparison of ultrasonography, hysteroscopy, and biopsy in the diagnosis of endometrial lesions in postmenopausal tamoxifen-treated patients. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2002; 81:975-80.

Glover DM, Ohkura H, Tavares A. Polo kinase: the choreographer of the mitotic stage? *J Cell Biol*. 1996; 135:1681-4.

Gonçalves MAG, Gonçalves WJ, Matias MN, Nazário ACP, Baracat EC, Lima GR. Avaliação histeroscópica do endométrio de pacientes com carcinoma de mama na pós-menopausa antes e após o uso do tamoxifeno. *Rev Bras Mastol.* 2000; 10: 69-74.

Gonçalves WJ, Giusa-Chiferi MG, Soares Júnior JM, Silva IDCG, Baracat EC. Biologia molecular do carcinoma de endométrio. In: Schor N, Boim MA, Santos IDCG, Baracat EC. *Bases moleculares da ginecologia.* São Paulo: Atheneu; 2004. p.49-58.

Greene GL, Gilna P, Waterfield M, Baker A, Hort Y, Shine J. Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science.* 1986; 231:1150-4.

Hartwell LH, Weinert TA. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science.* 1989; 246: 629-34.

Haskell SG. Selective estrogen receptor modulators. *South Med J.* 2003; 96: 469-76.

Houghton JP, Ioffe OB, Silverberg SG, McGrady B, McCluggage WG. Metastatic breast lobular carcinoma involving tamoxifen-associated endometrial polyps: report of two cases and review of tamoxifen-associated polypoid uterine lesions. *Mod Pathol.* 2003;16:395-8.

Isaksson E, Cline JM, Skoog L, Soderqvist G, Wilking N, von Schoutz E, et al. p53 expression in breast and endometrium during estrogen and tamoxifen treatment of surgically postmenopausal cynomolgus macaques. *Breast Cancer Res Treat.* 1999; 53:61-7.

Ismail SM. Pathology of endometrium treated with tamoxifen. *J Clin Pathol.* 1994; 47:827-33.

Ivanov S, Kurlov T, Diankova TS, Kurlov A, Katerinski K, Ivanov S. [Abstract – Medline] [The evaluation of the transvaginal ultrasonography of endometrial thickness in women with postmenopausal bleeding and suspected endometrial carcinoma]. *Akush Gynecol (Sofia).* 1998; 37:23- 4.

Jackman M, Kubota Y, den Elzen N, Hagting A, Pines J. Cyclin A- and cyclin E-Cdk complexes shuttle between the nucleus and the cytoplasm. *Mol Biol Cell.* 2002; 13:1030-45.

Janji B, Melchior C, Vallar L, Kieffer N. Cloning of a isoform of integrin-linked kinase(ILK) that is upregulated in HT-144 melanoma cells following TGF-beta1 stimulation. *Oncogene.* 2000; 19:3069-77.

Jensen EV, Jacobson HI. Basic guide to the mechanism of estrogen action. *Recent Prog Horm Res.* 1962; 18:387-414.

- Jordan VC. The development of tamoxifen for breast cancer therapy: a tribute to the late Arthur L. Walpole. *Breast Cancer Res Treat.* 1988; 11:197-209.
- Jordão BQ, Andrade CGTJ. Ciclo celular e meiose. In: Junqueira LC, Carneiro J. *Biologia celular e molecular.* 8ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. p.170-94.
- Juneja M, Jose R, Kekre AN, Viswanathan F, Seshadri L. Tamoxifen-induced endometrial changes in postmenopausal women with breast carcinoma. *Int J Gynaecol Obstet.* 2002;76:279-84.
- Kato J. Induction of S phase by G1 regulatory factors. *Front Biosci.* 1999; 4: D787-92.
- Kedar RP, Bourne TH, Powles TJ, Collins WP, Ashley SE, Cosgrove DO, et al. Effects of tamoxifen on uterus and ovaries of postmenopausal women in a randomized breast cancer prevention trial. *Lancet.* 1994; 343:1318-21.
- Kennedy MM, Baigrie CF, Manek S. Tamoxifen and the endometrium: review of 102 cases and comparison with HRT-related and non-HRT-related endometrial pathology. *Obstet Gynecol Surv.* 1999; 54:440-1.
- Kepple DM. Ultra-sonografia transvaginal. In: Fleischer AC, Manning FA, Jeanty P, Romero R. *Ultra-sonografia em obstetrícia e ginecologia.* 5ª ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2000. p.35-41.
- Kian Tee M, Rogatsky I, Tzagarakis-Foster C, Cvorovic A, An J, Christy RJ, et al. Estradiol and selective estrogen receptor modulators differentially regulate target genes with estrogen receptors alpha and beta. *Mol Biol Cell.* 2004; 15:1262-72.
- Koch C, Nasmyth K. Cell cycle regulated transcription in yeast. *Curr Opin Cell Biol.* 1994; 6:451-9.
- Koepp DM, Harper JW, Elledge SJ. How the cyclin became a cyclin: regulated proteolysis in the cell cycle. *Cell.* 1999; 93:431-4.
- Kommos F, Karck U, Prompeler H, Pfisterer J, Kirkpatrick CJ. Steroid receptor expression in endometria from women treated with tamoxifen. *Gynecol Oncol.* 1998; 70:188-91.
- Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafson JA. Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93:5925-30.
- Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, et al. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology.* 1997; 138:863-70.
- Kurman RJ, Mazur MT. Benign disease of the endometrium. In: Kurman RJ. *Blaustein's pathology of the female genital tract.* 4<sup>th</sup> ed. New York: Springer Verlag; 1994; p.367-409.

Kuwashima Y, Kurosumi M, Kobayashi Y, Tanuma J, Suemasu K, Higashi Y, et al. Random nuclear p53 overexpression pattern in tamoxifen-mediated endometrial carcinoma. *Int J Gynecol Pathol.* 1998;17:135-9.

Lahti E, Blanco G, Kauppilla A, Apaja-Sarkkinen M, Tashiken PJ, Laatikainen T. Endometrial changes in postmenopausal breast cancer patients receiving tamoxifen. *Obstet Gynecol.* 1993; 81:660-4.

Lane DP. Cancer p53, guardian of the genome. *Nature.* 1992; 358:15-6.

Lahav-Baratz S, Ben-Izhak O, Sabo E, Ben-Eliezer S, Lavie O, Ishai D, et al. Decreased level of the cell cycle regulator p27 and increased level of its ubiquitin ligase skp2 in endometrial carcinoma but not in normal secretory or in hyperstimulated endometrium. *Mol Hum Reprod.* 2004; 10: 567-72.

Li X, Hui AM, Shi YZ, Takyama T, Makuuchi M. Reduced p21(WAF1/CIP1) expression is an early event in gallbladder carcinogenesis and is of prognostic significance for patients with carcinomas of the gallbladder. *Hum Pathol.* 2001; 32:771-7.

Lima AO, Soares JB, Greco JB, Galizzi J, Cañado JR. Hematologia. In: Lima Ao, Soares JB, Greco JB, Galizzi J, Cañado JR. Métodos de laboratório aplicados à clínica: técnica e interpretação. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1985, p. 407-533.

Lima GR, Miyada CC, Graebert H, Guidugli Netto J, de Freitas V, Magalhães J, et al. Contribuição ao estudo do carcinoma endometrial: aspectos clínicos e terapêuticos. *Ginecol Obstet Bras.* 1979; 2: 373-405.

Lima SMRR, Botogoski SR, Piato S. Fitoestrogênios na prevenção do câncer de mama. In: Lima SMRR, organizadora. Fitomedicamentos na prática ginecológica e obstétrica. São Paulo: Atheneu; 2006. p.153-64.

Liu XP, Kawauchi S, Oga A, Suehiro Y, Tsushimi K, Tsushimi M, et al. Combined examination of p27(Kip1), p21(Waf1/Cip1) and p53 on allows precise estimation of prognosis in patients with gastric carcinoma. *Histopathology.* 2001; 39:603-10.

Markovitch O, Tepper R, Fishman A, Shapira J, Aviram R, Cohen I. The value of transvaginal ultrasonography in the prediction of endometrial pathologies in asymptomatic postmenopausal breast cancer tamoxifen-treated patients. *Gynecol Oncol.* 2004;95:456-62.

Masciullo V, Susini T, Zamparelli A, Bovicelli A, Minimo C, Massi D et al. Frequent loss of expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 (Kip1) in estrogen-related endometrial adenocarcinomas. *Clin Cancer Res.* 2003; 9:5332-8.

Maugeri G, Nardo LG, Campione C, Nardo F. Endometrial lesions after tamoxifen therapy in breast cancer women. *Breast J.* 2001; 7: 240-4.

Mazur MT, Kurman RJ. Diagnosis of endometrial biopsies and curettings. A practical approach. New York: Springer-Verlag; 1995.

McDonnell DP. Selective estrogen receptor modulators (SERMs): a first step in the development of perfect hormone replacement therapy regimen. *J Soc Gynecol Investig.* 2000; 7(suppl 1):s10-5.

McDonnell DP, Chang CY, Norris JD. Capitalizing on the complexities of estrogen receptor pharmacology in the quest for the perfect SERM. *Ann NY Acad Sci.* 2001; 949:16-35.

McDonnell DP. The molecular determinants of estrogen receptor pharmacology. *Maturitas.* 2004; 48 (suppl 1):S7-12.

McGonigle KF, Shaw SL, Vasilev AS, Odom-Maryon T, Roy S, Simpson JF. Abnormalities detected on transvaginal ultrasonography in tamoxifen-treated postmenopausal breast cancer patients may represent endometrial cystic atrophy. *Am J Obstet Gynecol.* 1998; 178:1145-50.

McGurgan P, Taylor LJ, Duffy SR, O'Donovan PJ. Does tamoxifen therapy affect the hormone receptor expression and cell proliferation indices of endometrial polyps? An Immunohistochemical comparison of endometrial polyps from postmenopausal women exposed and nor exposed to tamoxifen. *Maturitas.* 2006; 54:252-9.

Melki LAH, Tostes Filho W. Histeroscopia panorâmica: atlas e texto. Rio de Janeiro: Epume; 1992. 77p.

Menendez JA, Oza BP, Atlas E, Verma VA, Mehmi I, Lupu R. Inhibition of tumor-associated fatty acid synthase activity antagonizes estradiol-and tamoxifen-induced agonist transactivation of estrogen receptor (ER) in human endometrial adenocarcinoma cells. *Oncogene.* 2004; 23:4945-58.

Montes GS, Nicoletis MAL, Brentani-Samaia HP, Furuie SS. Collagen fibril diameters in arteries of mice – A comparison of manual and computer-aided morfometric analyses. *Acta Anatomic.* 1989; 135:57-61.

Morales L, Timmerman D, Neven P, Konstantinovic ML, Carbonez A, Van Huffel S, et al. Third generation aromatase inhibitors may prevent endometrial growth and reverse tamoxifen-induced uterine changes in postmenopausal breast cancer patients. *Ann Oncol.* 2005; 16: 70-4.

Morgan DO. Cyclin-dependent kinases; engines, clocks and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1997; 13: 261-91.

Morgan DO. The cell cycle: principles of control. London: New Science Press. 2006; 297p.

Mosselman S, Polman J, Dijkema R. ER-beta identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett.* 1996; 392:49-53.

Mourits MJ, Hoor KA, van der Zee AG, Willemse PH, de Vries EG, Hollema H. The effects of tamoxifen on proliferation and steroid receptor expression in postmenopausal endometrium. *J Clin Pathol.* 2002; 55:514-9.

Murray AW. The genetics of cell cycle checkpoints. *Curr Opin Genet Dev.* 1995; 5:5-11.

Murray AW. Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell.* 2004; 116:221-34.

Nadais RF, Campaner AB, Piato S, Galvão MAL, Santos RE, Aoki T. Langerhans cells and smoking in intraepithelial neoplasia of the cervix. *Gynecol Oncol.* 2006; 102:356-60.

National Institute of Health. Understanding Cancer Series: Estrogen Receptors/SERMs. 2006. [on line] Available from:

<http://www.cancer.gov/cancertopics/understandingcancer/estrogenreceptors> [23 Oct 2007]

Nieder C, Petersen S, Petersen C, Thames HD. The challenge of p53 as prognostic and predictive factor in Hodgkin's or non-Hodgkin's lymphoma. *Ann Hematol.* 2001; 80:2-8.

Nishimura N, Hachisuga T, Saito T, Kawarabayashi T. Subsequent endometrial carcinoma with adjuvant tamoxifen treatment in Japanese breast cancer patients. *Int J Gynecol Cancer.* 2001; 11:272-6.

Noda H, Maehara Y, Irie K, Kakeji Y, Yonemura T, Sugimachi K. Increased proliferative activity caused by loss of p21(WAF1/CIP1) expression and its significance in patients with early-stage gastric carcinoma. *Cancer.* 2002; 94:2107-12.

North American Menopause Society. Menopause Core Curriculum Study Guide. 2<sup>nd</sup> ed. Cleveland (Ohio): North American Menopause Society; 2002.

Oft M, Heider KH, Beug H. TGF beta signaling is necessary for carcinoma cell invasiveness and metastasis. *Curr Biol.* 1998; 8: 1243-52.

Olson SH, Finstad CL, Harlap S, Kurian L, Saigo PE, Barakat RR. A case-case analysis of factors related to overexpression of p53 in endometrial cancer following breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1997; 6: 815-7.

Orvieto R, Bar-Hava I, Dicker D, Bar J, Bem-Rafael Z, Neri A. Endometrial polyps during menopause: characterization and significance. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1999; 78:883-6.

Ozkara SK, Corakci A. Significantly decreased p27 expression in endometrial carcinoma compared to complex hyperplasia with atypia (correlation with p53 expression). *Pathol Oncol Res.* 2004; 10:89-97.

Pace S, Grassi A, Franceschini C, Villani C, Frega A, Lotti G. Aspetti diagnostic e terapeutici dei polipi endometriali. *Minerva Ginecol.* 1992; 44:227-31.

Park BJ, Park JI, Byun DS, Park JH, Chi SG. Mitogenic conversion of transforming growth factor-beta 1 effect by oncogenic Ha-Ras-induced activation of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human prostate cancer. *Cancer Res.* 2000; 60:3031-8.

Pavletich NP. Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdk, their cyclin activators, and CIP and Ink4 inhibitors. *J Mol Biol.* 1999; 287:821-8.

Pinheiro W, Tantini C, Pinotti JA. Histeroscopia Diagnóstica. In: Ueno J, Santos NC, Pinheiro W, Pinotti JA. *Cirurgia vídeo-endoscópica em ginecologia.* São Paulo: Roca; 1997. p.325-9.

Prunier C, Mazars A, Noe V, Bruyneel E, Mareel M, Gespach C, et al. Evidence that Smad2 is a tumor suppressor implicated in the control of cellular invasion. *J Biol Chem.* 1999; 274: 22919-22.

Ramondetta LM, Palazzo JP, Dunton CJ, Kovatich AJ, Carlson JA. A comparative analysis of ki-67, p53, and p-2 WAF1/CIP1 expression in tamoxifen associated endometrial carcinomas. *Anticancer Res.* 1998; 4661-6.

Reiss M. TGF-beta and cancer. *Microbes Infect.* 1999; 1:1327-47.

Reslova T, Tosner J, Resl M, Kurgler R, Vávrová I. Endometrial polyps. A clinical study of 245 cases. *Arch Gynecol Obstet.* 1999; 262:133-9.

Risberg B, Karlsson K, Abeler V, Lagrelidius A, Davidson B, Karlsson MG. Dissociated expression of Bcl-2 and Ki-67 in endometrial lesions: diagnostic and histogenetic implications. *Int J Gynecol Pathol.* 2002; 21:155-60.

Roberts AB, Frolik CA, Anzano MA, Sporn MB. Transforming growth factors from neoplastic and nonneoplastic tissues. *Fed Proc.* 1983a; 42:2621-6.

Roberts AB, Anzano MA, Meyers CA, Wideman J, Blacher R, Pan YC, et al. Purification and properties of a type beta transforming growth factor from bovine kidney. *Biochemistry.* 1983b; 22:5692-8.

Russo AA, Jeffrey PD, Pavletich NP. Structural basis of cyclin-dependent kinase activation by phosphorylation. *Nat Struct Biol.* 1996; 3:696-700.

Sadot E, Geiger B, Oren M, Ben-Ze'ev A. Down-regulation of beta-catenin by activated p53. *Mol Cell Biol.* 2001; 21:6768-81.

Sartor BM, Sartor O, Flanders KC. Analogous tamoxifen and estrogen effects on transforming growth factor-beta 1 and 2 in the rat uterus. *Reprod Toxicol.* 1995; 9:225-31.

Savelli L, De Iaco P, Santini D, Rosati F, Ghi T, Pignotti E, et al. Histopathologic features and risk factors for benignity, hyperplasia and cancer in endometrial polyps. *Am J Obstet Gynecol.* 2003; 188: 927-31.

Servy E, Greenblatt RB, Scholer HF, Mahesh VB. L'histoire du clomiphène et de ses isômeres. *Gynecol Prat.* 1970;21:453-66.

Schmitt FC, Andrade LM, Lucca LA. Detection of estrogen receptor in formallin-fixed and paraffin-embedded breast carcinoma: correlation with histological patterns. *Rev Paul Méd.* 1992; 110: 158-61.

Schmitt FC, Bento MJ, Amendoeira I. Estimation of estrogen receptor content in fine-needle aspirates from breast cancer using the monoclonal antibody 1D5 and microwave oven processing: correlation with paraffin embedded and frozen sections determinations. *Diag Cytopathol.* 1995; 13: 347-51.

Sgambato A, Cittadini A, Faragila B, Weinstein IB. Multiple functions of p27 (Kip1) and its alterations in tumor cells: a review. *J Cell Physiol.* 2000; 183: 18-27.  
Shackelford RE, Kaufmann WK, Paules RS. Cell cycle control, checkpoint mechanisms, and genotoxic stress. *Environ Health Perspect.* 1999; 107(suppl 1):5-24.

Shang Y, Hu X, DiRenzo J, Lazar MA, Brown M. Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription. *Cell.* 2000; 103: 843-52.

Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 1999; 13:1501-12.

Shiozawa T, Nikaido T, Nakayama K, Lu X, Fujii S. Involvement of cyclin-dependent kinase inhibitor p27 Kip1 in growth inhibition of endometrium in the secretory phase and of hyperplastic endometrium treated with progesterone. *Mol Hum Reprod.* 1998; 4:899-905.

Sington JD, Manek S. Cytological atypia in endometrial polyps and immunostaining for p16, p53 and Ki67. *Histopathology.* 2002; 41:86-8.

Siufi AA, Silva IDCG, Darbes RCM, Takita LC, Lima GR, Gonçalves WJ. Effects of tamoxifen therapy on the expression of p27 protein in the endometrium of women with primary breast cancer. *Int J Oncol.* 2003; 24: 1545-51.

Sociedade Brasileira de Cardiologia, Sociedade Brasileira de Hipertensão, Sociedade Brasileira de Nefrologia. V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. [on line] São Paulo, 13 de fevereiro de 2006. Disponível em: <http://publicacoes.cardiol.br/consenso/2006/VDiretriz-HA.pdf> (18 julho 2007).

Speroff L, Fritz MA. *Clinical gynecologic endocrinology and infertility.* 7<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.

Sporn MB, Roberts AB. TGF-beta: problems and prospects. *Cell Regul.* 1990; 1: 875-82.

Sporn MB. TGF-beta 20 years and counting. *Microbes Infect.* 1999; 1:1251-3.

Strauss HG, Wolters M, Methfessel G, Buchmann J, Koelbl H. Significance of endovaginal ultrasonography in assessing tamoxifen-associated changes of the endometrium. A prospective study. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2000; 79: 697-701.

Stygar D, Muravitskaya N, Erikson B, Erikson H, Sahlin L. Effects of SERM (Selective Estrogen Receptor Modulator) treatment on growth and proliferation in the rat uterus. *Reprod Biol Endocrinol*. [serial on line] 2003; 1: 40. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=156658> [2007 May 18]

Sun L, Wu G, Willson J, Zborowska E, Yang J, Rajkarnnanayake I, et al. Expression of transforming growth factor beta type II receptor leads to reduced malignancy in human breast cancer MCF-7 cells. *J Biol Chem*. 1994; 269: 26449-55.

Takeuchi M, Matsuzaki K, Uehara H, Shimazu H, Nishitani H. A case of adenomyomatous polyp of the uterus associated with tamoxifen therapy. *Radiat Med*. 2005; 23: 432-4.

Tate S, Yamazawa K, Sekiya S. Endometrial cancer within tamoxifen-related polyps in patients with breast cancer. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2004; 83:769-70.

Tavassoli FA, Devilee P, editors. World Health Organization classification of tumors: Pathology and Genetics of Tumors of the Breast and Female genital Organs. Lyon: IARC Press; 2003.

Tolosa EMC, Rodrigues CJ, Behmer AO, Freitas Neto AG. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. 2ª ed. São Paulo: Manole, 2003. p. 43-6.

Toyoshima H, Hunter T. p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell*. 1994; 78: 67-74.

Tregón ML, Blumel JE, Tarín JJ, Cano A. The early response of the postmenopausal endometrium to tamoxifen: expresión of estrogen receptors, progesterone receptors, and Ki-67 antigen. *Menopause*. 2003; 10:154-9.

Tremain R, Marko M, Kinnimulki V, Ueno H, Bottinger E, Glick A. Defects in TGF-beta signaling overcome senescence of mouse keratinocytes expressing v-Ha-ras. *Oncogene*. 2000; 19:1698-709.

Ubersax JA, Woodburg EL, Quang PN, Paraz M, Blethrow JD, Shah K, et al. Targets of the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Nature*. 2003; 425:859-64.

Ugwumagu AH, Carmichaels PL, Neven P. Tamoxifen and the female genital tract. *Int J Gynecol Cancer*. 1998; 8:6-15.

Van den Bosch T, Van Schoubroeck D, Ameye L, De Brabanter J, Van Huffel S, Timmerman D. Ultrasound assessment of endometrial thickness and endometrial polyps in women on hormonal replacement therapy. *Am J Obstet Gynecol*. 2003; 188:1249-53.

Veronesi U, Maisonneuve P, Costa A, Sacchini V, Maltoni C, Robertson C, et al. Prevention of breast cancer with tamoxifen: Preliminary findings from the Italian randomised trial among hysterectomised women Italian Tamoxifen Prevention Study. *Lancet*. 1998; 352:93-7.

Vojtesek B, Bártek J, Midgley CA, Lane DP. An immunochemical analysis of the human nuclear phosphoprotein p53. New monoclonal antibodies and epitope mapping using recombinant p53. *J Immunol Methods*. 1992; 151:237-44.

Vosse M, Renard F, Coibion M, Neven P, Nogaret JM, Hertens D. Endometrial disorders in 406 breast cancer patients on tamoxifen: the case for less intensive monitoring. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2002;101:58-63.

Wickerham DL, Fisher B, Wolmark N, Bryant J, Costantino J, Bernstein L, et al. Association of tamoxifen and uterine sarcoma. *J Clin Oncol*. 2002; 20: 2758-60.

Wieser R. The transforming growth factor-beta signaling pathway in tumorigenesis. *Curr Opin Oncol*. 2001; 13: 70-7.

Yamazawa K, Matsui H, Ishikura H, Seki K, Sekiya S. Clear cell adenocarcinoma within a tamoxifen-related polyp. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2002; 81:985-7.

Ye S, Foster JM, Li W, Liang J, Zborowska E, Venkateswarlu S, et al. Contextual effects of transforming growth factor beta on the tumorigenicity of human colon carcinoma cells. *Cancer Res*. 1999; 59: 4725-31.

Zhu X, Kwon CH, Schlosshauer PW, Ellenson LH, Baker SJ. PTEN induces G(1) cell cycle arrest and decreases cyclin d3 levels in endometrial carcinoma cells. *Cancer Res* 2001; 61: 4569-75.

## **9.RESUMO**

O presente estudo teve como objetivo comparar a imunoreatividade das proteínas TGF- $\beta$ , p53, p21 e p27 em pólipos e endométrio adjacente de mulheres após a menopausa usuárias de tamoxifeno. Foram incluídas 30 mulheres avaliadas previamente por ultra-sonografia transvaginal e submetidas à histeroscopia diagnóstica e cirúrgica para ressecção do pólipo endometrial e endométrio adjacente. Os critérios de exclusão foram: mulheres usuárias de terapia hormonal, inibidores da aromatase e ultra-sonografia transvaginal anormal prévia ao uso do tamoxifeno. O estudo da expressão das proteínas TGF- $\beta$ , p53, p21 e p27 foi realizado por métodos imunoistoquímico e morfométrico. Para análise estatística, foram utilizados os testes *t* de *Student* e de *Kruskal-Wallis*. Houve expressão maior da p53 no epitélio glandular do pólipo quando comparado ao endométrio adjacente e não houve diferença nas outras proteínas quando da mesma comparação. Não observamos diferença nas proteínas quando comparamos o estroma do pólipo e endométrio. Quando comparamos isoladamente somente o epitélio glandular e seu estroma tanto no pólipo quanto no endométrio adjacente observamos que há expressão maior das proteínas p21 e p27 no epitélio glandular.

## **10.SUMMARY**

The objective of this study was to compare the expression protein TGF- $\beta$ , p53, p21 and p27 in polyps and adjacent endometrial in postmenopausal women users of tamoxifen. We included 30 women evaluated previously by ultra-sonography transvaginal and submitted to hysteroscopy diagnostic and surgical resection for the polyp and adjacent endometrial. The exclusion criteria were: women users of hormone therapy, aromatase inhibitors and ultra-sonography transvaginal abnormal prior to the use of tamoxifen. The study of the expression of the protein TGF- $\beta$ , p53, p21 e p27 was conducted by immunohistochemical analysis and morphometry. To the statistical analysis we used Student's t test and Kruskal-Wallis test. There was more expression of p53 in the glandular epithelium of the polyp when compared to adjacent endometrial and there was no difference in other proteins when the same comparison. No observed difference in proteins when compared to the stroma of the polyps and endometrial. When compared isolation only the glandular epithelium and its stromal both in polyp on the adjacent endometrial noticed that there is greater expression of the proteins p21 and p27 in the glandular epithelium.

# Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

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

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

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