

Sergimar Padovezi Miranda

**Expressão das proteínas p53, Ki 67 e CD31 nos
pólipos endometriais em mulheres na pós-
menopausa usuárias de tamoxifeno.**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia – área
de concentração Ginecologia, da Faculdade de
Medicina de Botucatu da Universidade Estadual
Paulista, para obtenção do Título de Doutor em
Ginecologia

Orientador: Professor Dr. Paulo Traiman
Co-Orientador: Professor Dr. Agnaldo Lopes da Silva Filho

Botucatu / São Paulo
2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Miranda, Sergimar Padovezi.

Expressão das proteínas p53, Ki 67 e CD31 nos pólipos endometriais em mulheres na pós-menopausa usuárias de tamoxifeno / Sergimar Padovezi Miranda – Botucatu: [s.n.], 2007.

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2007.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Traiman

Co-orientador: Prof. Dr. Agnaldo Lopes da Silva Filho

Assunto CAPES:

1. Endométrio. 2. Ginecologia. 3. Proteínas - Pesquisa. 4. Pós-menopausa.

CDD 618.175

Palavras chave: CD31; Ki67; p53; Pólipo endometrial; Tamoxifeno.

Dedicatória

DEDICO ESTA TESE...

À minha mulher Raquel,

aos meus filhos Henrique, Maria Eduarda e Pedro,

aos meus pais, Nair e Manoel (in memoriam).

Agradecimientos

Ao Professor Paulo Traiman pela oportunidade de trabalhar sob a sua orientação na realização dessa tese.

Ao Professor Sérgio Augusto Triginelli pelo apoio na realização desse doutorado.

Ao Professor Agnaldo Lopes da Silva Filho pela dedicação e estímulo na realização dessa tese.

Ao Professor Fernando Marcos dos Reis, pela disponibilidade no auxílio do cálculo amostral.

Aos patologistas Marco Antonio Dias e Marco Antonio Dias Filho, pela avaliação das peças cirúrgicas e dos estudos imunohistoquímicos.

Aos colaboradores do Setor de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu da Unesp, Regina, Nathanael, Janete, Lillian, Andréa e Ana Cláudia, pela disponibilidade e preciosa ajuda.

Epigrafe

“Não há nada de errado com aqueles que não gostam de política. Simplesmente serão governados por aqueles que gostam”

Platão

Índice

Siglas**Resumo**

1. Introdução	1
1.1. Carcinogênese	2
1.2. Proteína p53.....	3
1.3. Proliferação celular.....	5
1.4. Angiogênese	7
2. Objetivos	9
3. Casuística e Métodos	10
3.1. Casuística.....	10
3.1.1. Critérios de inclusão	10
3.1.2. Critérios de exclusão	11
3.2. Métodos.....	11
3.2.1. Avaliação das proteínas p53, Ki-67 e CD31.....	12
3.2.2. Análise estatística.....	18
4. Resultados	19
4.1. Características da amostra.....	19
4.2. Avaliação das proteínas p53, Ki-67 e CD31 nos pólipos endometriais.....	19
5. Discussão	21
5.1. Metodologia.....	21
5.2. Expressão das proteínas p53, Ki-67 e CDD-31 nos pólipos endometriais.....	24
5.3. Considerações finais.....	26
6. Conclusão	28
7. Referências bibliográficas	29
8. Anexos	40
I. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Vila da Serra (COEP).....	40
II. Consentimento livre e esclarecido.....	41
III. Estadiamento do câncer de endométrio (FIGO).....	43
IV. Tabela de distribuição das mulheres.....	44
9. Summary	46

Siglas

CDKs	Quinases dependentes de ciclina
cm	Centímetro
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
Complexo ABC	Técnica Avidina-biotina-peroxidase
DAB	3,3' diaminobenzidina
DNA	Ácido desoxirribonucléico
FIGO	Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
GADD-45	Growth Arrest DNA Damage
H2O2	Água oxigenada
HE	Hematoxilina e eosina
IHQ	Imunohistoquímica
kd	Kilodalton
MB-1	Anticorpo monoclonal de camundongo que reage com o antígeno nuclear Ki-67
MDM-2	Gene mouse double minute 2
min	Minuto
µm	Micrômetro
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
SST	Solução salina tamponada
VEGF	Vascular endothelial growth factor

Resuma

Introdução: O processo de carcinogênese implica a aquisição de alelos mutantes de genes supressores de tumor, aumento na proliferação celular e necessidade de angiogênese. Este estudo analisa a expressão das proteínas p53, Ki-67 e CD31 nos pólipos endometriais em mulheres na pós-menopausa usuárias de tamoxifeno. **Métodos:** Foram estudadas amostras de pólipos endometriais obtidas de mulheres em uso de tamoxifeno (n=20), pólipo sem uso de hormônios (n=20), endométrio atrófico (n=20) e câncer de endométrio (n=20). O material foi fixado em formol, incluído em parafina e processado para marcação imunohistoquímica para as proteínas p53, Ki-67 e CD31. A comparação entre os grupos foi feita utilizando-se o qui-quadrado, teste *t* de Student e ANOVA. As diferenças com valor de $p < 0,05$ foram consideradas significativas. **Resultados:** A idade das mulheres variou de 55 a 85 anos ($64,6 \pm 1,7$ ano). Não houve diferença em relação à expressão da proteína p53 nos diferentes grupos ($p = 0,067$). Uma expressão de Ki-67 em mais de 5% das células foi evidenciada em 40% dos pólipos cujas mulheres faziam uso de tamoxifeno e em 15% daquelas sem uso de hormônios ($p = 0,0047$). A expressão da proteína CD31 foi maior em pólipos de usuárias de tamoxifeno em comparação ao endométrio atrófico ($37,5 \pm 3,2$ versus $22,2 \pm 1,3$; $p < 0,001$) e semelhante aos pólipos sem uso de hormônios ($37,5 \pm 3,2$ versus $33,7 \pm 2,0$; $p = 0,319$). **Conclusão:** A utilização de tamoxifeno parece estar associada a um aumento da proliferação celular nos pólipos endometriais, sem interferir na angiogênese ou inativação de proteínas supressoras de tumor.

1. Introdução

O câncer endometrial é mais comum doença maligna do trato genital feminino nos países desenvolvidos (1). Os fatores de risco incluem elevado índice de massa corpórea, hipertensão, estrogênio isolado, uso de tamoxifeno, nuliparidade, predisposição genética, anovulação crônica (2).

O risco de câncer de endométrio em paciente com pólipos endometrial é aproximadamente o dobro do grupo sem pólipos; apesar da sua transformação maligna ser incomum (3,4). Os fatores de risco para transformação carcinomatosa dos pólipos endometriais são: menopausa tardia, hipertensão, obesidade e uso de tamoxifeno(5-7).

A transformação maligna dos pólipos endometriais em usuárias de tamoxifeno tem sido relatada entre 3 a 10,7%, sem associação com o tamanho do pólipo ou o tempo de exposição ao tamoxifeno. Esse percentual é maior do que os controles ou a população em geral. (8,9). Sendo que o aumento da expressão do p53 e Ki67 está associado ao estadiamento, sub-tipo histológico e invasão miometrial do câncer. (5)

Cabe realçarmos que a formação de pólipos com ou sem a presença de atipias pode ser um estágio intermediário no desenvolvimento do carcinoma endometrial associado ao uso de tamoxifeno (10). Sendo que o desenvolvimento de atipia, em um pólipo endometrial não hiperplásico, pode representar o passo inicial do processo de carcinogênese. (11)

1.1 Carcinogênese

Nas últimas décadas ocorreu uma verdadeira revolução no conhecimento do câncer humano. A Biologia Molecular propiciou o entendimento de determinados aspectos da carcinogênese antes não elucidados, assim como se reconheceu a natureza gênica dessa doença. (12)

As neoplasias, tanto benignas quanto malignas, são doenças genéticas cujas mutações que lhes dão origem podem ser hereditariamente transmitidas pela linhagem germinativa ou adquiridas nos tecidos somáticos. (13)

A multiplicação celular é um processo cuidadosamente regulado nas células normais. Em algumas situações esse controle falha e as células começam a crescer e dividir, sem responder à regulação, constituindo um clone de células com a capacidade de se expandir indefinidamente, formando os tumores. O desenvolvimento do câncer em humanos envolve uma complexa sucessão de eventos regulada por padrões genéticos e bioquímicos preestabelecidos. (14,15) As alterações genéticas em uma célula cancerosa não são herdadas por meio de gametas, mas constituem mudanças no ácido desoxirribonucléico (DNA) das células somáticas. Assim, alteração do DNA está no centro da indução do câncer (15).

As células neoplásicas demonstram algumas características biológicas, como evasão do apoptose, resistência aos fatores inibidores de crescimento, emissão de seus próprios sinais mitogênicos, perda da

diferenciação, aquisição de neovascularização e, no caso de tumores mais avançados, capacidade de invasão e metastatização (15, 16). Além da instabilidade genética proporcionando um aumento nas mutações. (17)

O processo de carcinogênese implica, dentre outros fatores, a aquisição de alelos mutantes de genes supressores de tumor, aumento na proliferação celular e necessidade de angiogênese para o crescimento tumoral (16).

Em decorrência dessas alterações, funções celulares que, normalmente, estariam sob controle, passam a serem exercidas de maneira desordenada, resultando na expressão exagerada de algumas proteínas responsáveis pela proliferação celular. (14, 15, 16).

Entre essas proteínas encontram-se a p53, cuja função é controlar o ciclo celular, a proteína Ki-67, utilizada como marcador de proliferação celular; e a CD31, que permite a avaliação da angiogênese.

1.2 Proteína p53

Os genes supressores de tumor são genes que codificam proteínas capazes de regular o crescimento celular. Apresentam como característica a perda de função na ocorrência de deleção de um dos alelos, o que é denominado de perda de heterozigose.(18).

O gene p53, inicialmente descrito em 1979, foi o primeiro gene supressor de tumor identificado. Ele é considerado como o "guardião do genoma", e dentre todos aqueles reconhecidamente envolvidos nos processos de carcinogênese, é o de maior importância. Esse gene codifica uma fosfoproteína nuclear de 53 kilodaltons (kd), chamada p53, a qual desempenha um papel importante no controle do ciclo celular, no reparo do DNA e na indução do apoptose. (19, 20). Sendo que a perda de função do gene p53 é o evento genético mais freqüentemente descrito em cânceres humanos. (19, 21). As mutações do gene p53 ocorrem em cerca de metade das neoplasias malignas. (22)

No início do ciclo mitótico, o gene p53 ativa o gene p21, induzindo a síntese da proteína p21, cuja função é inibir a ação das quinases dependentes de ciclina (CDKs), fazendo com que as células parem na fase G1 do ciclo celular, até que se complete o reparo do DNA. Para tanto, a proteína p53 ativa o gene Growth Arrest DNA Damage (GADD-45), que atua corrigindo a lesão no DNA. Quando o reparo do DNA é finalizado, a proteína p53 é degradada pela ação da proteína MDM-2, produto do gene mouse double minute 2 (mdm-2). Não ocorrendo restauração do DNA, o gene p53 sinaliza para outros genes reguladores, como bax, bcl-2 e c-myc, e induz a apoptose, eliminando, assim, a célula com a informação genética avariada. O gene p53 promove, também, um ponto de verificação de S para G2, que depende da integridade do domínio C-terminal do gene. (22-24).

Quando p53 sofre mutações, as células com danos no DNA, que por um processo de seleção natural favorável podem desencadear a transformação maligna, escapam do reparo destes danos e de sua destruição,

podendo iniciar um clone maligno (23, 25). Esse sistema de funcionamento do gene p53 está geralmente inativado, tornando-se ativo apenas quando as células sofrem alguma agressão. (19) Dessa forma, a proteína p53 é encontrada em quantidades mínimas nas células em condições normais. (22)

A proteína p53 na forma selvagem tem meia-vida curta, de seis a vinte minutos, sendo dificilmente detectada por imunohistoquímica (IHQ). As mutações no gene p53 resultam em uma expressão protéica de meia-vida prolongada e acúmulo da proteína mutante, em níveis detectáveis pela IHQ. (26)

As mutações do p53 aparecem em etapas específicas durante a transformação maligna. Mutações do gene p53 geralmente coincidem com o aparecimento de carcinoma in situ, como por exemplo: de cólon, trato digestório alto, mama e bexiga. Em alguns casos, a alteração do p53 coincide com a emergência de tumores biologicamente agressivos e a perda da diferenciação celular, como tumor anaplásico de Wilms, tumor de tireóide, glioma maligno ou anaplásico, melanoma metastático e invasivo, e câncer de próstata (27).

Numerosos estudos têm investigado imunohistoquimicamente o p53 no diagnóstico, prognóstico e valor preditivo em várias neoplasias. Sendo que o aumento da expressão de p53 é baixo em pólipos endometriais, hiperplasia e carcinoma endometrióide G1. (28). Também tem sido relatado um aumento da expressão da p53 em câncer de endométrio associado ao uso de tamoxifeno.(2) Outro estudo analisou a expressão da proteína p53 em pólipos e endométrio atrófico(29).

1.3 Proliferação celular

O controle da divisão celular é um evento crítico para o funcionamento normal das células. (15) Os processos reguladores da carcinogênese interferem diretamente ou indiretamente na proliferação celular. (14,16).

O ciclo celular inicia-se com a ligação de fatores de crescimento a receptores de membrana, os quais ativam proteínas transdutoras de sinais. Uma vez que esses sinais chegam ao núcleo, são ativados fatores de regulação nuclear, que iniciam a transcrição do DNA e conseqüente divisão celular. O ciclo celular desenvolve-se em quatro etapas, denominadas de fases G1 (gap ou lacuna), S (síntese), G2 e M (mitose). Na fase G1, com aproximadamente oito horas, a célula acumula no citoplasma os materiais necessários para o desdobramento do DNA. Em seguida, há uma pausa denominada ponto R ou primeira parada, na qual haverá uma verificação do DNA antes da progressão do ciclo. Se houver alguma anormalidade na informação genética, ela deverá ser reparada durante esta parada. Caso contrário, a célula não poderá prosseguir seu ciclo. Na fase S, com duração aproximada de oito horas, ocorre a replicação do DNA. Na etapa seguinte, fase G2, que dura quatro horas, há o armazenamento dos materiais necessários para a mitose. Por último, ocorre a fase M, com duração de uma e meia a duas horas, em que há a duplicação da célula. Nos tecidos cujas células se reproduzem muito raramente, como a fibra muscular, ou que nunca se dividem,

como os neurônios do tecido nervoso, o ciclo celular é interrompido em G1 em um ponto específico denominado G0. (15, 22).

As células em proliferação expressam em seus núcleos uma proteína não-histônica de meia-vida curta, chamada Ki-67. Essa proteína está presente em todos os estágios do ciclo celular, exceto na fase G0. (26)

O MIB-1 é um anticorpo monoclonal de camundongo que reage com o antígeno nuclear Ki-67. Vários tumores têm sido estudados com esse marcador, sendo evidenciada uma correlação positiva dele com o grau de diferenciação histológica e a sobrevida dos pacientes. (31,32)

O aumento da expressão do Ki67 é indicativo de aumento de atividade mitótica celular e proliferação. Durante a fase proliferativa do ciclo menstrual, a expressão do Ki67 é normalmente elevada (33).

A expressão da proteína Ki67, em pólipos endometriais, tem sido objeto de estudos por grupos de pesquisas, com resultados contraditórios (33,34,61,62).

1.4 - Angiogênese

Angiogênese é complexo processo de formação de novos vasos sanguíneos a partir da proliferação de uma rede vascular pré-existente. (36) As células dos mamíferos necessitam de oxigênio e nutrientes para sobreviverem. Por esse motivo, localizam-se a uma distância de 100 a 200 μm

dos vasos sanguíneos, que constitui o limite para difusão do oxigênio. O crescimento acima desse limite implica a necessidade de recrutamento de novos vasos sanguíneos (37,38).

Esse processo é causado por um desequilíbrio no balanço entre fatores promotores e inibidores da angiogênese. (37,39). Sendo que a vascularização do tecido tumoral é pré-requisito para o seu crescimento e disseminação. (40)

A neo-angiogênese ocorre na transição do processo hiperplásico para neoplasia, portanto antes da formação tumoral propriamente dita. Este fato sugere que a indução da angiogênese constitui etapa importante na carcinogênese. (41)

A mensuração da densidade vascular em câncer de mama, por meio da identificação imunohistoquímica do antígeno relacionado ao fator VIII das células endoteliais, foi sugerido por Weidner et al. (42) A partir de então, a técnica imunohistoquímica para a identificação de vasos neoformados, utilizando a formação de complexo antígeno-anticorpo específico, vem sendo largamente utilizada por ser de fácil reprodutibilidade na maioria dos laboratórios e por apresentar resultados bastante satisfatórios. (43)

No endométrio angiogênese tem um papel importante não apenas no crescimento tumoral, mas também no ciclo menstrual. (44). Já nas condições neoplásicas do endométrio ocorre maior concentração vascular no carcinoma quando comparada ao endométrio atrófico ou hiperplásico. (45) A hiperplasia complexa e o adenocarcinoma são eficientes indutores de

angiogênese quando comparados ao endométrio normal e à hiperplasia simples. (46). O endométrio também responde ao tamoxifeno com aumento da vascularização especialmente nas mulheres na pré-menopausa. (47)

A angiogênese desempenha um importante papel na progressão tumoral e sobrevida das pacientes com câncer ginecológico, sendo descrita como um indicador prognóstico. (36,49) Sua detecção é feita por IHQ com um marcador de células endoteliais, como o fator VIII, CD31 e CD34. (48)

Apesar dos pólipos endometriais serem comuns nas mulheres na pós-menopausa em uso de tamoxifeno, os estudos sobre o risco de malignização são escassos na literatura. O melhor conhecimento a respeito da associação do uso de tamoxifeno, pólipo endometrial e câncer de endométrio torna-se necessário. Dessa forma esse estudo propõe avaliar importantes etapas do processo de carcinogênese nos pólipos endometriais de mulheres na pós-menopausa em uso de tamoxifeno.

2. Objetiva

Avaliar a expressão das proteínas p53, Ki-67 e CD31 nos pólipos endometriais em mulheres na pós-menopausa usuárias de tamoxifeno.

3. Casuística e Métodos

3.1 Casuística

O estudo foi realizado prospectivamente em 80 mulheres, na pós-menopausa (definida como >12 meses após a última menstruação) atendidas, no Serviço de Vídeo-Endoscopia e Reprodução Humana no Hospital Vila da Serra, no período de março de 2005 a Maio de 2007. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Vila da Serra (anexo I).

As pacientes foram divididas em 4 grupos:

Grupo 1 – 20 mulheres com pólipos endometriais confirmados por exame anatomopatológico, em uso de tamoxifeno (Novaldex, Astra Zeneca, BR).

Grupo 2 – 20 mulheres portadoras de pólipos endometriais confirmados por exame anatomopatológico.

Grupo 3 – 20 mulheres com endométrio atrófico, confirmado por exame anatomopatológico.

Grupo 4 – 20 mulheres com carcinoma de endométrio, confirmado por exame anatomopatológico.

3.1.1 - Critérios de Inclusão

- ✓ mulheres com diagnóstico histopatológico de pólio endometrial, em uso de tamoxifeno há mais de 6 meses (Grupo 1)
- ✓ mulheres com pólio endometrial confirmado por exame anatomopatológico, sem uso de hormônios nos últimos 6 meses anteriores a polipectomia (Grupo 2)
- ✓ mulheres com diagnóstico histeroscópico de endométrio atrófico confirmado por exame anatomopatológico (Grupo 3)
- ✓ mulheres com tratamento cirúrgico para câncer de endométrio tipo endometrióide confirmado por exame anatomopatológico (Grupo 4)
- ✓ termo de consentimento livre e esclarecido da paciente

3.1.2 Critérios de exclusão

- ✓ pólipos endometriais cujos exames anatomopatológicos mostraram hiperplasia ou câncer endometrial.
 - ✓ bloco de parafina em condições inadequadas para o estudo imunohistoquímico.
 - ✓ radioterapia pélvica prévia
 - ✓ não concordância em participar do estudo
-

3.2 Métodos

As mulheres foram encaminhadas para avaliação na Unidade de Histeroscopia devido a alterações detectadas ao exame ultra-sonográfico: espessamento endometrial (endométri > 5mm) ou imagem anormal intra-uterina. Os procedimentos histeroscópicos realizados foram à biopsia endometrial (endométri > 5mm e câncer de endométrio) ou ressecção do pólip > endometrial.

A histeroscopia foi realizada sob anestesia venosa, sedação, em bloco cirúrgico, utilizando-se o histeroscópio (Karl Storz, Tuttlingen, Germany) com óptica de 30 graus e camisa diagnóstica de 5mm. Na presença de endométrio atrófico ou suspeita de câncer de endométrio era realizado biopsia dirigida ao final da visualização da cavidade endometrial. Diagnosticado pólip > endometrial realizava-se a dilatação cervical com velas de hegar até a número 9,5 e a polipectomia com o ressectoscópio (Karl Storz, Tuttlingen, Germany) munido de corrente monopolar. O meio de distensão utilizado foi o soro fisiológico na avaliação da cavidade endometrial e a solução de sorbitol + manitol nas polipectomias. Todos os procedimentos foram vídeo-assistidos.

As mulheres com o diagnóstico de câncer de endométrio, por biopsia histeroscópica, foram submetidas a laparotomia, lavado peritoneal, histerectomia total extra facial com anexectomia bilateral e linfadenectomia retroperitoneal.

Todo material obtido foi imediatamente fixado em formalina e encaminhado para exame anatomopatológico.

3.2.1 Avaliação da expressão das proteínas p53, Ki67 e CD31.

As avaliações imunohistoquímica para a detecção da expressão das proteínas p53, Ki67 e CD31 foram realizadas com os anticorpos produzidos pela DAKO (Carpinteria, CA, USA), utilizando-se a técnica da Avidina-Biotina-Peroxidase, também conhecida por Complexo Avidina-Biotina (ABC).

3.2.1.1 Técnica da Avidina-Biotina-Peroxidase

A técnica da Avidina-Biotina-Peroxidase é também conhecida por Complexo Avidina-Biotina (ABC) e é fundamentada na grande afinidade da avidina (uma glicoproteína de alto peso molecular) com a biotina (uma vitamina que pode ser conjugada a enzimas, anticorpos e substâncias fluorescentes) (Figura 1). O tecido é incubado com um anticorpo primário (mono ou policlonal) específico para a proteína em estudo. Em seguida, aplica-se um anticorpo secundário (que tem o anticorpo primário como alvo) previamente ligado a uma molécula de biotina. A avidina atua como amplificador de efeito, pois cada molécula de avidina que se acopla à biotina do anticorpo secundário liga-se simultaneamente a três outras moléculas de biotina conjugadas a peroxidase. A peroxidase atua sobre um corante especial e os sítios antigênicos ficam corados de forma estável, geralmente em tonalidade castanha.

Cortes histológicos seriados de cada caso, com espessura de 4 a 5 μm , foram obtidos em número suficiente para os anticorpos utilizados. Os cortes histológicos foram depositados sobre lâminas cobertas com adesivo poli-L-lisina (Sigma Chemical Company, St Louis, Missouri, EUA), e aquecidas a 60°C, por pelo menos 12 horas.

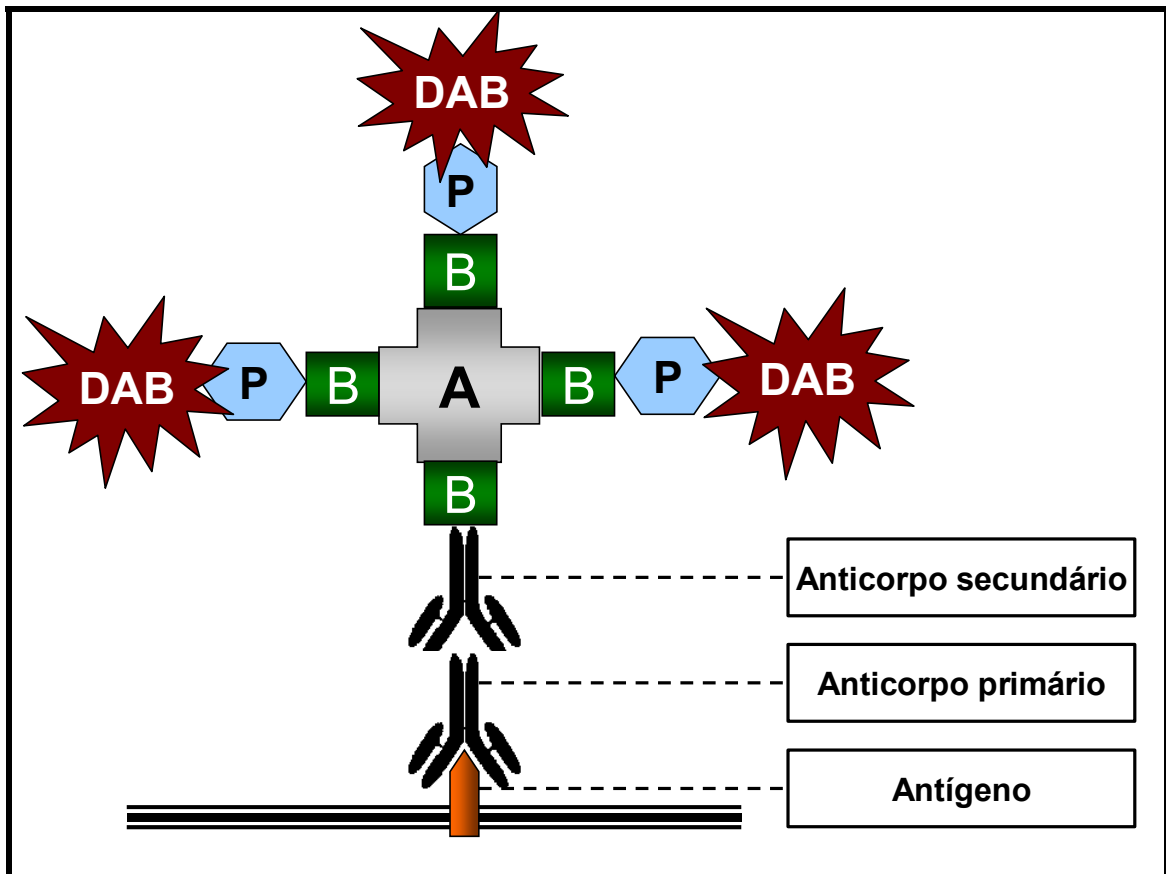


Figura 1 - Representação esquemática do princípio da imunohistoquímica pelo método da avidina-biotina-peroxidase. Observa-se o efeito amplificador da avidina (A) que se liga à biotina (B) do anticorpo secundário e a outras três moléculas de biotina. A peroxidase (P) reage com a 3,3'-diaminobenzidina (DAB) corando os sítios antigênicos.

Nota: A: Avidina; B: Biotina; P: Peroxidase; DAB: 3,3'-diaminobenzidina.

A seguir foi empregado o sistema avidina-biotina-peroxidase (ABC), descrito por Hsu et al. (1981)(50), com pequenas modificações, descrito a seguir: imediatamente antes da reação da técnica de IHQ, os cortes foram desparafinizados, hidratados, submetidos a H₂O₂ (no Catálogo H1009, Sigma Chemical Comp., St. Louis, Missouri, EUA) a 3%, por 5 minutos e lavados em solução salina tamponada (SST), pH 7,4. A recuperação antigênica foi realizada segundo método preconizado por Gown et al. (1993)(51), sendo os cortes incubados com solução tampão de citrato, pH 6,4, em forno de microondas caseiro (Sharp, modelo RB-4A56 BA, Manaus) por 15 minutos. Posteriormente, os cortes foram submetidos aos anticorpos monoclonais primários, anti-p53, MIB-1 e anti-CD31, overnight, à temperatura aproximada de 4°C. Após lavagem em SST, as lâminas foram incubadas por 60 minutos com anticorpo secundário biotinilado. O anticorpo secundário utilizado foi anti-IgG de camundongo, produzido em cavalo (No Catálogo BA 2000, VECTOR Corp., Burlingame, Califórnia, EUA). Seguiu-se aplicação de complexo ABC Elite® (No Catálogo PK 6100, VECTOR Corp., Burlingame, Califórnia, EUA) sobre os cortes, por 45 minutos. O complexo ABC foi preparado segundo orientação do fabricante, constando de solução com 5ml de SST, e 2 gotas de A (avidina) e 2 gotas de B (biotina). Para identificação da reação, as lâminas foram tratadas com solução de 3,3' diaminobenzidina (DAB) (No Catálogo D5637, Sigma Chemical Comp., St. Louis, Missouri, EUA), na concentração de 1mg/ml, em trizma (No Catálogo T1503, Sigma Chemical Comp., St. Louis, Missouri, EUA), e em solução de H₂O₂ a 0,1%. A contracoloração foi realizada com hematoxilina de Gill.

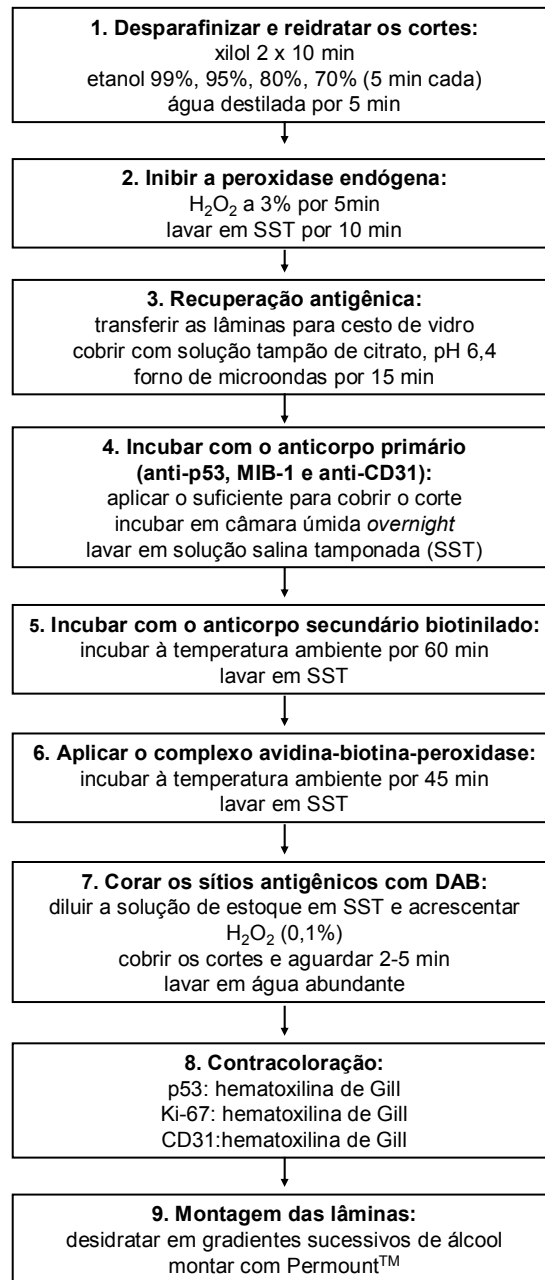


Figura 2 - Fluxograma do protocolo básico de imunohistoquímica pelo método da avidina-biotina-peroxidase (ABC) para detecção da expressão das proteínas p53, Ki-67 e CD31.

Nota: SST: solução salina tamponada; DAB: 3,3' diaminobenzidina

3.2.1.2 Anticorpos utilizados

Anti-p53: para a pesquisa da proteína p53, foi utilizado o anticorpo anti-p53 (clone DO7, no Catálogo M7001, DaKo Corp., Carpinteria, Califórnia, EUA) na diluição 1:400. O anticorpo secundário indicado é o anti-IgG de camundongo (VECTOR Corp.), 1:300. A contracoloração foi realizada com hematoxilina de Gill.

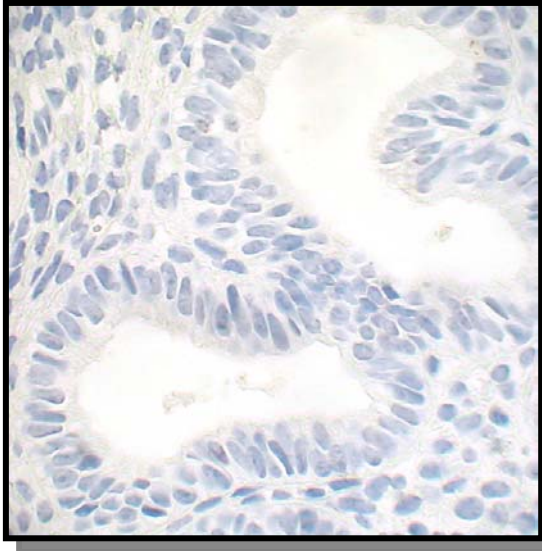
MIB-1: para a pesquisa da proteína Ki-67, foi utilizado o anticorpo MIB-1 (clone MIB-1, no Catálogo M7240, DAKO Corp.) na diluição 1:100. O anticorpo secundário indicado é o anti-IgG de camundongo (VECTOR Corp.), 1:300. A contracoloração foi realizada com hematoxilina de Gill.

Anti-CD31: para a pesquisa da proteína CD31, foi utilizado o anticorpo anti-CD31 (clone JC/70A, No Catálogo M0823, DAKO Corp.), na diluição 1:40. O anticorpo secundário é anti-IgG de camundongo (VECTOR Corp.), 1:300. A contracoloração pode ser feita com Hematoxilina de Gill.

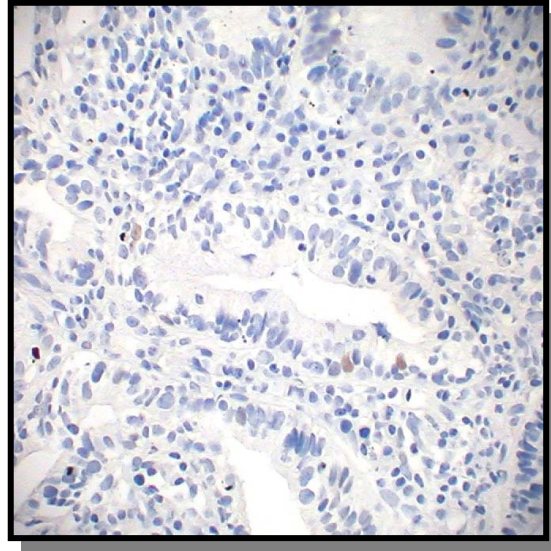
3.2.1.3 - Interpretação das reações de imunohistoquímica

Todas as lâminas foram examinadas independentemente por dois patologistas, que não tinham conhecimento do diagnóstico anatomopatológico. Essa quantificação foi realizada pelo estudo de um mínimo de 1000 células epiteliais, examinadas em cerca de 10 campos com 200 vezes de aumento. Na avaliação das proteínas p53 e Ki-67, apenas a coloração nuclear das células foi considerada para quantificação. Para a proteína CD31, foi considerada a sua expressão no citoplasma e na membrana das células endoteliais.

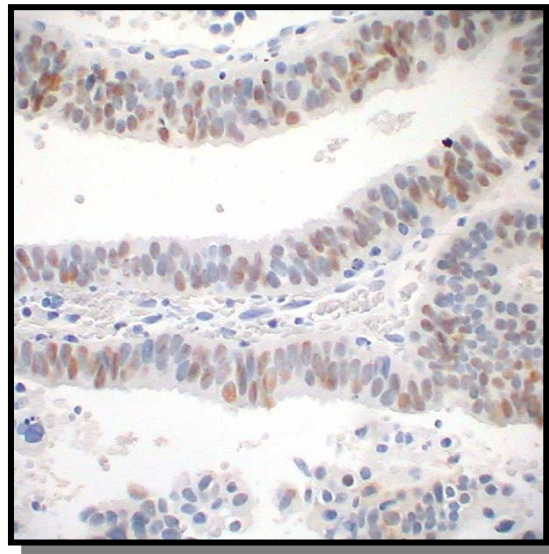
A expressão das proteínas p53 e Ki67 foram classificadas em graus de acordo com o percentual de células glandulares coradas: grau 1 - <5%, grau 2 – 5 a 25%, grau 3 – 26 a 75%, grau 4 > 75%. (Figuras 3 e 4)



p53 – Grau 1



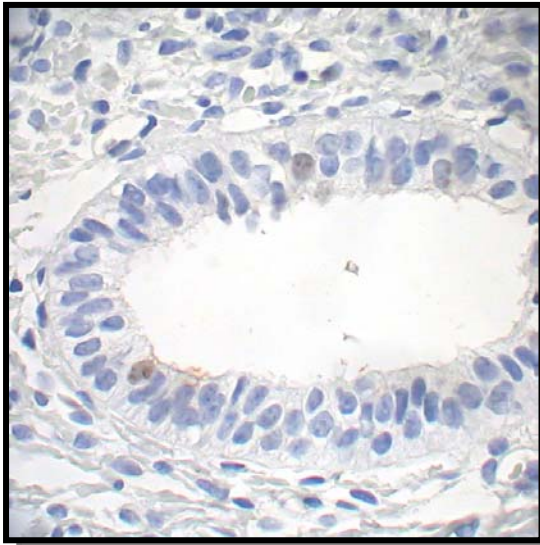
p53 Grau 2



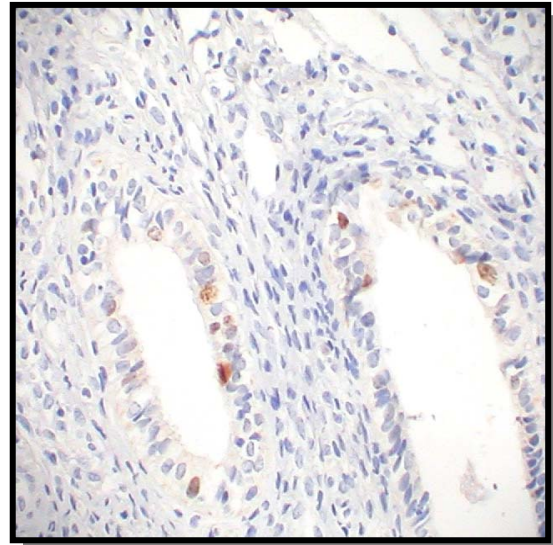
p53 – Grau 3

Figura 3 - Fotomicrografias do pólipio endometrial com tamoxifeno (Grau 1) e de câncer de endométrio (Grau 2 e Grau 3) corado por imunohistoquímica para a proteína p53 (200x de aumento). Contracoloração com Hematoxilina de Gill. A coloração castanha nos núcleos indica a presença da proteína p53.

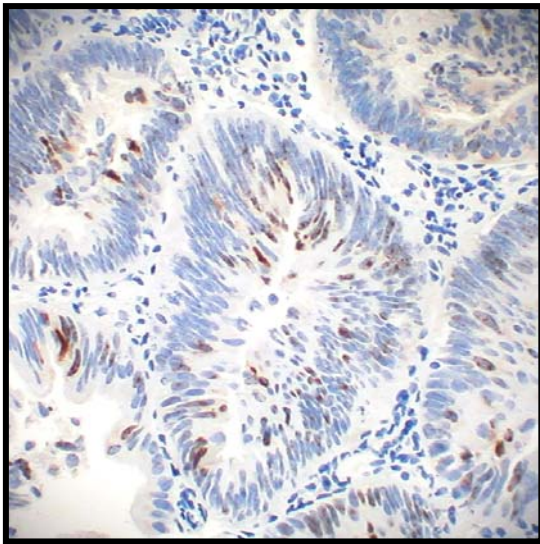
Nota: Grau 1: expressão da proteína p53 em menos de 5% das células. Grau 2: expressão da proteína p53 em 5 a 25% das células. Grau 3: expressão da proteína p53 em 26 a 75% das células.



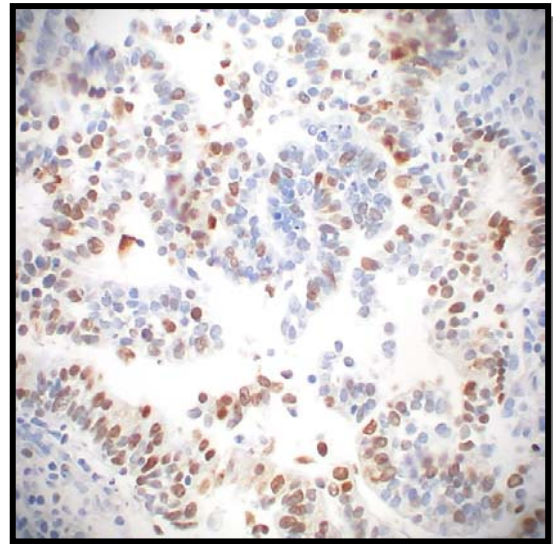
Ki67 – Grau 1



Ki 67 – Grau 2



Ki67 – Grau 3

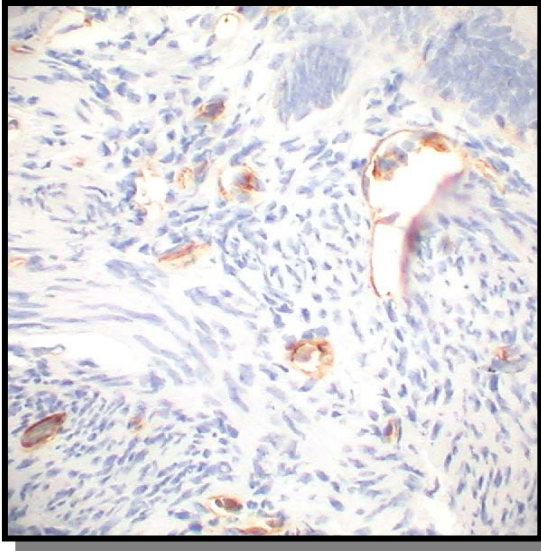


Ki67 – Grau 4

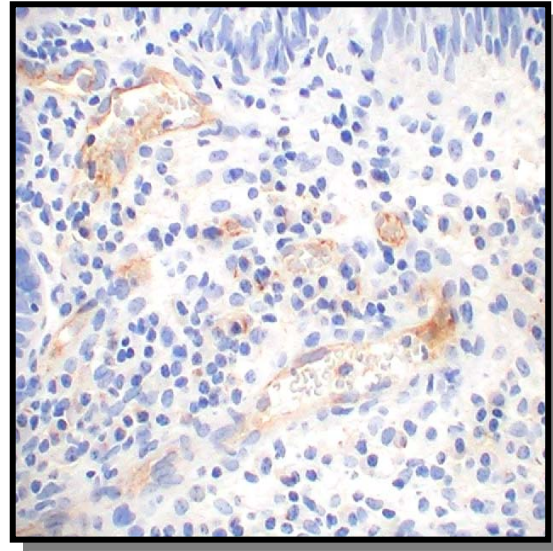
Figura 4 - Fotomicrografias de pólipos endometriais em uso de tamoxifeno (Grau 1 e 2) e de câncer de endométrio (Grau 3 e 4) coradas por imunohistoquímica para a proteína Ki-67 (200x de aumento). Contracoloração com hematoxilina de Gill. A coloração castanha nos núcleos indica a presença da proteína Ki-67.

Nota: Grau 1: expressão da proteína Ki-67 em menos de 5% das células. Grau 2: expressão da proteína Ki-67 em 6 a 25% das células. Grau 3: expressão da proteína Ki-67 em 26 a 75% das células. Grau 4: expressão da proteína Ki-67 em mais de 75% das células.

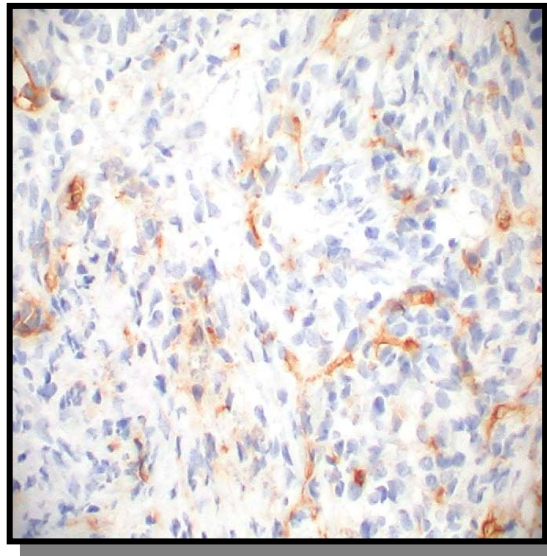
O CD31 foi avaliado acordo com descrito por Weidner (52). Foram feitas, para cada caso, contagem de vasos em 10 campos com aumento de 200x, escolhidos na área de maior concentração vascular. Ao final obtinham-se médias para cada caso. (Figura 5).



CD31 – 15 vasos



CD31 40 vasos



CD31 – 70 vasos

Figura 5 - Fotomicrografias de pólipos endometriais em uso de tamoxifeno corados por imunohistoquímica para a proteína CD31 (200x de aumento). Contracoloração feita com Hematoxilina de Gill. A coloração castanha no citoplasma e membrana das células endoteliais indica a presença da proteína CD31.

Nota: foi considerada a quantidade de vasos marcados com proteína CD31.

3.2.2 - Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com o programa SPSS 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). A amostra de 20 mulheres em cada grupo é suficiente para avaliar uma diferença superior a 40% nas proporções das expressões das proteínas p53 e Ki67; e uma diferença de 1 desvio padrão da média para a proteína CD31, com nível de confiança de 95% e um poder estatístico de 80%.

A diferença entre as médias foi avaliada pelo teste *t* de Student e ANOVA(idade e CD31). O teste do Qui-quadrado foi adotado para comparar as diferentes percentagens (p53 e Ki67). As diferenças com valor de $p < 0,05$ foram consideradas significativas.

4. Resultados

4.1. Características da amostra

A idade das mulheres variou de 55 a 85 anos ($64,6 \pm 1,7$ ano). Como ilustra a Figura 6, não houve diferença significativa entre grupos ($p=0,592$). Nas mulheres com câncer de endométrio apresentavam o seguinte estadiamento, de acordo com a FIGO (anexo III): IB - 16 casos, IC - 2 casos, IIA - 2 casos. Os graus histológicos, no entanto, eram: G1 - 15 casos, G2 - 4 casos, G3 - 1 caso.

4.2. Avaliação das proteínas p53, Ki-67 e CD31 nos pólipos endometriais em mulheres após a menopausa.

A expressão do p53 não foi detectada nos casos de pólipo em uso de tamoxifeno, pólipo sem hormônios e endométrio atrófico. Apesar do p53 ter sido detectado em 25% das amostras de câncer endometrial, com uma expressão superior a 5%, não houve diferença em relação à expressão da proteína p53 nos diferentes grupos ($p=0,067$). Figura 7

A expressão do Ki67 em mais de 5% das células foi evidenciada em 40% dos pólipos cujas mulheres faziam uso de tamoxifeno e em 15% naquelas sem uso de hormônios; sendo 5% nas amostras com diagnóstico de endométrio atrófico; enquanto que nos casos de câncer de endométrio foi de 85%. Esse resultado foi significativo na comparação do grupo pólipo em uso de tamoxifeno com pólipo sem hormônio ($p=0,0047$). A diferença

foi significativa em relação ao grupo com tamoxifeno versus endométrio atrófico ($p=0,008$). A expressão nos casos de câncer de endométrio comparado com os pólipos em uso de tamoxifeno foi significativa ($p=0,004$). Ocorreu uma diferença significativa na expressão da proteína Ki67 entre os grupos ($p<0,001$). Figura 8

A expressão da proteína CD31 foi maior em pólipos de usuárias de tamoxifeno em comparação ao endométrio atrófico ($37,5\pm 3,2$ x $22,2\pm 1,3$; $p<0,001$) e semelhante aos pólipos sem uso de hormônios ($37,5\pm 3,2$ x $33,7\pm 2,0$; $p=0,319$) e os casos de câncer de endométrio ($37,5\pm 3,2$ x $34,4\pm 2,0$; $p=0,418$). Figura 9

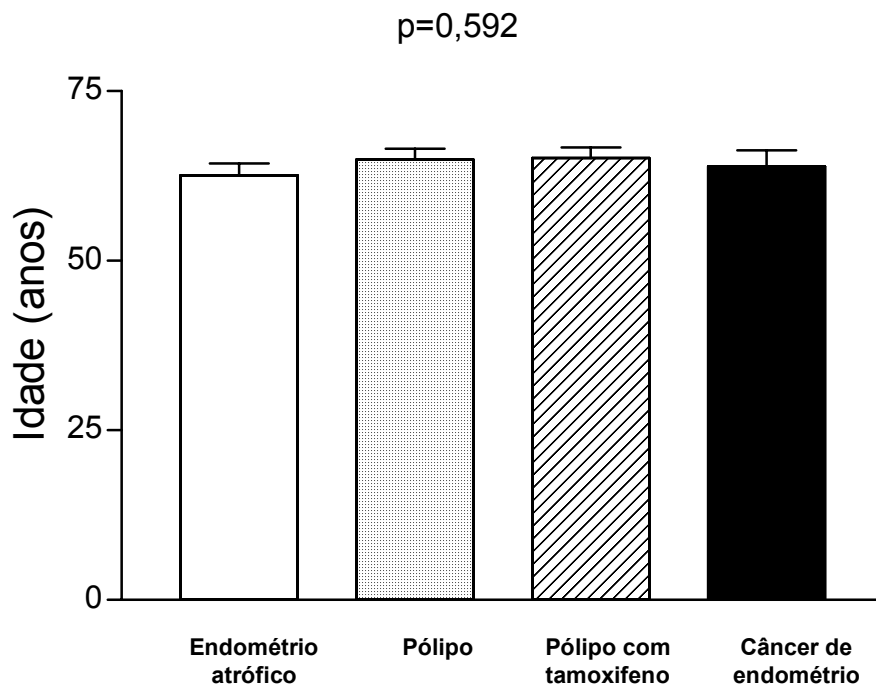


Figura 6 - Idade médias das mulheres com pólipo endometrial com tamoxifeno, pólipo endometrial sem uso de hormônios, endométrio atrófico e câncer de endométrio

Nota: As barras representam a média \pm erro padrão da média. A diferença entre as médias foi feita pelo teste de ANOVA.

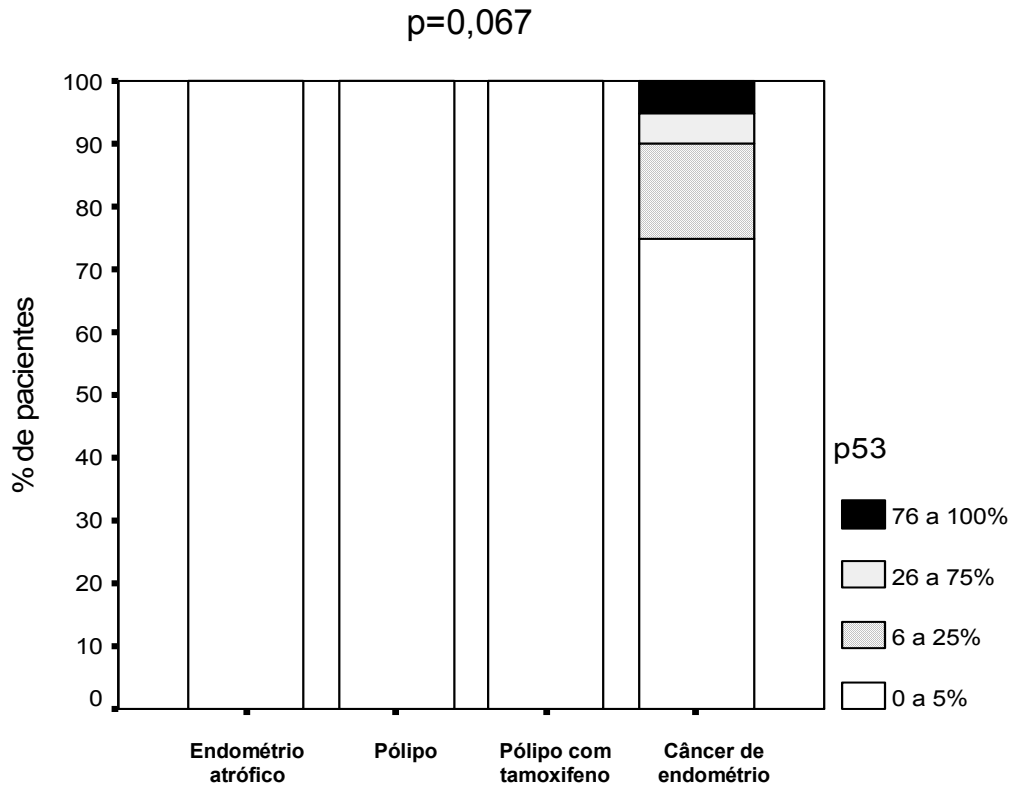


Figura 7 - Expressão das proteínas p53 nos pólipos endometriais com tamoxifeno, pólipo endometrial sem uso de hormônios, endométrio atrófico e câncer de endométrio.

Nota: Grau 1: expressão da proteína em menos de 5 das células; Grau 2: de 5 a 25% das células; Grau 3: de 26 a 75% das células; Grau 4: mais de 75% das células (avaliação de um mínimo de 1000 células epiteliais, apenas a coloração nuclear foi considerada na quantificação da proteína p53).

A diferença entre os grupos foi feita pelo teste do qui-quadrado.

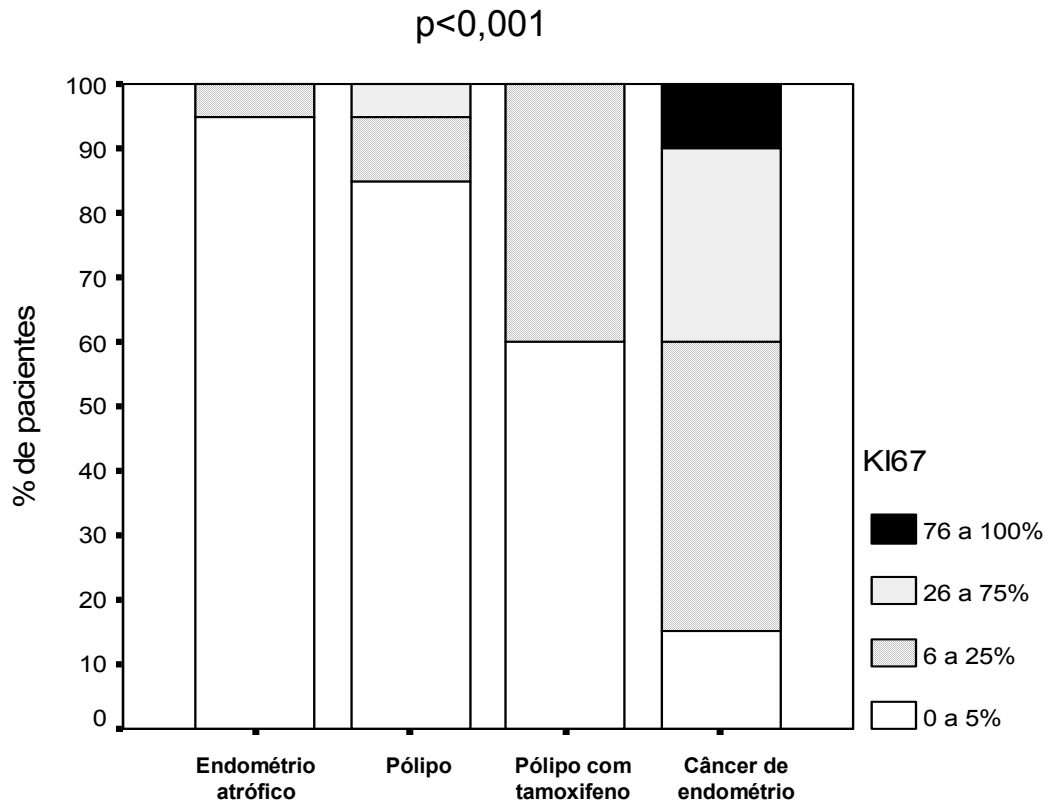


Figura 8 - Expressão das proteínas Ki67 nos pólipos endometriais com tamoxifeno, pólipo endometrial sem uso de hormônios, endométrio atrófico e câncer de endométrio.

Nota: Grau 1: expressão da proteína em menos de 5 das células; Grau 2: de 5 a 25% das células; Grau 3: de 26 a 75% das células; Grau 4: mais de 75% das células (avaliação de um mínimo de 1000 células epiteliais, apenas a coloração nuclear foi considerada na quantificação da proteína Ki67).

Pólipo com tamoxifeno vs endométrio atrófico $p=0,008$

Pólipo com tamoxifeno vs pólipo sem hormônios $p=0,0047$

Pólipo com tamoxifeno vs câncer de endométrio $p=0,004$

A diferença entre os grupos foi feita pelo teste do qui-quadrado

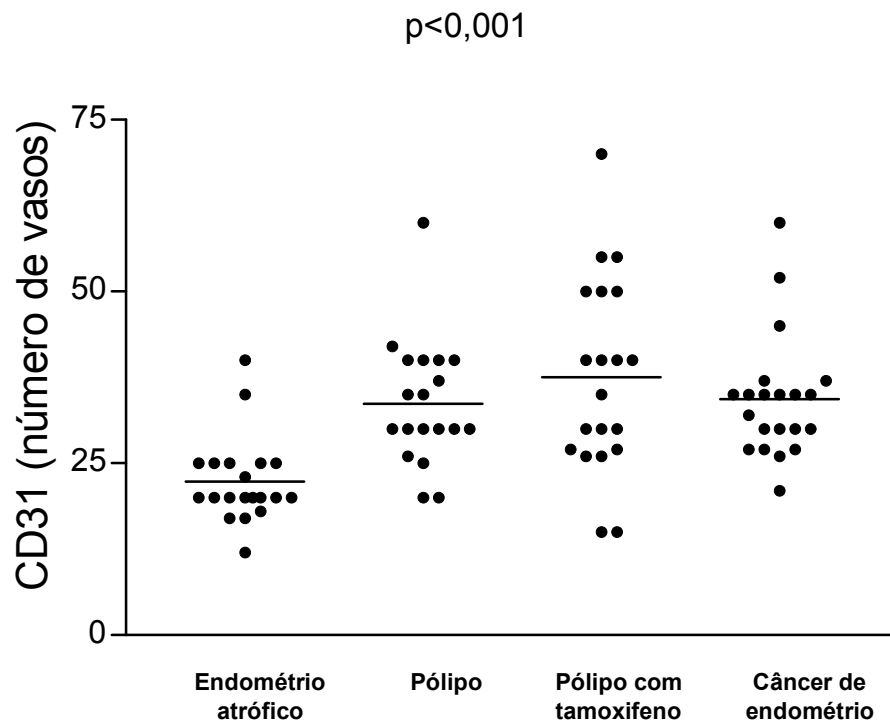


Figura 9 - Expressão das proteínas CD31 nos pólipos endometriais com tamoxifeno, pólipo endometrial sem uso de hormônios, endométrio atrófico e câncer de endométrio.

Nota: Foi realizado, para cada caso, contagem de vasos em 10 campos com aumento de 200x, escolhidos na área de maior concentração vascular. Ao final obtinham-se médias para cada caso. (avaliação de um mínimo de 1000 células epiteliais, a sua expressão no citoplasma e na membrana das células endoteliais foi considerada para a quantificação da proteína CD31).

Pólipo com tamoxifeno vs endométrio atrófico $37,5 \pm 3,2$ x $22,2 \pm 1,3$; $p < 0,001$

Pólipo com tamoxifeno vs pólipo sem hormônios $37,5 \pm 3,2$ x $33,7 \pm 2,0$; $p = 0,319$

Pólipo com tamoxifeno vs câncer de endométrio $37,5 \pm 3,2$ x $34,4 \pm 2,0$; $p = 0,418$

As barras representam as médias.

A diferença entre os 4 grupos foi realizada pelo teste de ANOVA.

5. Discussão

Esse estudo objetivou determinar marcadores envolvidos no processo de carcinogênese do pólipó endometrial em mulheres após a menopausa em uso de tamoxifeno. A identificação de novos marcadores tumorais pode ser valiosa no seguimento das pacientes e na definição daquelas que se beneficiariam de um tratamento primário menos agressivo (53). As três proteínas estudadas (p53, Ki67 e CD31) participam de importantes etapas do processo de carcinogênese, como o gene supressor de tumor, o aumento na proliferação celular e a aquisição de angiogênese.

5.1 - Metodologia

Não há consenso na forma de quantificação pela IHQ das proteínas p53, Ki-67 e CD31. A avaliação pode ser qualitativa, semiquantitativa ou quantitativa; sendo a contagem das células realizada por método visual ou pela análise computadorizada da imagem. Usualmente, é estabelecido um percentual de expressão protéica que divide os tumores em categorias: positivo e negativo (p53), alto ou baixo índice de proliferação (Ki-67), alta ou baixa atividade angiogênica (CD31). No entanto, esse percentual é variável na literatura. Em alguns estudos, buscou-se o ponto de corte em que se obtinha dois grupos com maior diferença estatística em relação ao prognóstico (54,55). Em outros, utilizou-se à média ou mediana das taxas de expressão protéica dos casos estudados (31,32,56-58). Em alguns, a determinação do ponto de corte foi arbitrária (59,60).

Um estudo determinou a percentagem de células positivas e multiplicam pela intensidade da coloração, graduada de 0 a 3, encontrando um índice (61). Os graus utilizados também são variáveis, sendo freqüente os de 0 a 3 (0 <10%, 1 – 11 a 50%, 2- 51 a 80% e 3 - >80%) (62). A contagem de 10 campos com aumento de 25x também é descrita (7,34)

Outro estudo comparou o método de contagem (análise quantitativa) com a estimativa dos núcleos marcados pela IHQ para Ki-67 (análise semiquantitativa) no carcinoma de mama (63). Concluiu-se que a avaliação por estimativa parece ser suficientemente precisa, além de ser mais prática e consumir menos tempo do que a contagem(63). A escolha da área do tumor a ser avaliada representa uma outra limitação do método por contagem(63).

Entre as técnicas existentes para investigação da inativação da proteína p53, a IHQ é a mais freqüentemente utilizada. A IHQ tem suas limitações e a ausência de marcação não significa, necessariamente, a inexistência de alterações na proteína (falso negativo)(64). Inversamente, o acúmulo da proteína não é sinônimo de mutação(64). Os resultados podem variar pelo uso de diferentes anticorpos monoclonais, modos de incubação, variações nos métodos de recuperação antigênica, além da subjetividade da quantificação(65). Assim como a variação na concentração do anticorpo poderá levar a diferentes expressões imunohistoquímica na mesma biopsia.(66)

O índice de proliferação pode ser determinado pelo MIB-1, que detecta o antígeno nuclear Ki-67 e pelo Proliferating cell nuclear antigen (PCNA). O PCNA é uma proteína nuclear não histônica, que atua como um co-

fator da DNA polimerase delta, sua presença no ciclo celular é observada na fase G1 tardia, com um pico na fase S e declínio durante a fase G2 e M(67). Neste estudo foi utilizado o MIB-1, que apresenta uma maior sensibilidade na detecção da proliferação celular que o PCNA, além de uma melhor correlação com os parâmetros histopatológicos(68). Essa metodologia foi validada em outros estudos do nosso grupo (69-71)

O estudo da angiogênese pode ser feito pela IHQ, utilizando marcadores de células endoteliais, como o fator VIII, CD31, CD34 e BNH9(48). O fator VIII é mais sensível como marcador de capilares normais(72). Já o CD31 e o CD34 foram desenvolvidos para identificar o endotélio originado de células neoplásicas em tumores vasculares pouco diferenciados, onde se mostram superiores ao fator VIII(26).

Outros marcadores tem sido utilizados na avaliação da angiogênese endometrial, mas carecem de padronizações seguras; o que limitam a suas utilizações. Dentre eles podemos citar: VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), Ang 1, 2, 3,4 (angiopoetina), Tie2 (tirosina quinase), CD105 (marcador específico de células endoteliais). O VEGF e Tie2 apresenta maior expressão no carcinoma de endométrio do que no endométrio normal; já o Ang 1 e 2 a expressão é maior no endométrio normal. O score angiogênico (CD105/CD34) tende a ser maior no câncer de endométrio do que no endométrio normal.(73)

Outras variáveis na avaliação da angiogênese incluem as diferenças na fixação tecidual, o processamento das peças, as técnicas de

coloração, a experiência do examinador em selecionar os pontos quentes vasculares, além da técnica de contagem (36).

No presente estudo, foi utilizada uma análise semiquantitativa dos marcadores p53 e Ki67 como preconizado por Grace et al. (74). Essa metodologia, apesar de ser mais fácil do ponto de vista técnico, especialmente diante do grande número de amostras avaliadas, dificulta a determinação de um valor de dicotomização para definir os casos com superexpressão protéica. Já na avaliação da angiogênese utilizamos o CD31, e, para a sua quantificação optamos pelo método descrito por Weidner (52) e expresso em número de vasos por campo. Esses marcadores e as metodologias tiveram suas validades comprovadas em outros estudos do nosso grupo (49,69-71).

5.2 - Expressão das proteínas p53, Ki-67 e CD31 nos pólipos endometriais em mulheres após a menopausa.

A formação de pólipos com ou sem a presença de atipias pode ser um estágio intermediário no desenvolvimento do carcinoma endometrial associado ao uso de tamoxifeno. (10). Esse desenvolvimento de atipia, em um pólipo endometrial não hiperplásico, pode representar o passo inicial do processo de carcinogênese. (11).

Um estudo mostrou que a expressão da proteína p53 constitui um marcador da atividade biológica do pólipo endometrial em mulheres após a menopausa. (29). Mas outro já descreve que o número de células com

aumento da expressão de p53 é baixo em pólipos endometriais, hiperplasia e carcinoma endometrióide G1.(75)

No presente estudo não encontramos diferenças significativas na expressão do p53 entre os pólipos provenientes das mulheres em uso de tamoxifeno, os pólipos sem hormônios, atrófico e câncer de endométrio. Essa diferença poderia ser detectada em estadiamento mais avançados do câncer ou um número maior de casos.

O aumento da expressão do Ki67 é indicativo de aumento de atividade mitótica celular e proliferação. Durante a fase proliferativa do ciclo menstrual, a expressão do Ki67 é normalmente elevada (33). A sua expressão apresenta-se maior nos pólipos endometriais de mulheres na pós-menopausa em comparação com aquelas portadoras de endométrio atrófico (34). Essa elevação da expressão do Ki-67 é freqüentemente detectada no endométrio das mulheres na pós-menopausa em uso de tamoxifeno. (35)

Um estudo avaliou a expressão do Ki67 em pólipos endometriais de mulheres na pós-menopausa em uso de tamoxifeno encontrou uma expressão maior em comparação ao grupo sem uso de hormônios. Essa expressão, contudo, foi menor do que a encontrada no grupo de hiperplasia atípica e câncer de endométrio (62). O questionamento sobre esse estudo é se todas as mulheres estavam na menopausa, pois a média de idade foi de $51,7 \pm 2,5$ anos nos casos de pólipos em uso de tamoxifeno (14 mulheres) e de $52,5 \pm 8$ anos nos controles (20 mulheres); e nos casos de hiperplasia simples essa média foi de 44 ± 9 anos (11 mulheres). A precisão dessa informação é importante, pois no menacme o Ki67 apresenta diferentes expressões de

acordo com a fase do ciclo menstrual (33). Outro estudo, entretanto, não encontrou diferença significativa na expressão de Ki67 entre os pólipos oriundos de mulheres na pós-menopausa em uso ou não de tamoxifeno (76). Nesse estudo o número de mulheres também foi diferente entre os grupos: 9 usuárias de tamoxifeno e 16 controles.

No presente estudo a expressão do Ki67 foi significativamente maior nos pólipos em uso de tamoxifeno em comparação com os aqueles oriundos de mulheres sem uso de hormônios; sendo mais expressivas nos casos de câncer de endométrio.

Nas condições neoplásicas do endométrio ocorre maior concentração vascular no carcinoma quando comparada ao endométrio atrófico ou hiperplásico.(45) O carcinoma de endométrio pouco diferenciado apresenta maior número de vasos por campo que o endométrio normal e que o carcinoma bem diferenciado. O número de vasos no carcinoma de endométrio G3 foi significativamente superior ao observado nos endométrios atrófico e proliferativo e nos carcinomas G1. O que mostra que a angiogênese é marcador prognóstico importante no carcinoma de endométrio (77).

Em condições não neoplásicas o endométrio de mulheres usuárias de tamoxifeno apresenta aumento da densidade vascular na pré-menopausa, mas não é observado esse incremento na pós-menopausa (35,47). Essa densidade vascular apresenta-se maior nos pólipos endometriais de mulheres na pós-menopausa em comparação com aquelas portadoras de endométrio atrófico (34).

No presente estudo o número de vasos nos pólipos endometriais em uso de tamoxifeno foi significativamente maior do que nos endométrios atrófico, mas não apresentou diferenças em relação aos casos de pólipos sem uso de hormônios ou de câncer de endométrio. A não diferença em relação ao câncer de endométrio provavelmente deva-se a classificação histológica dessa neoplasia em nosso material: a maioria estágio IB e G1.

5.3 Considerações finais

A identificação das proteínas p53, Ki-67 e CD31 utiliza uma metodologia simples, com a vantagem de poder ser realizada em tecidos parafinados. No entanto, é necessária uma padronização na forma de quantificação desses marcadores. A utilização do endométrio adjacente como controle dos pólipos oriundos da mesma mulher, utilizando-se as técnicas de microarray e proteomic, poderá propiciar o estudo de outras proteínas envolvidas no processo de carcinogênese dos pólipos endometriais em usuárias de tamoxifeno.

A expressão das três proteínas (p53, Ki67 e CD31), no presente estudo, indica uma maior tendência do pólipo em uso de tamoxifeno para o câncer de endométrio do que para o endométrio atrófico.

6. Conclusão

O presente estudo permite concluir que:

A utilização de tamoxifeno parece estar associada a um aumento da proliferação celular nos pólipos endometriais, sem interferir na angiogênese ou inativação de proteínas supressoras de tumor.

7. Referências Bibliográficas

- 1- Ryan AJ; Susil B; Jobling TW; Oehler MK. Endometrial cancer. *Cell Tissue Res* 2005; 322:53-61.
 - 2- Singh MN; Stringfellow HF; Paraskevaidis E; Martin-Hirsch PL; Martin FL. Tamoxifen: important considerations of a multi-functional compound with organ-specific properties. *Cancer Treat Rev* 2007; 33:91-100.
 - 3- Ramondetta LM, Sherwood JB, Dunton CJ, Palazzo JP. Endometrial cancer in polyps associated with tamoxifen use. *Am J Obstet Gynecol* 1999;180:340-3.
 - 4- Ismail SM. Endometrial changes during tamoxifen treatment. *Lancet* 1998; 351: 838.
 - 5- GiordanoG, Gnetti L, Merisio C, Melpignno M. Postmenopausal status, hypertension and obesity and risk factors for malignant transformation in endometrial polyps. *Maturitas* 2007; 56:190-7.
 - 6- ReslovaT, Tosner J, Resl M, Kugler R, Vavrova I. Endometrial polyps: a clinical study of 245 cases. *Arch Gynecol Obstet* 1999; 262:133-9.
 - 7- Maia H. Jr, Barbosa IC, Marques D, Calmon Lc, Ladipo AO, Coutinho EM. Hysteroscopy and transvaginal sonography in menopausal women receiving hormone replacement therapy. *J Am Assoc Gynecol Laparosc* 1996; 4:13-15.
-

- 8- Cohen I, Bembeim J, Azaria K. Malignant endometrial polyps in postmenopausal breast cancer tamoxifeno-treated patients. *Gynecol Oncol* 1999; 75:136-41.
 - 9- Mbatsogo BA, Le Bouedec G, Michy T, Bourdel N, Fouilloux G, Dauplat J (Endometrial cancers arising in polyps associated with tamoxifen use) Dégénérescence maligne de polypes endométriaux sous tamoxifène. *Gynecol Obstet Fétil* 2005; 33:975-9.
 - 10- Martin-Ondarza C, Gil-Moreno A, Torres-Cuesta L, Garcia A, Eyzaguirre F, Diaz-Feijoo B, Xercavins J. Endometrial cancer in polyps: a clinical study of 27 cases. *Eur J Gynaecol Oncol* 2005; 25:55-8.
 - 11- Sington JD and S Manek. Cytological atypia in endometrial polyps and immunostaining for p16, p53 and Ki67. *Histopathology* 2002; 41:86-7.
 - 12- Ribeiro Jr U, Safatle-Ribeiro AV, p53 na prática clínica: sim ou não?. *Arq. Gastroenterol.* 2006; 43:6-7.
 - 13- Jones PA, Laird PW. Cancer epigenetics comes of age. *Nature Genet* 1999; 21, 163-7.
 - 14- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70
 - 15- Stewart BW, Kleihues P, editors. *World cancer report*. Lyon: IARC Press; 2003
-

- 16- Hahn WC, Weinberg RA. Rules for making human tumor cells. *N Engl J Med* 2002; 347:1593-603.
 - 17- Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 1998; 396: 643-9.
 - 18- Clurman B, Groudine M. Tumour-suppressor genes: Killer in search of a motive? *Nature* 1997; 389: 122-3.
 - 19- Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature* 2000; 408: 307-10.
 - 20- Yamaguchi K, Sugano K, Fukayama, et al. Polymerase chain reaction-based approaches for detection of allelic loss in the p53 tumor suppressor gene in colon neoplasms. *Am J Gastroenterol*, 1997. 92, 307-12.
 - 21- Lane DP. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992; 358: 15-6.
 - 22- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. 4a ed. New York: Garland Science; 2002.
 - 23- Gao CY, Zelenka PS. Cyclins, cyclins-dependent kinasis and differentiation. *BioEssays* 1997; 19: 307-15.
 - 24- Nakamura S, Gomyo Y, Roth JA. C-terminus of p53 is required for G(2) arrest. *Oncogene* 2002; 27: 2102-7.
-

- 25- Weinert T. DNA damage and checkpoint pathways: molecular anatomy and interactions with repair. *Cell* 1998; 94: 555-8.
 - 26- Dabbs D.J. *Diagnostic immunohistochemistry*. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2002.
 - 27- Hollstein MC, Sidranski D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991; 253:49-53
 - 28- Elhafey AS, Papadimitriou JC, El-Hakim MS, El-Said AI, Ghannam BB, Silverberg SG. Computerized image analysis of p53 and proliferating cell nuclear antigen expression in benign, hyperplastic, and malignant endometrium. *Arch Pathol Lab Med* 2001; 125:872-9.
 - 29- Albuquerque Neto LC. Análise da imuno-expressão da proteína p53 no pólipio endometrial de mulheres após a menopausa / Expression p53 protein in endometrial polyp in postmenopausal women. São Paulo; s.n; 2004. [68] p.
 - 30- Carvalho HF, Recco-Pimentel SM. *A célula* 2001. São Paulo: Manole; 2001
 - 31- Garzetti GG, Ciavattini A, Lucarini G, Goteri G, De Nictolis M, Biagini G. MIB-1 immunostaining in cervical carcinoma of young patients. *Gynecol Oncol* 1997; 67:184-7.
-

- 32- Ming-Tak HD, Hsu CY, Chiang H. MIB-1 Labeling index as a prognostic indicator for survival in patients with FIGO stage IB squamous cell carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol* 2000; 76: 97-102
- 33- Taylor LJ, Jackson TL, Reid JG, Duffy SR. The differential expression of oestrogen receptors, progesterone receptors, Bcl-2 and Ki67 in endometrial polyps. *BJOG* 2003;110:794-8.
- 34- Inceboz US, Nesse N, Uyar Y, Ozcakil HT, Kurtul O, Baytur YB, Kandiloglu AR, Caglar H, Fraser IS. Hormone receptor expressions and proliferation markers in postmenopausal endometrial polyps. *Gynecol Obstet Invest* 2006; 61:24-8.
- 35- Assikis VJ, Neven P, Jordan VC. A realistic clinical perspective of tamoxifen and endometrial carcinogenesis. *Eur J Cancer* 1996; 32: 1464– 76.
- 36- Abulafia O, Triest W, Sherer DM. Angiogenesis in malignancies of the female genital tract. *Gynecol Oncol* 1999; 72:220-31.
- 37- Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; 407:249-57.
- 38- Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 4-6.
-

- 39- Klagsbrun M, D'Amore PA. Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 1996; 1: 259-70.
- 40- Puisoru M, Fatu C, Fatu IC. Histochemical evaluation of angiogenesis in endometrial adenocarcinoma. *Ann Anat* 2006; 188:255-9.
- 41- Ravazoula P, Zolota V, Hatjicondi O, Sakellaropoulos G, Kourounis G, Maragoudakis ME. Assessment of angiogenesis in human cervical lesions. *Anticancer Res* 1996; 16:3861-4.
- 42- Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis: correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 324:1-8
- 43- Calux NMCT, Ribalta JCL, Stávale JN, Focchi J, Baracat EC, Rodrigues de Lima G. Angiogênese na Neoplasia Escamosa do Colo Uterino: Comparação entre dois Marcadores de Células Endoteliais. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet* 2001; 23: 313-9,
- 44- Saito M, Sato Y, Watanabe J, Kuramoto H, Kaba H, Fukuda T, Angiogenic factors in normal endometrium and endometrial adenocarcinoma. *Pathology International* 2007; 57:140-147.
- 45- Sivridis E. Angiogenesis and endometrial cancer. *Anticancer Res* 2001; 21:4383-8.
-

- 46- Abulafia O, Triest WE, Sherer DM, Hansen CC, Ghezzi F. Angiogenesis in endometrial hyperplasia and stage I endometrial carcinoma. *Obstet Gynecol* 1995; 86:479-85
- 47- Hague A, Manek S, Oehler MK, MacKenzie IZ, Bicknell R, Rees MCP. Tamoxifen induction of Angiogenic factor expression in endometrium. *British Journal of Cancer* 2002; 86:761-7.
- 48- Sauer G, Deissler H. Angiogenesis: prognostic and therapeutic implications in gynecologic and breast malignancies. *Curr Op Obstet Gynecol* 2003; 15: 45-9.
- 49- Silva-Filho AL; Traiman P ; Triginelli SA ; Reis FM ; Pedrosa MS; Miranda D ; Abreu ES ; Macarenco R ; CunhaMelo JR. Association between CD31 expression and histopathological features in stage IB squamous cell carcinoma of the cervix. *International journal of gynecological cancer* 2006;16:757-62.
- 50- Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 1981; 29: 577-80.
- 51- Gown AM, Wever N, Battifora H. Microwave-based antigenic unmasking: a revolutionary new technique for routine immunohistochemistry. *App Immunohistochem* 1993; 1: 256-66.
-

- 52- Weidner N. Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer. *American Journal of Pathology* 1995; 147:9-19.
- 53- Geisler JP, Geisler HE. Tumor markers and molecular biological markers in gynecologic malignancies. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2001; 13: 31-9.
- 54- Haerslev T, Jacobsen GK, Zedeler K. Correlation of growth fraction by Ki-67 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunohistochemistry with histopathological parameters and prognosis in primary breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat* 1996; 37: 101-13.
- 55- Dettmar P, Harbeck N, Thomssen C, Pache L, Ziffer P, Fizi K. Prognostic impact of proliferation-associated factors MIB1 (Ki-67) and S-phase in node-negative breast cancer. *Br J Cancer* 1997; 75:1525-33.
- 56- Dellas A, Moch H, Schultheiss E, Feichter G, Almendral AC, Gudat F, Torhorst J. Angiogenesis in Cervical Neoplasia: microvessel quantitation in precancerous lesions and invasive carcinomas with clinicopathological correlations. *Gynecol Oncol* 1997; 67: 27–33.
- 57- Tjalma W, Van Marck E, Weyler J, Dirix L, Van Daele A, Goovaerts G. Quantification and prognostic relevance of angiogenic parameters in invasive cervical cancer. *Br J Cancer* 1998; 78:170-4.
-

- 58- Suzuki M, Tsukagoshi S, Saga Y, Ohwada M, Sato I. Assessment of proliferation index with MIB-1 as a prognostic factor in radiation therapy for cervical cancer. *Gynecol Oncol* 2000; 79: 300-4.
- 59- Obermair A, Tempfer C, Wasicky R, Kaider A, Hefler L, Kainz C. Prognostic significance of tumor angiogenesis in endometrial cancer. *Obstet Gynecol* 1999; 93: 367-71.
- 60- Koyamatsu Y, Yokoyama M, Nakao Y, Fukuda K, Saito T, Matsukuma K, et al. A comparative analysis of human papillomavirus types 16 and 18 and expression of p53 gene and Ki-67 in cervical, vaginal, and vulvar carcinomas. *Gynecol Oncol* 2003; 90: 547-51.
- 61- McGurgan P, Taylor LJ, Duffy SR, O'Donovan PJ. An immunohistochemical comparison of endometrial polyps from postmenopausal women exposed and not exposed to HRT. *Maturitas* 2006; 53:454-61.
- 62- Altaner S, Gucer F, Tokatli F, Guresci S, Ozdemir C Puyan FO, Kutluk. Expression of Bcl-2 and Ki67 in tamoxifeno-associated endometrial polyps: comparison with postmenopausal polyps. *Onkologie* 2006; 29:376-80.
- 63- Mello ES, Alves VAF. Determinação da fração de proliferação celular no carcinoma de mama pela marcação imunoistoquímica do antígeno nuclear Ki-67: comparação dos métodos quantitativo e semi-quantitativo. *J Bras Patol* 1999; 35: 200-5.
-

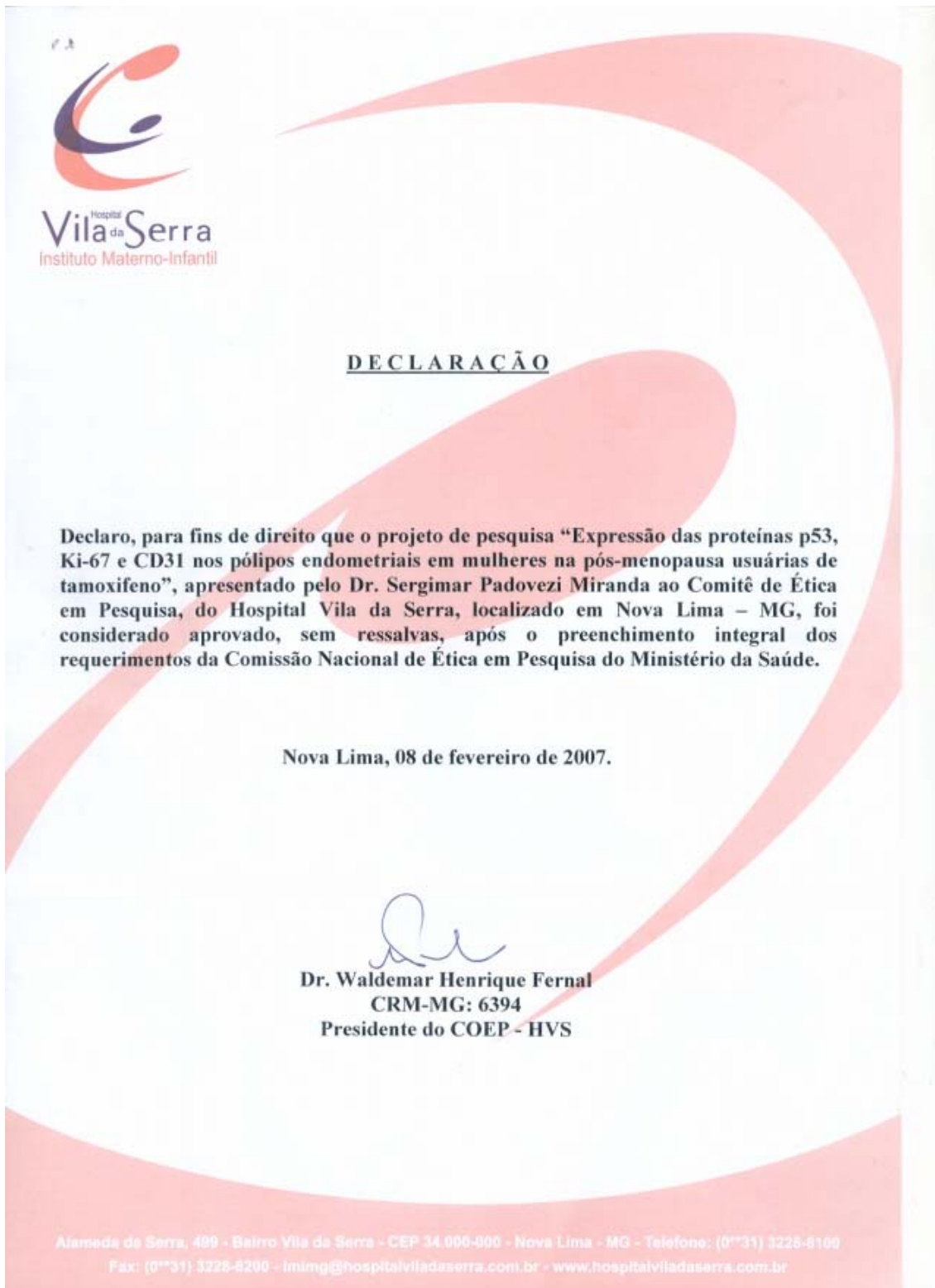
- 64- Wynford-Thomas D. p53 in tumour pathology: can we trust immunohistochemistry? *J Pathol* 1992; 166:329-30.
- 65- Hall PA, Lane DP. p53 in tumour pathology: can we trust immunohistochemistry ? *J Pathol* 1994; 172:1-4.
- 66- McCluggage WG, Connolly LE, McGregor G, Hyland PL, Hall PA. A strategy for defining biologically relevant levels of p53 protein expression in clinical samples with reference to endometrial neoplasia. *Int J Gynecol Pathol* 2005; 24:307-12.
- 67- Hofstädter F, Knüchel R, Rüschoff J. Cell proliferation assessment in oncology. *Virchows Archiv* 1995; 427:323-41.
- 68- Lindboe CF, Torp SH. Comparison of Ki-67 equivalent antibodies. *J Clin Pathol* 2002; 55:467-7.
- 69- Silva-Filho AL ; Bruno BN; Silva LB ; Traiman P; Silva JGC; Triginelli SA. Associação entre expressão das proteínas p53 e Ki-67 e achados clínico-patológicos em pacientes com carcinoma invasor do colo uterino. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia* 2005; 27:243-7.
- 70- Silva-Filho AL; Traiman P; Triginelli SA; Reis FM; Pedrosa MS; Miranda D; Abreu ES ; Macarenco R; Cunha Melo JR . Expression of p53, Ki-67 and CD31 in the vaginal margins of radical hysterectomy in patients with stage IB carcinoma of the cervix.. *Gynecologic Oncology* 2004; 95:646-54.
-

- 71- Silva-Filho AL; Traiman P; Triginelli SA; Reis FM; Pedrosa MS; Miranda D; Abreu ES ; Macarenco R; Cunha Melo JR . Expression of p53, Ki-67 and CD31 in the vaginal margins of radical hysterectomy in patients with stage IB carcinoma of the cervix.. *Gynecologic Oncology* 2004;95:646-54.
- 72- Appleton MA, Attanoos RL, Jasani B. Thrombomodulin B as a marker of vascular and lymphatic tumours. *Histopathology* 1996; 29:153-7.
- 73- Saito M, Sato Y, Watanabe J, Kuramoto H, Kaba S, Fukuda T, Angiogenic factors in normal endometrium and endometrial adenocarcinoma. *Pathology International* 2007; 57:140-7.
- 74- Grace VMB, Shalini JV, Sree lekha TT, Devaraj SN, Devaraj H. Co-overexpression of p53 and bcl-2 proteins in HPV-induced squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 2003; 91:51-8.
- 75- Maia H, Maltez A, Fahel P, Coutinho EM. Hysteroscopic and immunohistochemical findings in type I and type II endometrial carcinomas. *J Am Assoc Gynecol Laparosc* 2001; 8:222-30.
- 76- 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 not exposed to tamoxifeno. *Maturitas* 2006; 54:252-9.
-

- 77- Speck NMG; Focchi J; Alves ACA; Osório CAB; Chada Baracat EC.,
Relação entre angiogênese e estágio no carcinoma do endométrio Rev.
Bras. Ginecol. Obstet. 2003; 25:396-401.
-

8. *Anexas*

I. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Vila da Serra – (COEP)



II. Consentimento Livre e Esclarecido

Expressão das proteínas p53, Ki-67 e CD31 nos pólipos endometriais em mulheres na pós-menopausa usuárias de tamoxifeno.

Identificação da Pacientes

Nome: Registro

Idade:

Endereço:

Telefone: Carteira de Identidade

Você, ou responsável legal tem o direito de saber todos dos detalhes desse estudo. Quando você entender todos esse detalhes, assim como também todos os possíveis riscos, perigos e benefícios envolvidos, você poderá decidir se irá ou não participar dessa pesquisa. Este consentimento livre e esclarecido não foi feito para lhe assustar ou alarmar, ele é só uma tentativa de ajudá-la a entender o estudo para que você possa ou não dar seu consentimento para participar dessa pesquisa. Este consentimento livre e esclarecido não substitui nenhum outro consentimento livre e esclarecido que você possa ter assinado

Descrição da Pesquisa

Histórico

Você realizou um exame de ultra-som onde foi detectada a presença de um pólipo endometrial. O pólipo endometrial é um tecido que cresceu no interior do seu útero e por ter um risco, ainda que pequeno, de não ser benigno o seu ginecologista orientou-a para que fosse realizado a sua retirada através da histeroscopia. O material, biopsia do pólipo endometrial, retirado do interior de seu útero, será encaminhado para exame no Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital Vila da Serra. Nesse Laboratório todas as biopsias são examinadas e estabelecidas o diagnóstico definitivo de benignidade.

Algumas vezes realizamos estudos mais detalhados nesses materiais de biopsia do pólipo endometriais, para avaliar a presença de substâncias chamadas de proteínas. Dentre essas proteínas existem três que são importantes para avaliar as transformações não benignas dos pólipos: 1- A chamada p53, cuja função é controlar o ciclo das células, 2-A proteína Ki-67,

utilizada como marcador de crescimento das células, 3- A CD31, que permite a avaliação da formação de novos vasos sanguíneos nos pólipos endometriais.

Objetivo do Estudo

Este é um estudo de pesquisa para mostrar a presença das proteínas p53, Ki-67 e CD31 nas biopsias dos pólipos endometriais em mulheres na pós-menopausa usuárias ou não do medicamento chamado tamoxifeno.

Tratamento

Você não receberá nenhum tratamento, apenas serão utilizados os materiais de biopsia dos pólipos endometriais que estarão no Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital Vila da Serra.

Desconfortos, Efeitos Colaterais e Riscos.

O estudo não acarretará nenhum desconforto, efeito colateral ou risco para você, pois serão utilizados o material de biopsia que estará no Laboratório de Anatomia Patológica.

Possíveis Benefícios

O possível benefício como resultado da participação neste estudo é contribuir para o entendimento do processo de transformação não benigna dos pólipos endometriais. As novas informações podem beneficiar você e outras mulheres portadoras de pólipos endometriais

Procedimentos Alternativos

Esse estudo é voluntário, ou seja, só depende de sua vontade para participar deste estudo.

Se você não concordar que seja realizado o estudo das três proteínas, no seu material de biopsia do pólipo endometrial, isso não lhe acarretará nenhum prejuízo, pois o estudo da biopsia, que é realizado de rotina no Laboratório de Anatomia Patológica é suficiente para determinar a benignidade do pólipo. Essa material biopsia ficará guardada no Laboratório sem data determinada, independente de realizar o estudo das proteínas (imunohistoquímica).

Termo de responsabilidade

1- Eu tive a oportunidade de tirar todas as minha dúvidas sobre o estudo imunohistoquímica do meu material de biopsia do pólipó endometrial

Foram-me devidamente explicados a intervenção, os riscos (complicações) e as possibilidades alternativas de um modo claro (fácil entendimento para uma pessoa leiga, ou seja, não médica ou profissional de saúde).

Eu fui informado que não receberei pagamento por participar desse estudo

Recebi todas as informações que desejava conhecer e a possibilidade de fazer perguntas e questionar dúvidas

Também entendi que, a qualquer momento e sem necessidade de dar nenhuma explicação poderei revogar o consentimento que agora presto.

Assim, declaro agora que estou satisfeita com a informação recebida e que compreendo o alcance e riscos do tratamento.

Reservo-me expressamente o direito de revogar a qualquer momento meu consentimento antes que o procedimento objeto deste documento se realize

Por tal razão e nestas condições consinto em participar dessa pesquisa e que a peça cirúrgica seja encaminhada para estudo conforme proposto

Telefone de contato: 31-32288222

De pleno acordo

Cidade:

Data

Assinatura do médico

Assinatura da paciente

Testemunha

Testemunha

Finalizado nesta data.

Cidade

Data

Assinatura do médico

Assinatura da Paciente

Testemunha

Testemunha

III. Estadiamento do carcinoma de endométrio (FIGO)

- I Tumor confinado ao corpo uterino
 - IA Tumor limitado ao endométrio
 - IB Invasão até a metade da espessura do miométrio
 - IC Invasão de mais da metade da espessura do miométrio
 - II Tumor invade o colo, mas sem extensão além do útero.
 - IIA Invasão superficial do endocérvix (apenas glandular)
 - IIB Invasão do estroma cervical
 - III Envolvimento regional ou local – IIIA, B e C
 - IIIA Invasão e envolvimento da serosa ou de anexos (extensão direta ou metástases) e/ou células neoplásicas em ascite ou lavado peritoneal
 - IIIB Envolvimento vaginal (extensão direta ou metástase)
 - IIIC Metástase para gânglios pélvicos ou para-aórticos
 - IVA Invasão das mucosas de bexiga ou retosigmóide (confirmação histológica com biopsia)
 - IVB Metástases à distância (exclusão de vagina, peritônio pélvico ou anexos; inclui metástases para gânglios intra-abdominais, mas não os para-aórticos e inguinais).
-

IV – Tabela de distribuição das pacientes

pacientes	idade	Grupo	Ki67	p53	CD31	Coluna D
1	70	1	1	1	15	1-polipo tamoxifeno
2	70	2	1	1	30	2-pólipo sem hormônios
3	70	3	1	1	25	3-endométrio normal
4	71	4	3	1	35	4- câncer de endométrio
5	76	1	2	1	50	
6	74	2	1	1	30	Coluna E
7	73	3	1	1	17	1 - 0 a 5%
8	64	4	3	1	35	2 - 6 a 25%
9	61	1	1	1	40	3 - 26 a 75%
10	58	2	1	1	40	4 - 76 a 100%
11	61	3	1	1	20	
12	61	4	3	1	30	
13	56	1	1	1	27	Coluna F
14	58	2	1	1	30	1 - 0 a 5%
15	55	3	1	1	25	2 - 6 a 25%
16	56	4	1	1	30	3 - 26 a 75%
17	65	1	1	1	30	4 - 76 a 100%
18	64	2	1	1	35	
19	68	3	1	1	12	Coluna G
20	66	4	4	2	27	números de vasos
21	61	1	1	1	40	
22	60	2	3	1	40	
23	62	3	1	1	17	
24	60	4	3	1	35	
25	61	1	2	1	50	
26	60	2	1	1	30	
27	61	3	1	1	18	
28	61	4	1	2	27	
29	69	1	2	1	55	
30	68	2	1	1	30	
31	72	3	1	1	20	
32	70	4	2	3	35	
33	56	1	2	1	55	
34	57	2	1	1	60	
35	55	3	1	1	25	
36	56	4	4	2	45	
37	61	1	1	1	30	
38	62	2	1	1	30	
39	58	3	1	1	20	
40	68	4	3	1	27	
41	60	1	1	1	40	
42	60	2	2	1	42	
43	57	3	1	1	20	
44	59	4	2	4	37	

pacientes	idade	Grupo	Ki67	p53	CD31	Coluna D
45	63	1	1	1	15	
46	63	2	1	1	35	
47	57	3	1	1	40	
48	64	4	3	1	35	
49	58	1	2	1	35	1-polipo tamoxifeno
50	58	2	1	1	25	2-pólipo sem hormônios
51	55	3	1	1	20	3-endométrio normal
52	60	4	2	1	26	4- câncer de endométrio
53	70	1	1	1	26	
54	72	2	1	1	20	Coluna E
55	63	3	1	1	25	1 - 0 a 5%
56	72	4	2	1	30	2 - 6 a 25%
57	67	1	1	1	27	3 - 26 a 75%
58	68	2	1	1	26	4 - 76 a 100%
59	63	3	1	1	20	
60	65	4	2	1	35	
61	72	1	1	1	40	Coluna F
62	71	2	1	1	20	1 - 0 a 5%
63	62	3	1	1	20	2 - 6 a 25%
64	80	4	2	1	60	3 - 26 a 75%
65	63	1	2	1	50	4 - 76 a 100%
66	61	2	1	1	40	
67	57	3	1	1	25	Coluna G
68	60	4	1	1	37	números de vasos
69	58	1	2	1	70	
70	56	2	1	1	37	
71	55	3	1	1	20	
72	59	4	2	1	52	
73	74	1	2	1	30	
74	75	2	1	1	40	
75	63	3	2	1	23	
76	78	4	2	1	21	
77	82	1	1	1	26	
78	83	2	2	1	35	
79	85	3	1	1	32	
80	82	4	2	1	30	

9. Summary

Introduction: The carcinogenesis process implies the acquisition of mutant alleles of tumor-suppressor genes, increase in cell proliferation and need of angiogenesis. This study analyzes the expression of proteins p53, Ki-67 and CD31 in the endometrial polyps from post-menopausal women using tamoxifen.

Methods: Samples of endometrial polyps from women using tamoxifen (n=20), polyps without hormone use (n=20), atrophic endometrium (n=20) and endometrium cancer (n=20) were studied. The material was fixed in formalin, included in paraffin and processed for immunohistochemical staining for p53, Ki-67 and CD31 proteins. Comparison among the groups was done using the Chi-square, *t* test of Student and ANOVA. The differences with value $p < 0,05$ were considered significant. **Results:** Women's age ranged from 55 to 85 years old ($64,6 \pm 1,7$ years). There was no difference about the expression of p53 protein in the different groups ($p = 0,067$). One expression of Ki-67 in more than 5% of cells was showed up in 40% of polyps whose women were using tamoxifen and in 15% from without hormone use ($p = 0,0047$). The expression of CD31 protein was higher in polyps from tamoxifen users in comparison to atrophic endometrium ($37,5 \pm 3,2$ x $22,2 \pm 1,3$; $p < 0,001$) and similar to polyps without hormone use ($37,5 \pm 3,2$ x $33,7 \pm 2,0$; $p = 0,319$). **Conclusion:** The use of tamoxifen seems to be associated to increase of cell proliferation in endometrial polyps, without interfering in angiogenesis or neutralizing the tumor-suppressor protein.
