

GUSTAVO FILIPOV PERES

**INVESTIGAÇÃO DA EVOLUÇÃO DOS PÓLIPOS
ENDOMETRIAIS EM CÂNCER DE ENDOMÉTRIO**

“Investigation of the Development of Endometrial Polyps in Endometrial Cancer”

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do
título de **MESTRE** em Ginecologia, Obstetrícia e
Mastologia.

Orientador: ROGÉRIO DIAS (Prof. Adjunto III/Livre Docente)

Coorientador: DANIEL SPADOTO DIAS (Prof. Assistente Doutor)

BOTUCATU 2015

UNESP

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRE 8/5651

Peres, Gustavo Filipov.

Investigação da evolução dos pólipos endometriais em
câncer de endométrio / Gustavo Filipov Peres. - Botucatu,
2015

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de
Botucatu

Orientador: Rogério Dias

Coorientador: Daniel Spadoto Dias

Capes: 40101150

1. Endométrio- Câncer. 2. Pólipos - Epidemiologia. 3.
Pólipos - Imuno-histoquímica. 4. Patologia.

Palavras-chave: Endométrio/Patologia; Imunoistoquímica;
Neoplasias do endométrio; Pólipos/Epidemiologia.

Esta pesquisa contou com o apoio financeiro:

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP

Bolsa pesquisa, processo **número 2012/17297-3**.

Dados Curriculares

DADOS CURRICULARES

Gustavo Filipov Peres

Nascimento: 08 de setembro de 1983, Santa Cruz do Rio Pardo, São Paulo.

Nacionalidade: Brasileiro.

Filiação: Cleide Filipov e José Antonio Torres Peres.

Formação:

1991 - 1998 Ensino Fundamental - Escola Modelo de Ensino de Primeiro e Segundo Grau "José Cesário Pimentel", OAPEC, Santa Cruz do Rio Pardo – SP.

1999 - 2001 Ensino Médio - Escola Modelo de Ensino de Primeiro e Segundo Grau "José Cesário Pimentel", OAPEC, Santa Cruz do Rio Pardo – SP.

2003 - 2008 Graduação em Medicina - Pontifícia Universidade Católica de Campinas/SP – PUC Campinas.

2009 - 2011 Residência Médica em Ginecologia e Obstetrícia – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu/SP – UNESP.

Títulos:

2013 Especialista em Ginecologia e Obstetrícia, FEBRASGO – Federação Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetrícia (TEGO nº 089/2013).

Atuação Profissional:

2012 - Atual Médico Assistente do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu/SP – UNESP.



Dedicatória

A **Deus**, por me ter dado saúde e força para superar as dificuldades.

A minha mulher **Geila de Moraes Pereira** por toda ajuda, paciência e companheirismo. Meu grande amor, que acrescenta razão aos meus dias.

A minha mãe **Cleide Filipov**, que com muito amor me criou e sempre ajudou a atingir meus objetivos.

A meu pai **José Antonio Torres Peres**, grande inspirador e incentivador na minha carreira.



Homenagem

Ao Prof. Adjunto III/ Livre Docente Rogério Dias, orientador deste mestrado, da medicina e da vida. Quero expressar meu reconhecimento e admiração pela competência profissional e minha gratidão pela sua amizade.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Daniel Spadoto Dias, peça fundamental na elaboração deste trabalho, sem o qual certamente nada disso seria possível. Muito obrigado!

A Flávia Neves Bueloni Dias, que também contribuiu imensamente na elaboração deste mestrado, muito obrigado por toda dedicação!

Agradecimento Especial

Às **pacientes**, peças primordiais deste projeto. Que nossos esforços sempre estejam voltados ao seu bem estar.

À **Prof. Dra. Maria Aparecida Custódio Domingues** pela sua paciência, inteligência e delicadeza nos ensinamentos. Sempre disposta em compartilhar seus conhecimentos. Muito obrigado!

À **Prof. Dra. Lígia Maria Suppo de Souza**, sem a qual eu não teria conseguido ingressar no programa de pós-graduação, expresso aqui minha imensa gratidão.

À **Dra. Ângela Favorito Santarém Tonon**, pela grande contribuição na construção deste trabalho. Obrigado!

Ao **Dr. Nilton José Leite**, que sempre acrescentou muito na minha vida profissional e pessoal, obrigado por esses anos de convívio.

Agradecimientos

Ao **Prof. Titular Carlos Roberto Padovani**, pela agilidade e excelência nas análises estatísticas.

Aos funcionários do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, em especial os funcionários da imunoistoquímica **Marcos Roberto Franchi, Luiz Fernando Franchi, Celene Maria Carvalho Gandin e Cristina de Fátima Audi**, por toda atenção e prestatividade desde a aquisição dos reagentes à confecção das lâminas e **Carlos César Ramos** pela digitalização do material, não tenho palavras para descrever a imensa gratidão pela colaboração.

Aos funcionários da Pós-graduação, pelo suporte e atenção prestados.

Aos colegas, professores e funcionários do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Botucatu, pelo incentivo e auxílio.

Ao amigo **Leonardo Vieira Elias**, pelo companheirismo na luta diária e imensa contribuição neste trabalho.

Às funcionárias da biblioteca, pela elaboração da ficha catalográfica.

À **Adnice Ruiz Pedro e Abílio Manoel Batista Pinto**, pelo excelente trabalho na impressão deste trabalho.

“Àqueles que involuntariamente omitimos e que nos auxiliaram de alguma forma – a certeza de que este fato não diminui a nossa gratidão.”



Sumário

SUMÁRIO

ABSTRACT / RESUMO	16
1. INTRODUÇÃO	20
2. OBJETIVOS	32
3. PACIENTES E MÉTODOS	34
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
5. PUBLICAÇÃO (“PAPER”)	45
6. ANEXOS	80



Abstract

ABSTRACT

Objective: To evaluate the immunohistochemical expression of estrogen receptors (RE), progesterone receptors (RP), cell proliferation (Ki-67), neoangiogenesis (endoglin - CD105), cell adhesion (claudin 3 and 4) and extracellular matrix proteins (metalloproteinases 2 and 9 - MMP 2 and MMP 9) in endometrial polyps and endometrial cancer compared to normal endometrium.

Design: Comparative cross-sectional study with occasional sample. The survey was conducted from the database of the Clinical Pathology Laboratory of Botucatu Medical School - Unesp.

Setting: Clinics Hospital from Botucatu Medical School, São Paulo State University – UNESP.

Patients: Were performed immunohistochemical studies of 30 samples of endometrial polyps without atypia and 30 samples of endometrioid adenocarcinoma of endometrium confronted with the results of 30 normal endometrial samples (control group).

Interventions: Epidemiological, clinical and anthropometric data were collected through analysis of medical records. To analyze the cases of endometrial adenocarcinoma and controls we used the tissue microarray technique (TMA). Paraffin blocks, with the larger fragment of polypoid lesions and recipient blocks of TMA were used to evaluate immunohistochemical expression of ER, PR, CD105, Ki-67, claudin 3 and 4, MMP-2 and MMP-9.

Main Results: We identified a significant difference between groups in ER ($P < 0.001$) and PR expression ($P < 0.05$), Ki-67 ($P < 0.001$), CD105 ($P < 0.001$) and claudin 3 ($P < 0.001$). No difference was found between polyps and endometrial cancer ($P \geq 0,05$). The expression of MMP-2 and MMP-9 was virtually absent in all three groups.

Conclusions: In the studied samples according to the immunohistochemical parameters evaluated no differentiation between polyps and endometrial cancer was observed. There was no expression of MMP-2 and -9 in endometrial tissues analyzed. Further studies are necessary to better understand the molecular mechanisms in endometrial carcinogenesis.

Keywords: Endometrium/pathology; Immunohistochemistry; Endometrial neoplasms; Polyps/epidemiology.



Resumo

RESUMO

Objetivo: Avaliar a expressão imunoistoquímica de receptores de estrogênio (RE) e progesterona (RP), de proteínas relacionadas à proliferação celular (Ki-67), à neoangiogênese (endoglin - CD105), à adesão celular (claudinas 3 e 4) e proteínas da matriz extracelular (metaloproteinases 2 e 9 - MMP 2 e MMP 9) nos pólipos endometriais e no câncer de endométrio comparativamente ao endométrio normal.

Tipo de Estudo: Estudo transversal comparativo com amostra de conveniência. O levantamento foi realizado através de banco de dados do Laboratório de Patologia Clínica da Faculdade de Medicina de Botucatu.

Local: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP.

Pacientes: Foram realizados estudos imunoistoquímicos de 30 amostras de pólipos endometriais sem atipias e de 30 amostras de adenocarcinoma endometrial do tipo endometriode e confrontados com os resultados da análise de 30 amostras de endométrio normal (grupo controle).

Intervenções: Dados epidemiológicos, clínicos e antropométricos foram levantados através de análise dos prontuários. Para análise dos casos de adenocarcinoma de endométrio e dos controles foi empregada a técnica de *tissue microarray* (TMA). Os blocos de parafina, com os cortes do maior fragmento de lesão polipoide e os blocos receptores de TMA foram utilizados para avaliação imunoistoquímica de RE, RP, CD105, Ki-67, claudinas 3 e 4, MMP-2 e MMP-9.

Resultados Principais: Identificou-se diferença significativa entre os grupos na expressão de RE ($P < 0,001$) e RP ($P < 0,05$), do Ki-67 ($P < 0,001$), do CD105 ($P < 0,001$) e da claudina 3 ($P < 0,001$). Não foram identificadas diferenças nos marcadores pesquisados entre pólipos e câncer de endométrio ($P \geq 0,05$). A expressão de MMP-2 e MMP-9 foi praticamente ausente nos três grupos.

Conclusões: Nas amostras pesquisadas, não foram demonstradas diferenciações entre os pólipos e a neoplasia endometrial nos parâmetros imunoistoquímicos avaliados. Não se observou expressão das MMP-2 e -9 nos tecidos endometriais analisados. Novos estudos são necessários para melhor compreensão dos mecanismos biomoleculares da carcinogênese endometrial.

Palavras-chave: Endométrio/patologia; Imunoistoquímica; Neoplasias do endométrio; Pólipos/epidemiologia.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

O endométrio consiste em tecido que sofre diversas alterações ao longo do ciclo menstrual e pode desenvolver várias doenças, desde benignas como leiomiomas e pólipos, até as hiperplasias e o câncer de endométrio.

Pólipos endometriais são definidos como neoformações resultantes da hiperplasia focal da camada basal do endométrio, constituída por células estromais, glandulares e vasos sanguíneos em proporções variadas. Podem ser sésseis ou pediculados, múltiplos ou solitários, sendo classificados como fibrosos ou mucosos, podendo apresentar a forma de pólipos hiperplásicos, atróficos, funcionais, mistos (endometriais e endocervicais) ou adenomiomatosos (1,2).

A etiopatogenia é ainda enigmática, não havendo consenso sobre sua história natural e seu real significado como entidade patológica. Acredita-se que um ambiente hiperestrogênico seja responsável pela proliferação tanto focal quanto difusa do endométrio, podendo ainda, a depender da suscetibilidade da mulher, fatores de risco e tempo de exposição, determinar alterações hiperplásicas e neoplásicas (2,3). Estudos demonstram que quando realizada avaliação imunoistoquímica dos pólipos em comparação com endométrio normal, houve maior expressão dos receptores hormonais no epitélio glandular dos pólipos em relação ao endométrio, independentemente de tratar-se de pacientes no menacme ou pós-menopausa (4).

Entretanto, sua incidência tende a aumentar durante o climatério, época em que a mulher apresenta diminuição na produção dos esteroides sexuais devido à falência ovariana própria da idade. Assim, fatores genéticos também parecem contribuir com o desenvolvimento dos pólipos, como anormalidades nos cromossomos 6 e 12 já reportadas, o que pode alterar o processo de proliferação celular, resultando no

crescimento endometrial excessivo e a formação de pólipos (5,6,7,8,9).

Devido ao seu caráter aparentemente benigno, muitas lesões são sub-reportadas, tornando difícil se determinar a real incidência dos pólipos endometriais. Estima-se que sua prevalência seja bastante elevada, em torno de 25% a 30% da população, sendo maior entre mulheres que se encontram na faixa etária dos 40 aos 60 anos e duas vezes maior entre mulheres na pós-menopausa comparativamente ao período de menacme (10). Há descrito na literatura que, ao longo de 1 ano, pólipos assintomáticos podem apresentar regressão espontânea em até 27% dos casos, dependendo de suas características (11).

Clinicamente, podem ser assintomáticos em até 80% dos casos, sendo comum seu diagnóstico incidental por exames rotineiros de ultrassonografia pélvica transvaginal, observados como espessamentos difusos ou focais da camada endometrial. Quando apresentam sintomatologia, mais comumente é observado sangramento uterino anormal associado ou não à dismenorreia (10,11). Em recente levantamento de nosso serviço, observou-se que mulheres com sangramento uterino associado aos pólipos apresentaram, predominantemente, metrorragia em 47,4% dos casos, seguida pela menorragia em 23,7% dos casos (12).

A depender de sua localização, tamanho e quantidade, as lesões polipoides podem associar-se a infertilidade. Eles são diagnosticados em aproximadamente 16,5% a 26,5% das mulheres com infertilidade sem causa aparente e menos significativamente, em torno de 0,6% a 5%, nas mulheres que apresentam perdas gestacionais recorrentes (13).

Desde os primeiros estudos, tal como o de Armênia em 1967, os pólipos endometriais são relacionados a risco para o desenvolvimento de neoplasia endometrial. (14). A incidência de câncer de endométrio associado aos pólipos gira em torno de

3,5%, variando segundo a maioria dos estudos de 0% a 4,8%, sendo observado com maior frequência nas pacientes pós-menopausa que apresentaram sangramento vaginal (15,16).

Um dos fatores possivelmente associado ao risco de atipia nos pólipos endometriais parece estar relacionado ao seu tamanho. Pólipos grandes, que ocupam mais que 1/3 da cavidade endometrial parecem ser mais suscetíveis a sangramentos e à degeneração maligna (17,18).

Outros fatores de risco para o desenvolvimento de pólipos endometriais, bem como para sua degeneração maligna, são considerados os já conhecidos fatores associados ao câncer de endométrio, tais como idade avançada, nuliparidade, menarca precoce, menopausa tardia, obesidade, hipertensão, diabetes, uso de terapia hormonal. Mais recentemente tem-se demonstrado que a idade materna mais avançada na última gestação confere fator protetor para o desenvolvimento das neoplasias endometriais (15,16,19).

A obesidade androide, devido à excessiva produção de estrona no tecido adiposo, além da redução da globulina transportadora dos hormônios sexuais (SHBG), aumentando a fração livre e ativa dos estrogênios com conseqüente hiperestrogenismo pode, desta forma, justificar a maior incidência de pólipo e câncer de endométrio nesse grupo de mulheres (20,21).

Segundo a literatura, mulheres hipertensas apresentam 2,2 vezes maior chance para o desenvolvimento de pólipos endometriais e mulheres com antecedente de neoplasia mamária apresentam um risco 14,4 vezes maior pelo uso do tamoxifeno, embora não tenha sido identificado maior risco de malignização neste grupo (2,16,22).

Contudo, tem-se demonstrado que embora hipertensão, diabetes e obesidade sejam variáveis, significativamente, associadas aos pólipos endometriais, suas

influências perdem significância quando são realizados estudos de regressão logística multivariada para ajuste da idade (15,16,18).

O adenocarcinoma de endométrio é a forma mais comum de lesão maligna; enquanto a hiperplasia endometrial em seus vários graus é considerada lesão precursora da neoplasia (23).

Este é o sexto tipo de câncer mais frequente entre as mulheres, com aproximadamente 290 mil casos novos ao ano no mundo. No Brasil, sua incidência gira em torno de 4 casos a cada 100 mil mulheres. O pico de incidência ocorre entre 55 e 65 anos de idade, sendo mais prevalente na etnia caucasiana (24).

O adenocarcinoma do tipo endometriode acomete mulheres com idade menos avançada e é do tipo estrogênio-dependente, se originando de um endométrio, previamente, hiperplásico. Ele é chamado de tipo I e apresenta melhor prognóstico quando comparado ao seroso papilífero, também chamado de tipo II (21,25).

Além da ultrassonografia pélvica transvaginal, o diagnóstico das doenças endometriais pode também ser feito por histerossonografia, que traz subsídios importantes por permitir a individualização e melhor caracterização de espessamentos focais em contraste ao meio líquido após infusão de solução salina na cavidade endometrial (26,27,28,29).

O auxílio do estudo Doppler tem sido bastante empregado na caracterização de pedículos vasculares, em alguns casos podendo indicar possíveis processos de neovascularização (30,31).

A histerossalpingografia também pode ser útil como método de rastreamento quando realizada durante a investigação dos casos de infertilidade. Apresenta, contudo, baixa especificidade, em torno de 34,9%, com taxa de acurácia de 73,2%, revelando-se com falhas de enchimento intracavitário, sugerindo a presença de lesões endometriais

(32).

Com o advento da histeroscopia, iniciado por Pantaleoni em 1869 na Inglaterra, criou-se a possibilidade de visualização direta da cavidade uterina, tendo se firmado esta modalidade de exame como *padrão ouro* para o diagnóstico de lesões intrauterinas por propiciar a identificação e caracterização mais precisa das afecções (33). Combinada à biópsia de endométrio, o exame histeroscópico pôde substituir métodos mais invasivos e menos eficazes para o diagnóstico, como a dilatação e curetagem uterina.

A biópsia endometrial normalmente é realizada de duas formas: *orientada* quando após a visualização de lesões intrauterinas retira-se o histeroscópio e posiciona-se a pinça de biópsia, normalmente a cureta de Novak ou Pipelle de Cornier®, em direção à parede uterina identificada como alterada, embora seja, frequentemente, realizada às cegas, sem a realização prévia da histeroscopia (34,35). Por sua vez, a biópsia *dirigida*, isto é, sob visualização histeroscópica direta, só é possível graças ao sistema desenvolvido por Bettocchi, o qual permite o acoplamento de pequenas pinças e tesouras de 5 ou 7 French de diâmetro, propiciando a coleta do material durante o exame de histeroscopia ambulatorial (36,37).

Um levantamento de nosso serviço mostrou que a biópsia orientada foi capaz de diagnosticar com sucesso apenas 15% das lesões benignas, 20% das lesões atípicas e foi incapaz de diagnosticar lesões malignas, quando estiveram restritas aos pólipos (12). Este método é altamente eficaz no diagnóstico de lesões difusas do endométrio, com sensibilidade de quase 100% nos casos de adenocarcinoma (12,35).

Recentemente, estudos imunoistoquímicos são propostos para determinar a presença de proteínas relacionadas à proliferação celular (Ki-67, CD105) e à apoptose (Bcl-2, p53) (38,39).

O endométrio humano normal caracteriza-se por variações hormônio-dependentes ao longo do ciclo menstrual. Este sistema é desregulado na hiperplasia endometrial e nos carcinomas, onde uma série de mudanças inicia e promove a progressão a um fenótipo maligno. Tais mudanças envolvem diferentes etapas, como a ativação de oncogenes, inativação de genes supressores de tumor, disfunção de reguladores do ciclo celular ou outras proteínas envolvidas em invasão e progressão tumoral (25).

Análise da expressão dos receptores estrogênicos e progestagênicos mostra uma tentativa de elucidar a natureza hormonal dos pólipos endometriais. Demonstrou-se uma concentração maior de receptores estrogênicos e de progesterona no epitélio glandular de pólipos endometriais quando comparados ao tecido endometrial normal, corroborando com a hipótese de um hiperestímulo hormonal no desenvolvimento destas afecções (4,40).

A expressão proteica por imunistoquímica de diferentes biomarcadores, tais como receptores hormonais de estrógeno (RE) e progesterona (RP); proteínas relacionadas à proliferação, como o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e o antígeno relacionado à proliferação celular (Ki-67); oncogenes como o receptor do fator de crescimento epidermal (HER2); genes supressores de tumor como o retinoblastoma 1 (Rb) e a proteína tumoral p53 (TP53); proteínas reguladoras do ciclo celular como a ciclina D1 (CCND1), a ciclina E1 (CCNE1), proteínas anti-apoptóticas como o célula-B CLL/Linfoma 2 (bcl-2) e moléculas de adesão como as claudinas têm mostrado contribuição dessas moléculas para a carcinogênese endometrial (41,42,43).

Os esteroides hormonais, principalmente o estrogênio tem um papel importante na patogênese do carcinoma de endométrio. É consagrado que a exposição ao estrogênio sem a oposição da progesterona aumenta o risco de hiperplasia endometrial e

câncer. O estrogênio é um hormônio esteroide lipofílico que atravessa livremente a membrana da célula e se une ao receptor de estrogênio (RE) que está em seu núcleo, controlando a expressão de vários genes, incluindo aqueles que codificam receptores de progesterona (RP) e fatores de crescimento. Os receptores de estrogênio existem em 2 isoformas: *alfa* e *beta*. O RE *alfa* apresenta 595 aminoácidos e é codificado por gene localizado no cromossomo 6 e o RE *beta* tem 530 aminoácidos e seu gene está no cromossomo 14. Além das diferenças estruturais e de afinidade, os RE *alfa* e *beta* apresentam concentrações variáveis em diferentes tecidos. O RE *alfa* é expresso, predominantemente, no aparelho reprodutivo (ovários, mamas e útero), sistema nervoso central e fígado; enquanto, que o RE *beta* é expresso em tecidos como ossos, endotélio, pulmões, SNC, próstata, ovários e tecido urogenital (44). Os receptores de estrogênio e progesterona estão, geralmente, diminuídos em câncer de endométrio comparado com a hiperplasia endometrial e, a perda dos receptores é uma parte da carcinogênese do endométrio.

A proteína Ki-67, um marcador celular associado à proliferação celular, codificada a partir do gene KI67 localizado no cromossomo 10q25, é detectada durante toda fase ativa do ciclo celular, mas é ausente nas células em repouso. Assim, as células a expressam nas fases G1, S, G2 e M; mas, não durante G0 (38). Desde a sua descoberta em 1980 por Gerdes, tem sido objeto de interesse como um marcador de proliferação celular em câncer, particularmente linfomas, mama, endócrino e os do sistema nervoso central. Trata-se de um excelente marcador para determinar a fração de crescimento de determinados grupos celulares (45).

As Claudinas são uma família constituída de 27 proteínas e contêm os mais importantes componentes das junções estreitas das células epiteliais, onde estabelecem a barreira paracelular que controla o fluxo de moléculas no espaço intercelular. Tais

junções estão envolvidas na manutenção da polaridade celular, regulação da proliferação e diferenciação, entre outras, por ter a capacidade de selecionar proteínas sinalizadoras (46). São moléculas pequenas (20 – 27 Kilodaltons), formadas por 4 domínios transmembrana, com o N- terminal e o C – terminal no citoplasma (47,48).

Elas estão presentes numa variedade de tecidos normais, condições hiperplásicas, neoplásicas benignas e cânceres de diferenciação epitelial (47,49,50).

O grau elevado de organização tipicamente encontrado em tecido normal diferenciado é muitas vezes perdido no tecido neoplásico (51). A aquisição do fenótipo neoplásico pelas células epiteliais envolve a ruptura da adesão intercelular, que são mantidas pelas junções aderentes e pelas junções estreitas.

Acredita-se que a perda da integridade epitelial seja devido a alterações nos níveis das claudinas e no conseqüente rompimento de comunicação paracelular, contribuindo para o aparecimento de espaços que propiciam a mobilidade celular e no aumento de suprimento nutricional para as células neoplásicas (52).

Claudinas 3 e 4 têm sido relatadas em altos níveis em múltiplos cânceres, tais como ovário, mama, próstata e pâncreas. Estudos preliminares indicam que ambas são altamente expressas em carcinomas serosos pilíferos e de células claras do útero, formas agressivas de câncer endometrial com alta recorrência e pobre prognóstico.

Pan et al (53) na tentativa de esclarecer o papel das claudinas na carcinogênese endometrial, verificaram que a expressão da claudina 3 e da claudina 4 foi, significativamente, maior nos grupos de hiperplasia atípica (HA) e de adenocarcinoma endometriode (AE). Estes resultados demonstram que essas claudinas são fortemente expressas na HA e no AE; mas, com menos frequência no endométrio normal (49). As claudinas 3 e 4 estão mais presentes no carcinoma de endométrio. A presença desses marcadores em lesões malignas e pré-malignas seria um modo de se complementar o

diagnóstico e determinar o prognóstico das neoplasias (52).

A endoglina (CD 105) é uma glicoproteína transmembrana de 180 Kilodaltons expressa, predominantemente, nas células endoteliais ativadas dos vasos de diferentes tumores e nas lesões inflamatórias (45). Encontra-se em baixos níveis no tecido celular endotelial em G0; mas, a sua expressão é, consideravelmente, aumentada no tecido endotelial vascular ativo, assim como na angiogênese tumoral. Nos vasos sanguíneos, está envolvida no controle da formação de tubos capilares, apresentando um papel pró-angiogênico (54). Esta endoglina é correceptor do fator de transformação do crescimento beta (TGF- β), que atua em processos celulares fundamentais como proliferação, diferenciação, migração, apoptose, adesão, remodelação da matriz extracelular e plasticidade fenotípica (54,55). A expressão aumentada da endoglina no tecido endotelial sugere que sua detecção possa ser útil como marcador da densidade microvascular dos tumores.

Por outro lado, as metaloproteinases de matriz (MMPs) têm sido associadas ao comportamento agressivo de neoplasias, mas o seu papel no câncer endometrial ainda não foi, conclusivamente, estabelecido. As MMPs são uma família de endopeptidases dependentes de zinco. MMP-2, uma colagenase tipo IV ou gelatinase A de 72 Kilodaltons e MMP-9, colagenase tipo IV ou gelatinase B de 92 Kilodaltons têm a capacidade de degradar diversas macromoléculas de matriz, incluindo o colágeno tipo IV da membrana basal (41).

A literatura tem demonstrado o papel da expressão de MMP-2 e MMP-9 como fatores de prognóstico no carcinoma de endométrio (56). Honkavuori et al (41) sugerem que a MMP 2 está ligada com a natureza biologicamente agressiva deste tipo de câncer. Deste modo, parece que a MMP 2 tem algum valor prognóstico no carcinoma do endométrio (57).

Bogusiewicz et al (58) relatam que os resultados do estudo por eles realizados sugerem que a MMP 9 pode desempenhar um papel importante na propagação de câncer de endométrio (24).

A invasão de células malignas ainda não é, totalmente, compreendida; mas, o papel das metaloproteinases e dos componentes celulares do sistema imunológico parece ser crucial. Está provado que o tecido do câncer endometrial tem maior expressão de MMP 2 de MMP 9 correlacionando-se com o estágio e o grau do tumor (59).

Atuais estudos genéticos moleculares têm mostrado que a ativação de oncogenes e a inativação de genes supressores de tumores estão envolvidas no desenvolvimento de uma grande variedade de neoplasias humanas (25). A expressão imunoistoquímica de diferentes biomarcadores tais como receptores hormonais de estrogênio (RE), de progesterona (RP), índice de proliferação celular (Ki-67), endogлина (CD105), moléculas de adesão (claudinas), as metaloproteases (MMPs) têm mostrado contribuição dessas moléculas para a carcinogênese endometrial (52).

Seria possível ocorrer a evolução dos pólipos sem atipias e com atipias para câncer de endométrio? Uma vez que se encontrou maior presença de claudina 3 e claudina 4 nos tecidos com hiperplasia atípica e no carcinoma endometriode; sendo que vários autores vêm, também, enfatizando a sua potencial utilidade como biomarcadores no diagnóstico e no prognóstico de cânceres (47,48,49,51,53).

Como os pólipos têm um crescimento hiperplásico, talvez ele possa, possivelmente, mostrar uma evolução para lesão maligna, vindo caracterizar um câncer de endométrio. Eis a dúvida!

Em verdade, parece que a expressão das metaloproteinases (MMPs) está associada à agressividade do tumor ginecológico, cujos resultados suportam o

envolvimento de MMPs no crescimento do tumor do endométrio e sua progressão (59,60).

Não há, até o presente momento, nenhum consenso sobre protocolo a ser estabelecido para determinar a conduta frente ao diagnóstico de pólipos endometriais, particularmente, em mulheres assintomáticas após a menopausa. Preconiza-se o tratamento individualizado, levando-se em consideração a sintomatologia, a idade da paciente, tempo de menopausa, antecedentes de neoplasia ginecológica e o desejo da própria paciente.

Em virtude do diagnóstico frequente e da baixa taxa de malignização, muitos autores sugerem que os pólipos deveriam ser retirados somente nos casos de sintomas presentes; isto é, aqueles que causam sangramento vaginal ou infertilidade; enquanto, outra parcela de pesquisadores sugere a remoção sistemática de todos os pólipos endometriais (12,18). Uma vez que os pólipos têm se tornado a principal indicação de histeroscopia cirúrgica, inexistem informações suficientes para estabelecer o melhor manejo desta condição, assim como marcadores de malignidade e indicadores para sua remoção.

Procura-se, desta forma, definir com maior precisão, critérios para o manejo clínico e cirúrgico dos pólipos endometriais, evitando riscos, custos e procedimentos desnecessários, como outrora realizados com os miomas uterinos e os cistos anexiais.



Objetivos

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Avaliar os parâmetros imunoistoquímicos dos pólipos endometriais com resultados da análise de expressão dos receptores de estrogênio (RE) e de progesterona (RP), índice de proliferação celular (Ki-67), endoglina (CD105), das claudina 3 e 4, das metaloproteinase 2 e 9, comparativamente aos casos de adenocarcinoma de endométrio e do endométrio normal.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os aspectos epidemiológicos e clínicos das pacientes com diagnóstico de pólipos endometriais e adenocarcinoma atendidas pelo Setor de Endoscopia Ginecológica e Planejamento Familiar e pelo Setor de Oncologia Ginecológica do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, analisando: a idade, paridade, índice de massa corpórea (IMC), tabagismo, doenças associadas (Hipertensão arterial, Diabetes *mellitus*, câncer de mama), tempo de menopausa e uso de terapia hormonal, comparativamente aos dados da literatura.
- Avaliar um possível marcador imunoistoquímico que sugira potencial de malignidade nos pólipos endometriais;
- Avaliar possíveis critérios para indicação de remoção cirúrgica dos pólipos endometriais.

Pacientes e Métodos

3. PACIENTES E MÉTODOS

Trata-se de estudo transversal clínico comparativo, com amostra de conveniência. Foram selecionadas 30 pacientes com diagnóstico anatomopatológico de pólipos endometriais atendidas no Setor de Endoscopia Ginecológica e Planejamento Familiar do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB-UNESP); bem como, respectivas amostras parafinadas provenientes do Departamento de Patologia da FMB-UNESP, diagnosticadas no período de 2010 a 2011. Foram, também, selecionadas 30 pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma de endométrio do tipo endometrióide tratadas e seguidas no Setor de Oncologia Ginecológica do Hospital das Clínicas da FMB-UNESP e utilizadas suas amostras parafinadas provenientes do Departamento de Patologia da FMB-UNESP, cujos diagnósticos foram realizados no período de 2003 a 2010. Tais amostras foram revisadas por um ginecopatologista (SPBA) para confirmação diagnóstica e classificadas conforme a classificação para Adenocarcinoma de Endométrio da OMS, 2003. Selecionou-se 30 pacientes (grupo controle), com idades muito próximas ao grupo do estudo, com diagnóstico anatomopatológico de prolapso e/ou leiomioma uterino, provenientes do referido hospital, bem como amostras parafinadas do Departamento de Patologia da FMB-UNESP. Dados epidemiológicos e clínicos foram levantados pela análise dos prontuários.

Constituíram-se, assim, três grupos a serem avaliados: **Grupo I** = pacientes submetidas à polipectomia histeroscópica com diagnóstico de pólipo; **Grupo II** = pacientes submetidas à cirurgia por câncer de endométrio; **Grupo III** = pacientes controle com endométrio normal, para a verificação dos padrões dos marcadores estudados.

Os casos de adenocarcinoma de endométrio e os casos controles foram submetidos à técnica de tissue microarray (TMA), com elaboração da plataforma contendo amostras representativas (*cores*), segundo descrito por Nagai et al (2007). Foram identificadas áreas de interesse a partir das lâminas coradas com Hematoxilina-Eosina, sendo nos casos de adenocarcinoma demarcada região representativa da neoplasia e nos casos controles, foram selecionadas áreas de tecido endometrial sem lesões. Após, foram obtidas amostras circulares (1,0 mm de diâmetro) das áreas escolhidas dos blocos correspondentes, sendo cada amostra obtida disposta em bloco receptor usando o aparelho *Tissue Microarrayer* (Beecher Instruments®, Silver Spring, USA), com espaçamento de 0,2 mm entre os *cores*. Um mapa foi elaborado, contendo a posição exata de cada caso. Tecnicamente, não é possível submeter os pólipos a esses cortes por apresentarem, frequentemente, fragmentos pequenos. Portanto, foram elaboradas lâminas convencionais nesses casos.

Para análise imunohistoquímica, os tecidos fixados em formalina incluídos em parafina foram cortados com 3 micra (μm) de espessura e montados em lâminas de vidro previamente preparadas com o adesivo poli-D-lisina (Sigma Chemical Corporation, P-7886, Saint Louis, MO, EUA) para evitar o deslocamento dos cortes durante a imunocoloração.

Os cortes foram desparafinizados em estufa a cerca de 65° C por, aproximadamente, uma hora. Posteriormente, os cortes foram tratados com tampão (Target Retrieval Solution) por 20 minutos de forma automatizada (Aparelho PT Link).

Em seguida, os cortes foram incubados com anticorpos primários de forma automatizada (Autostainer Link 48), sendo eles: receptor de estrogênio (FLEX Monoclonal Mo a Hu Estrogen Receptor a, Clone 1D5, RTU, diluição 1:100, Dako); receptor de progesterona (FLEX Monoclonal Mouse, X-Hu Progest Recept, Clone PgR

636, diluição 1:200, Dako); Ki-67 (FLEX Monoclonal Mo a Hu Ki-67 Antigen, Clone MIB-1, RTU, solução pronta para uso, Dako); CD105 (Anticorpo monoclonal de Camundongo Anti-Humano CD105, Endoglina, Clone SN6h, solução pronto para uso, Dako); MMP-2 (Anti-MMP2, anticorpo monoclonal de camundongo clone CA-4001 / CA719E3C, diluição 1:50, Abcam); MMP-9 (Anti-MMP9, anticorpo monoclonal de camundongo clone 15W2, diluição 1:100, Abcam); claudina 3 (Anti-claudina-3, anticorpo policlonal de coelho, diluição 1:100, Dako) e claudina 4 (Anti-claudina-4, anticorpo monoclonal de rato clone 3E2C1, diluição 1:50, Dako) por período de 20 a 30 minutos, dependendo do anticorpo. Neste mesmo aparelho, foram incubados com anticorpos secundários (EnVision FLEX) por 20 minutos. Os cortes foram então revelados com substrato cromógeno 3,3-diaminobenzidina por 10 minutos e contracorados com hematoxilina de Harris por 5 minutos.

A positividade para RE e RP foi analisada de maneira semiquantitativa, segundo protocolos de pesquisa descritos em estudos prévios (3). Com a objetiva de 40x e percorrendo toda a extensão dos cortes, a expressão dos receptores hormonais foi classificada como negativa (coloração dos núcleos das células ausente ou muito fraca, expressa em menos de 10% dos núcleos), ou positiva classificada com o 1+ (até 25% de núcleos corados), 2+ (26-50%), 3+ (51-75%) e 4+ (76-100%). Esses valores foram baseados tanto na quantidade de núcleos corados quanto na intensidade, considerando apenas o epitélio glandular e descartada a positividade das células estromais.

O índice de proliferação celular, de acordo com a imunomarcagem nuclear do Ki-67, traduziu a porcentagem de núcleos corados em 100 células/core nos casos de TMA e porcentagem de núcleos corados por campo que apresentasse maior concentração de células coradas com esse marcador nas lâminas convencionais.

Para a análise das claudinas 3 e 4 seguiu-se um score, que observou: padrão de

coloração da membrana (0 = negativo, 1 = padrão focal, 2 = padrão difuso, 3 = padrão difuso em membrana e citoplasma); porcentagem de células coradas (0 = 0 a 5%, 1 = 6 a 30%, 2 = 31 a 50%, 3 = 51 a 80%, 4 = 81 a 100%); intensidade de marcação (0 = negativa, 1 = discreta, 2 = moderada, 3 = intensa) (53).

Foram identificadas áreas de maior concentração de microvasos, destacados pela coloração do marcador endotelial (CD105), sendo o número de microvasos quantificado em cada área selecionada. Todas as células com característica endotelial corada pelo marcador foram contadas como microvaso, sendo a não visualização do lúmen vascular um requisito necessário (61).

A *análise estatística* foi constituída por análise descritiva e numérica das variáveis estabelecidas. Estudos estatísticos paramétricos e não-paramétricos foram realizados conforme a natureza das variáveis. Foram adotados níveis de significância com $p < 0,05$ e intervalo de confiança de 95%.

O presente projeto foi *aprovado* pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, em 15 de maio de 2013,

Parecer nº 272637.

Referências Bibliográficas

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dias R, Pacheco JF, Pontes AG, Leite NJ F AL. Pólipos Endometriais: Uma revisão. *Femina*. 1998;26(7): 579–81.
2. Miranda SMN, Gomes MT, Silva IDCG da, Girão MJBC. Pólipos endometriais: aspectos clínicos, epidemiológicos e pesquisa de polimorfismos. *Rev Bras Ginecol e Obs* [Internet]. Federação Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetrícia; 2010 Jul [cited 2014 Dec 15];32(7):327–33.
3. Taylor LJ, Jackson TL, Reid JG, Duffy SRG. The differential expression of oestrogen receptors, progesterone receptors, Bcl-2 and Ki67 in endometrial polyps. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol*. 2003;110:794–8.
4. Lopes RGC, Baracat EC, de Albuquerque Neto LC, Ramos JFD, Yatabe S, Depesr DB, et al. Analysis of estrogen- and progesterone-receptor expression in endometrial polyps. *J Minim Invasive Gynecol*. 2007;14:300–3.
5. Speleman F, Cin PD, Van Roy N, Van Marck E, Buytaert P, Van den Berghe H et al. Is t(6;20)(p21;q13) a characteristic chromosome change in endometrial polyps. *Genes Chromosom Cancer*. 1991;3(4): 318–9.
6. Vanni R, Marras S, Andria M, Faa G. Endometrial polyps with predominant stromal component are characterized by a t(6;14)(p21;q24) translocation. *Cancer Res*. 1995;55:31–3.
7. Dal Cin P, Vanni R, Marras S, Moerman P, Kools P, Andria M, et al. Four cytogenetic subgroups can be identified in endometrial polyps. *Cancer Res*. 1995;55:1565–8.
8. Guida M, Sanguedolce F, Bufo P, Di Spiezio Sardo A, Bifulco G, Nappi C et al. Aberrant DNA hypermethylation of hMLH-1 and CDKN2A/p16 genes in benign, premalignant and malignant endometrial lesions. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2009;30(3): 267–70.
9. Di Domenico M, Santoro A, Ricciardi C, Iaccarino M, Iaccarino S, Freda M et al. Epigenetic fingerprint in endometrial carcinogenesis: the hypothesis of a uterine field cancerization. *Cancer Biol Ther*. 2011;12(5): 447–57.
10. Dreisler E, Stampe Sorensen S, Ibsen PH, Lose G. Prevalence of endometrial polyps and abnormal uterine bleeding in a Danish population aged 20-74 years. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2009;33:102–8.
11. Salim S, Won H, Nesbitt-Hawes E, Campbell N, Abbott J. Diagnosis and Management of Endometrial Polyps: A Critical Review of the Literature. *Journal of Minimally Invasive Gynecology*. 2011. p. 569–81.
12. Abrão F, Dias R, Dias DS, Leite NJ, Modotte WP LR. Analytical Study of Endometrial Polyps – The Importance of Polypectomy. 38th Glob Congr Minim Invasive Gynecol –

- Annu Meet AAGL Adv Minim Invasive Gynecol Worldwide Novemb 2009 Orlando, Florida Suppl to J Minim Invasive Gynecol. 2009;16: S61.
13. Taylor E, Gomel V. The uterus and fertility. *Fertility and Sterility*. 2008. p. 1–16.
 14. CS. A. Sequential relationship between endometrial polyps and carcinoma of the endometrium. *Obs Gynecol*. 1967;30940: 524–9.
 15. Nappi L, Indraccolo U, Sardo ADS, Gentile G, Palombino K, Castaldi MA, et al. Are Diabetes, Hypertension, and Obesity Independent Risk Factors for Endometrial Polyps? *J Minim Invasive Gynecol*. 2009;16:157–62.
 16. Antunes A, Costa-Paiva L, Arthuso M, Costa J V, Pinto-Neto AM. Endometrial polyps in pre- and postmenopausal women: factors associated with malignancy. *Maturitas* [Internet]. 2007 Aug 20 [cited 2014 Dec 15];57(4):415–21.
 17. Wethington SL, Herzog TJ, Burke WM, Sun X, Lerner JP, Lewin SN, et al. Risk and Predictors of Malignancy in Women with Endometrial Polyps. *Annals of Surgical Oncology*. 2011. p. 3819–23.
 18. Costa-Paiva L, Godoy CE, Antunes A, Caseiro JD, Arthuso M, Pinto-Neto AM. Risk of malignancy in endometrial polyps in premenopausal and postmenopausal women according to clinicopathologic characteristics. *Menopause*. 2011. p. 1278–82.
 19. Setiawan VW, Pike MC, Karageorgi S, Deming SL, Anderson K, Bernstein L, et al. Age at last birth in relation to risk of endometrial cancer: pooled analysis in the epidemiology of endometrial cancer consortium. *Am J Epidemiol* [Internet]. 2012;176:269–78.
 20. Lima GP BE. Síndrome do Climatério. In: *Ginecologia Endócrina*. Ginecologia Endócrina. 2003. p. 243–5.
 21. Fader AN, Arriba LN, Frasure HE, von Gruenigen VE. Endometrial cancer and obesity: Epidemiology, biomarkers, prevention and survivorship. *Gynecologic Oncology*. 2009. p. 121–7.
 22. Maia H, Maltez A, Studard E, Athayde C, Coutinho EM. Effect of previous hormone replacement therapy on endometrial polyps during menopause. *Gynecol Endocrinol*. 2004;18:299–304.
 23. L. B. *Patologia Geral Básica*. 1994.
 24. Dai Y, Xia W, Song T, Su X, Li J, Li S, et al. MicroRNA-200b is overexpressed in endometrial adenocarcinomas and enhances MMP2 activity by downregulating TIMP2 in human endometrial cancer cell line HEC-1A cells. *Nucleic Acid Ther* [Internet]. 2013;23:29–34.
 25. Hecht JL, Mutter GL. Molecular and pathologic aspects of endometrial carcinogenesis. *Journal of Clinical Oncology*. 2006. p. 4783–91.
 26. Epstein E. Management of postmenopausal bleeding in Sweden: A need for increased use of hydrosoneography and hysteroscopy. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2004;83:89–95.

27. De Albuquerque LG, Hardy E BL. Histerossonografia: avaliação da cavidade uterina com sangramento anormal. *Rev Assoc Med Bras.* 2006;52(4): 247–50.
28. Bazot M, Robert Y. Diagnostic imaging of menometrorrhagia. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris).* 2008;37 Suppl 8:S334–42.
29. Schmidt T, Breidenbach M, Nawroth F, Mallmann P, Beyer IM, Fleisch MC, et al. Hysteroscopy for asymptomatic postmenopausal women with sonographically thickened endometrium. *Maturitas [Internet].* 2009 Feb 20 [cited 2014 Dec 15];62(2):176–8.
30. Perez-Medina T, Bajo J, Huertas MA, Rubio A. Predicting atypia inside endometrial polyps. *J Ultrasound Med.* 2002;21:125–8.
31. Lieng M, Qvigstad E, Dahl GF, Istre O. Flow differences between endometrial polyps and cancer: A prospective study using intravenous contrast-enhanced transvaginal color flow Doppler and three-dimensional power Doppler ultrasound. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2008;32:935–40.
32. Preutthipan S, Linasmita V. A prospective comparative study between hysterosalpingography and hysteroscopy in the detection of intrauterine pathology in patients with infertility. *J Obstet Gynaecol Res.* 2003;29:33–7.
33. Lasmar R BP. *Histeroscopia – Uma Abordagem Prática.* 2002.
34. Svirsky R, Smorgick N, Rozowski U, Sagiv R, Feingold M, Halperin R, et al. Can we rely on blind endometrial biopsy for detection of focal intrauterine pathology? *Am J Obstet Gynecol.* 2008;199.
35. Machado F, Moreno J, Carazo M, León J, Fiol G, Serna R. Accuracy of endometrial biopsy with the Cornier pipelle for diagnosis of endometrial cancer and atypical hyperplasia. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2003;24:279–81.
36. Bettocchi S, Di Venere R, Pansini N, Pansini M V., Pellegrino A, Santamato S, et al. Endometrial biopsies using small-diameter hysteroscopes and 5f instruments: How can we obtain enough material for a correct histologic diagnosis? *J Am Assoc Gynecol Laparosc.* 2002;9:290–2.
37. Bettocchi S, Ceci O, Nappi L, Di Venere R, Masciopinto V, Pansini V, et al. Operative Office Hysteroscopy without Anesthesia: Analysis of 4863 Cases Performed with Mechanical Instruments. *J Am Assoc Gynecol Laparosc.* 2004;11:59–61.
38. Sington JD MS. Cytological atypia in endometrial polyps and immunostaining for p16, p53 and Ki 67. *Histopathology.* 2002;41(1): 86–8.
39. Maia H Jr, Maltez A, Studart E, Athayde C CE. Ki-67, Bcl-2 and p53 expression in endometrial polyps and in the normal endometrium during the menstrual cycle. *BJOG.* 2004;111(11): 1242–7.
40. Zitao Liu, Kuokkanen S, Pal L. Steroid hormone receptor profile of premenopausal endometrial polyps. *Reprod Sci.* 2010;17:377–83.

41. Honkavuori M, Talvensaaari-Mattila A, Soini Y, Turpeenniemi-Hujanen T, Santala M. MMP-2 expression associates with CA 125 and clinical course in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2007;104:217–21.
42. Planagumà J, Liljeström M, Alameda F, Bützow R, Virtanen I, Reventós J, et al. Matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 codistribute with transcription factors RUNX1/AML1 and ETV5/ERM at the invasive front of endometrial and ovarian carcinoma. *Hum Pathol.* 2011;42:57–67.
43. Goh AM, Coffill CR, Lane DP. The role of mutant p53 in human cancer. *Journal of Pathology.* 2011. p. 116–26.
44. La Vecchia C, Franceschi S, Decarli A, Gallus G, Tognoni G. Risk factors for endometrial cancer at different ages. *J Natl Cancer Inst.* 1984;73:667–71.
45. Cimpean AM, Saptefrati L, Ceausu R, Raica M. Characterization of endoglin and Ki-67 expression in endothelial cells from benign and malignant lesions of the uterine cervix. *Pathol Int [Internet].* 2009;59:695–700.
46. Lal-Nag M, Morin PJ. The claudins. *Genome Biol.* 2009;10:235.
47. Ouban A, Ahmed AA. Claudins in human cancer: A review. *Histology and Histopathology.* 2010. p. 83–90.
48. Pan XY, Li X, Che YC, Li HY, Li X, Zhang Y, et al. Overexpression of claudin-4 may be involved in endometrial tumorigenesis. *Oncol Lett.* 2013;5:1422–6.
49. Szabó I, Kiss A, Schaff Z, Sobel G. Claudins as diagnostic and prognostic markers in gynecological cancer. *Histol Histopathol.* 2009;24:1607–15.
50. Mitchell LA, Overgaard CE, Ward C, Margulies SS, Koval M. Differential effects of claudin-3 and claudin-4 on alveolar epithelial barrier function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol [Internet].* 2011;301:L40–9.
51. Konecny GE, Agarwal R, Keeney GA, Winterhoff B, Jones MB, Mariani A, et al. Claudin-3 and claudin-4 expression in serous papillary, clear-cell, and endometrioid endometrial cancer. *Gynecol Oncol.* 2008;109:263–9.
52. Morin PJ. Claudin proteins in human cancer: Promising new targets for diagnosis and therapy. *Cancer Research.* 2005. p. 9603–6.
53. Pan XY, Wang B, Che YC, Weng ZP, Dai HY, Peng W. Expression of claudin-3 and claudin-4 in normal, hyperplastic, and malignant endometrial tissue. *Int J Gynecol Cancer.* 2007;17:233–41.
54. Pérez-Gómez E, del Castillo G, Santibáñez JF, López-Novoa JM, Bernabéu C, Quintanilla M. The role of the TGF-beta coreceptor endoglin in cancer. *ScientificWorldJournal.* 2010;10:2367–84.
55. Zavadil J, Böttinger EP. TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene.* 2005;24:5764–74.

56. Puljiz M, Puljiz Z, Vucemilo T, Ramić S, Knezević F, Culo B, Alvir I, Tomica D DD. Prognostic significance of matrix metalloproteinases 2 and 9 in endometrial cancer. *Coll Antropol.* 2012;36(4):1367–72.
57. Graesslin O, Cortez A, Uzan C, Birembaut P, Quereux C, Darai E. Endometrial tumor invasiveness is related to metalloproteinase 2 and tissue inhibitor of metalloproteinase 2 expressions. *Int J Gynecol Cancer.* 2006;16:1911–7.
58. Bogusiewicz M., Stryjecka-Zimmer M. RT. Activity of matrix metalloproteinases -2 and -9 (MMP-2 and MMP-9) and content of their tissue inhibitors in endometrial cancer – a preliminary study. *Ginekologia polska.* 2007;78(5):366–72.
59. Karahan N, Güney M, Baspinar S, Oral B, Kapucuoglu N, Mungan T. Expression of gelatinase (MMP-2 and MMP-9) and cyclooxygenase-2 (COX-2) in endometrial carcinoma. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2007;28:184–8.
60. Jedryka M, Chrobak A, Chelmonska-Soyta A, Gawron D, Halbersztadt A, Wojnar A, et al. Matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 expression in tumor infiltrating CD3 lymphocytes from women with endometrial cancer. *Int J Gynecol Cancer* [Internet]. 2012;22:1303–9.
61. Saad RS, Jasnosz KM, Tung MY, Silverman JF. Endoglin (CD105) expression in endometrial carcinoma. *Int J Gynecol Pathol.* 2003;22:248–53.

Publicação

INVESTIGAÇÃO DA EVOLUÇÃO DOS PÓLIPOS
ENDOMETRIAIS EM CÂNCER DE ENDOMÉTRIO

5. PUBLICAÇÃO (PAPER)

INVESTIGAÇÃO DA EVOLUÇÃO DOS PÓLIPOS ENDOMETRIAIS EM CÂNCER DE ENDOMÉTRIO

“Investigation of the Development of Endometrial Polyps in Endometrial Cancer”

Gustavo Filipov Peres, MSc¹, Daniel Spadoto-Dias, PhD¹, Flávia Neves Bueloni-Dias, MSc¹,
Nilton José Leite, PhD¹, Leonardo Vieira Elias, MSc¹, Maria Aparecida Custódio Domingues,
PhD², Carlos Roberto Padovani, PhD³, *Rogério Dias, PhD¹.

From Botucatu Medical School, São Paulo State University - FMB/UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil.

¹ *Department of Gynecology and Obstetrics*

² *Department of Clinical Pathology*

³ *Department of Biostatistics – Institute of Biosciences - IB*

* *Chairman of Gynecological Endoscopy and Family Planning Sector and Principal Investigator*

Financial disclosure: The authors have no commercial, proprietary, or financial interest in the products or companies describes in this article.

Corresponding author: Gustavo Filipov Peres, MD, MSc. Botucatu Medical School, São Paulo State University FMB/UNESP. Department of Gynecology and Obstetrics. Distrito de Rubião Junior, s/nº - Botucatu – SP. CEP:18.618-970. phone: +55 14 3811-6227 / +55 14 3880-1402.
E-mail: guperes@uol.com.br

RESUMO

Objetivo: Avaliar a expressão imunoistoquímica de receptores de estrogênio (RE) e progesterona (RP), de proteínas relacionadas à proliferação celular (Ki-67), à neoangiogênese (endoglinina - CD105), à adesão celular (claudinas 3 e 4) e proteínas da matriz extracelular (metaloproteinases 2 e 9 - MMP 2 e MMP 9) nos pólipos endometriais e no câncer de endométrio comparativamente ao endométrio normal.

Tipo de Estudo: Estudo transversal comparativo com amostra de conveniência. O levantamento foi realizado através de banco de dados do Laboratório de Patologia Clínica da Faculdade de Medicina de Botucatu.

Local: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP.

Pacientes: Foram realizados estudos imunoistoquímicos de 30 amostras de pólipos endometriais sem atipias e de 30 amostras de adenocarcinoma endometrial do tipo endometriode e confrontados com os resultados da análise de 30 amostras de endométrio atrófico (grupo controle).

Intervenções: Dados epidemiológicos, clínicos e antropométricos foram levantados através de análise dos prontuários. Para análise dos casos de adenocarcinoma de endométrio e dos controles foi empregada a técnica de *tissue microarray* (TMA). Os blocos de parafina, com os cortes do maior fragmento de lesão polipoide e os blocos receptores de TMA foram utilizados para avaliação imunoistoquímica de RE, RP, CD105, Ki-67, claudinas 3 e 4, MMP-2 e MMP-9.

Resultados Principais: Identificou-se diferença significativa entre os grupos na expressão de RE ($P < 0,001$) e RP ($P < 0,05$), do Ki-67 ($P < 0,001$), do CD105 ($P < 0,001$) e da claudina 3 ($P < 0,001$). Não foram identificadas diferenças nos marcadores pesquisados entre pólipos e câncer de endométrio ($P \geq 0,05$). A expressão de MMP-2 e MMP-9 foi praticamente ausente nos três grupos.

Conclusões: Nas amostras pesquisadas, não foi demonstrada diferenciação entre os pólipos e a neoplasia endometrial nos parâmetros imunoistoquímicos avaliados. Não se observou expressão das MMP-2 e -9 nos tecidos endometriais analisados. Novos estudos são necessários para melhor compreensão dos mecanismos biomoleculares da carcinogênese endometrial.

Palavras-chave: Endométrio/patologia; Imunoistoquímica; Neoplasias do endométrio; Pólipos/epidemiologia.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the immunohistochemical expression of estrogen receptors (RE), progesterone receptors (RP), cell proliferation (Ki-67), neoangiogenesis (endoglin - CD105), cell adhesion (claudin 3 and 4) and extracellular matrix proteins (metalloproteinases 2 and 9 - MMP 2 and MMP 9) in endometrial polyps and cancer compared to normal endometrium.

Design: Comparative cross-sectional study with occasional sample. The survey was conducted from the database of the Clinical Pathology Laboratory of Botucatu Medical School.

Setting: Clinics Hospital from Botucatu Medical School, São Paulo State University – UNESP.

Patients: Were performed immunohistochemical studies of 30 samples of endometrial polyps without atypia and 30 samples of endometrioid adenocarcinoma of endometrium confronted with the results of 30 atrophic endometrial samples (control group).

Interventions: Epidemiological, clinical and anthropometric data were collected through analysis of medical records. To analyze the cases of endometrial adenocarcinoma and controls we used the tissue microarray technique (TMA). Paraffin blocks, with the larger fragment of polypoid lesions and recipient blocks of TMA were used to evaluate immunohistochemical expression of ER, PR, CD105, Ki-67, claudin 3 and 4, MMP-2 and MMP-9.

Main Results: We identified a significant difference between groups in ER ($P < 0.001$) and PR expression ($P < 0.05$), Ki-67 ($P < 0.001$), CD105 ($P < 0.001$) and claudin 3 ($P < 0.001$). No difference was found between polyps and endometrial cancer ($P \geq 0.05$). The expression of MMP-2 and MMP-9 was virtually absent in all three groups.

Conclusions: In the studied samples according to the immunohistochemical parameters evaluated no differentiation between polyps and endometrial cancer was observed. There was no expression of MMP-2 and -9 in endometrial tissues analyzed. Further studies are necessary to better understand the molecular mechanisms in endometrial carcinogenesis.

Keywords: Endometrium/pathology; Immunohistochemistry; Endometrial neoplasms; Polyps/epidemiology.

INTRODUÇÃO

Pólipos endometriais (PE) são frequentemente assintomáticos e detectados de maneira incidental através da ultrassonografia pélvica transvaginal realizada durante a rotina ginecológica⁽¹⁾. Contudo, podem estar relacionados com sangramento uterino anormal, sendo responsáveis por até 39% dos sangramentos irregulares que ocorrem durante a menacme e de 21% a 28% dos sangramentos na pós-menopausa^(2,3). Estima-se que sua prevalência seja em torno de 25% a 30% da população, com um pico de incidência em mulheres entre 40 e 60 anos de idade, sendo duas vezes mais prevalente na pós-menopausa (11,8%) em comparação à pré-menopausa (5,8%)⁽⁴⁻⁶⁾.

Em virtude do predomínio destas lesões durante o climatério e nos primeiros anos de menopausa, associado ao inconveniente de eventuais episódios de sangramento, os PE configuram relevante condição para o diagnóstico diferencial da neoplasia endometrial^(2,3). O adenocarcinoma de endométrio é o sexto tipo de câncer mais frequente entre as mulheres, com aproximadamente 290 mil casos novos ao ano no mundo⁽⁷⁾. Nos Estados Unidos, estima-se que foram diagnosticados cerca de 52.630 casos de câncer endometrial em 2014, com aproximadamente 8.590 óbitos devido à doença⁽⁸⁾. Na União Européia, de acordo com estimativas do ano de 2008, foram diagnosticados 55.941 casos seguidos de 12.903 mortes relacionadas à doença, com uma taxa de incidência de 16,2 casos a cada 100 mil mulheres⁽⁹⁾. No Brasil, sua incidência gira em torno de 5,8 casos a cada 100 mil mulheres, sendo mais prevalente entre os 50 e 65 anos de idade⁽¹⁰⁾. A incidência de câncer de endométrio associado aos PE é estimada em torno de 3,5%, variando segundo a maioria dos estudos entre 0 e 4,8%, sendo que esse risco é maior em mulheres com sangramento na pós-menopausa^(2,11). Entretanto, dados da literatura demonstram que a taxa de hiperplasia e

malignização dos pólipos pode ser semelhante em mulheres com sangramento (3,2%) e sem sangramento (3,9%), a depender da população analisada⁽¹²⁾.

Como uma maneira em prever o potencial de malignização dos PE, análise imunoistoquímica de diferentes biomarcadores tem sido proposta na tentativa de elucidar os mecanismos moleculares que determinam a carcinogênese endometrial⁽¹³⁻¹⁵⁾. A expressão imunoistoquímica de receptores hormonais, de oncogenes e genes supressores de tumor; de proteínas anti-apoptóticas, relacionadas à atividade mitótica e a neoangiogênese; de moléculas de adesão intercelular e da matriz extracelular já foram investigadas com resultados contraditórios sobre sua participação no desenvolvimento da neoplasia endometrial^(11,16-20).

Sendo assim, o presente estudo visa estabelecer um painel imunoistoquímico dos pólipos endometriais e do adenocarcinoma de endométrio tipo endometrióide através da análise da expressão de receptores hormonais de estrogênio (RE) e progesterona (RP), de proteínas relacionadas à proliferação celular (Ki-67) e à neoangiogênese (endoglin - CD105), expressão de moléculas de adesão celular (claudinas 3 e 4) e proteínas da matriz extracelular (metaloproteinases 2 e 9 - MMP 2 e MMP 9), comparativamente ao endométrio normal, na tentativa de estudar a possível evolução dos pólipos endometriais em câncer de endométrio.

PACIENTES E MÉTODOS

Trata-se de estudo **transversal** e comparativo, com amostra de conveniência. O grupo populacional foi constituído de pacientes atendidas pelo Setor de Endoscopia Ginecológica e Planejamento Familiar e pelo Setor de Oncologia Ginecológica do

Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB/UNESP). O levantamento foi realizado através de banco de dados do Laboratório de Patologia Clínica da FMB/UNESP. Dados epidemiológicos e clínicos foram levantados pela análise dos prontuários após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição.

Foram avaliadas 30 mulheres, submetidas à polipectomia histeroscópica cirúrgica e com confirmação histopatológica de PE sem atipias, durante o período de janeiro de 2010 a dezembro de 2011; e 30 mulheres, submetidas à histerectomia total e anexectomia bilateral com amostragem ganglionar pélvica, devido à adenocarcinoma endometrial do tipo endometrióide, conforme a classificação para adenocarcinomas de endométrio da Organização Mundial de Saúde (OMS 2003), durante o período de janeiro de 2003 a dezembro de 2010. Uma terceira amostra contendo 30 pacientes, pareadas por idade e fase reprodutiva ao grupo do câncer endometrial, sem história de uso de terapia hormonal (TH), submetidas à cirurgia durante igual período devido à prolapso uterino e com diagnóstico histopatológico de endométrio atrófico (grupo controle), foi analisada segundo os parâmetros imunoistoquímicos.

Para análise dos casos de adenocarcinoma de endométrio e dos controles foi empregada a técnica de *tissue microarray* (TMA), validada para o endométrio, com elaboração da plataforma contendo amostras representativas (*cores*)⁽²¹⁾. A partir da identificação de áreas de interesse nas lâminas coradas com Hematoxilina-Eosina, foram obtidas amostras circulares (1,0 mm de diâmetro) dos blocos de parafina correspondentes e dispostas em bloco receptor usando o aparelho *Tissue Microarrayer* (Beecher Instruments®, Silver Spring, USA) com espaçamento de 0,2 mm entre dois *cores*. Um mapa foi então elaborado, com a posição exata de cada caso. Em virtude dos pequenos fragmentos de tecido no grupo dos PE, a técnica de TMA não foi aplicada,

sendo que, os blocos de parafina com os cortes do maior fragmento de lesão polipoide foram selecionados para avaliação imunoistoquímica. A partir do bloco receptor de TMA e dos blocos originais dos PE foram realizados cortes de 3µm, montados em lâminas silanizadas, seguido de desparafinização em estufa a cerca de 65°C, por aproximadamente uma hora, e tamponamento com solução de recuperação (Target Retrieval Solution, Dako) por 20 minutos de forma automatizada (Aparelho PT Link, Dako).

Os cortes foram então incubados com anticorpos primários de forma automatizada (Aparelho Autostainer Link 48, Dako) nas seguintes diluições: receptor de estrógeno (FLEX Receptor de Estrogênio Monoclonal Mo a Hu Dako, Clone 1D5, RTU, diluição de 1:100), receptor de progesterona (FLEX Receptor de Progesterona Monoclonal de Camundongo X-Hu Dako, Clone PgR636, diluição de 1:200), CD105 (Anticorpo Anti-Humano CD105-Endoglin Monoclonal de Camundongo Dako, Clone SN6h, solução pronta para uso), Ki-67 (FLEX Antígeno Ki-67 Monoclonal Mo a Hu Dako, Clone MIB-1, RTU, solução pronta para uso), claudina 3 (Anticorpo Anti-claudina-3 Policlonal de Coelho Dako, diluição de 1:100), claudina 4 (Anticorpo Anti-claudina-4 Monoclonal de Camundongo Dako, Clone 3E2C1, diluição de 1:50), metaloproteinase 2 (Anticorpo Anti-MMP2 Monoclonal de Camundongo Abcam, Clone CA-4001 / CA719E3C, diluição de 1:50) e metaloproteinase 9 (Anticorpo Anti-MMP9 Monoclonal de Camundongo Abcam, Clone 15W2, diluição de 1:100) por período de 20 a 30 minutos, dependendo do anticorpo. Neste mesmo aparelho, os cortes foram também incubados com anticorpos secundários (EnVision FLEX, Dako) por 20 minutos. Foi realizada revelação com o cromógeno 3,3-diaminobenzidina (Cell Marque, CAT. 957D-30) por 10 minutos seguida de contra-coloração com hematoxilina de Harris por 5 minutos.

A positividade para RE e RP foi analisada de maneira semi-quantitativa, de acordo com protocolos de pesquisa descritos em estudos prévios, utilizando-se objetiva de 200x⁽²²⁻²⁴⁾. Percorrendo-se toda a extensão dos cortes histológicos, a expressão para receptores hormonais foi classificada como negativa (indicando que a coloração foi ausente ou muito fraca, expressa em menos de 10% de núcleos celulares) ou positiva graduada como 1+ (até 25% de núcleos corados), 2+ (26%-50%), 3+ (51%-75%) e 4+ (76%-100%). Tais valores foram baseados tanto na quantidade de núcleos corados quanto na intensidade da coloração, tendo sido analisado apenas o epitélio glandular, não sendo considerada a positividade das células estromais.

Para avaliação da microdensidade vascular estimada pela endogлина (CD105), nos casos de PE, foi utilizada a objetiva de 40x, tendo sido identificadas e demarcadas três áreas com maior concentração do marcador. O número de microvasos foi então quantificado, em cada área selecionada, usando aumento de 200x e a microdensidade vascular foi calculada pela média do número de vasos encontrados nas três áreas. Nos casos de TMA, o número de microvasos foi quantificado em *cada core* usando aumento de 200x. Toda célula com característica endotelial, corada pelo marcador imunistoquímico, foi contada como microvaso, não sendo a visibilização do lúmen vascular um requisito necessário^(11,25). Para análise do índice de proliferação celular, a imunomarcção nuclear do Ki-67 foi calculada em porcentagem de acordo com o número de núcleos corados por campo de maior concentração da coloração, nas lâminas convencionais, e em 100 células/*core*, nos casos de TMA, em aumento de 200x.

Para a análise das claudinas 3 e 4 seguiu-se um *score*, padronizado por nosso grupo como resultado de trabalho anterior (Tonon, 2013 – dados não publicados) onde se observou em aumento de 200x o padrão de coloração da membrana (0 = negativo, 1

= padrão focal, 2 = padrão difuso, 3 = padrão difuso em membrana e citoplasma); a intensidade de marcação (0 = negativa, 1 = discreta, 2 = moderada, 3 = intensa) e a porcentagem de células coradas no tecido (0 = 0 a 5%, 1 = 6 a 30%, 2 = 31 a 50%, 3 = 51 a 80%, 4 = 81 a 100%) em cada core do TMA ou lâmina isolada dos PE. A leitura das metaloproteinases (MMPs) foi realizada de igual maneira, buscando-se a imunomarcação no citoplasma das células epiteliais, analisado de acordo com a intensidade de marcação (0 = negativa, 1 = discreta, 2 = moderada, 3 = intensa) e a porcentagem de células coradas em todo o tecido (0 = 0 a 5%, 1 = 6 a 30%, 2 = 31 a 50%, 3 = 51 a 80%, 4 = 81 a 100%). Controles positivos e negativos apropriados foram utilizados para cada biomarcador.

Para análise dos dados foram calculadas medidas de posição e variabilidade, envolvendo a média, desvio padrão, mediana, valores mínimo e máximo, para as variáveis quantitativas; e frequências absoluta e percentual, para as variáveis qualitativas. Para estudo estatístico das variáveis qualitativas utilizou-se o teste de associação de Goodman complementado com as comparações múltiplas entre e dentro de populações multinomiais^(26,27). No caso das variáveis quantitativas, naquelas com aderência à distribuição normal de probabilidades, utilizou-se a técnica da análise de variância para o modelo com um fator complementada com o teste de comparações múltiplas de Tukey (para fator com três grupos) e o teste t de Student para amostras independentes (fator com dois grupos). Na ausência de aderência, procedimento alternativo não paramétrico de Kruskal-Wallis foi utilizado com comparações múltiplas de Dunn (três níveis) e Mann-Whitney (dois níveis)⁽²⁸⁾. Os dados foram analisados através do programa SPSS para Windows, Versão 21.0, tendo sido adotados níveis de 5% de significância.

RESULTADOS

As características clínicas, epidemiológicas e antropométricas das pacientes com pólipos endometriais (n=30) e câncer de endométrio (n=30) estão representadas na Tabela 1. Verificou-se que os grupos foram homogêneos para a maioria das variáveis estudadas: paridade, índice de massa corpórea (IMC), uso de terapia hormonal, hipertensão arterial, *diabetes mellitus* e câncer de mama ($P \geq 0,05$). Observou-se diferença estatisticamente significativa quanto à idade das pacientes e ao período da vida reprodutiva, sendo que mulheres com câncer apresentavam idade mais avançada (média de 60,3 anos vs 52,2 anos; $P < 0,001$) e encontravam-se em uma proporção maior na menopausa (90% vs 56,7%; $P < 0,05$) quando comparadas às pacientes com diagnóstico de PE (Tabela 1).

Na Tabela 2 observou-se os parâmetros imunoistoquímicos das 90 pacientes pesquisadas, divididas em 3 grupos: pólipos endometriais (n=30), câncer de endométrio (n=30) e controle (n=30). As pacientes com neoplasia endometrial apresentaram diagnóstico de adenocarcinoma endometriode, classificado de acordo com a Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO 2009), assim distribuídas para o grau histológico: grau I = 25; grau II = 3 e grau III = 2; e para o estágio: IA = 21; IB = 4; II = 2; IIIA = 2; IV = 1. As pacientes do grupo controle, pareadas por idade e fase reprodutiva ao grupo do câncer endometrial, apresentavam média etária de 64,1 ($\pm 9,2$) anos ($P \geq 0,05$).

Identificou-se diferença significativa entre os grupos na expressão dos receptores hormonais, na proteína relacionada à proliferação celular, no marcador de neovascularização e nas moléculas de adesão celular (Tabela 2). Notou-se maior expressão de RE no grupo controle [4,0+ (0,0;4,0+)] quando comparado aos grupos do

pólipo [2,5+ (1,0+;4,0+)] e do câncer endometrial [1,0+ (0,0+;4,0+)] ($P<0,001$). Em relação ao RP, sua expressão foi maior no controle [4,0+ (0,0;4,0+)] que no grupo do câncer de endométrio [2,0+ (0,0+;4,0+)] ($P<0,05$). A expressão da endogлина (CD105) e do Ki-67 foi maior nos grupos do pólipo [20,8 (12,0;48,7) e <1,0% (0,0;15,0%), respectivamente] e câncer endometrial [18,0 (0,0;45,0) e 2,0% (0,0;100,0%), respectivamente] quando comparadas ao controle [6,5 (0,0;26,0) e 0,0% (0,0;0,0), respectivamente] ($P<0,001$) (Figuras 3 e 4).

Em relação à claudina 3, constatou-se um predomínio de padrão de coloração difuso na membrana celular do câncer de endométrio [2,0 (0,0;3,0)] contrastado com um padrão de membrana focal no grupo controle [1,0 (0,0;1,0)] ($P<0,005$) (Figura 5). Observou-se também maior intensidade da coloração nos pólipos [3,0 (0,0;3,0)] e no câncer endometrial [3,0 (0,0;3,0)] em comparação ao endométrio normal [2,0 (0,0;3,0)] ($P<0,001$) (Figura 6), enquanto que a quantidade de células coradas na extensão do tecido analisado foi maior no endométrio normal [4,0 (0,0;4,0)] quando comparado ao PE [3,0 (0,0;4,0)] ($P<0,05$) (Figura 7). No que concerne a claudina 4 (Figuras 8 a 10) e as metaloproteinases (MMP 2 e MMP 9) não houve diferenças significativas entre os grupos ($P\geq 0,05$) (Tabela 2).

DISCUSSÃO

Pólipos endometriais são estruturas que continuam a levantar dúvidas sobre sua patogênese, ocasionando recorrentes discussões sobre a conduta a ser tomada quando diagnosticados, particularmente em mulheres assintomáticas após a menopausa^(2,3,29). Como fatores de risco para sua degeneração maligna, são considerados os fatores associados ao câncer de endométrio, tais como idade avançada, nuliparidade, menarca

precoce, menopausa tardia, obesidade, hipertensão, diabetes e uso de tamoxifeno^(3,6,30). No presente estudo observou-se que apesar da alta prevalência de mulheres hipertensas e predomínio de mulheres com obesidade, não houve diferenças entre as mulheres com diagnóstico de PE e aquelas com câncer de endométrio. Contudo, mulheres com câncer apresentavam idade mais avançada e encontravam-se em uma proporção maior na menopausa, demonstrando uma tendência no aumento do risco com o avançar da idade e do tempo de menopausa. Tem-se demonstrado que, embora a hipertensão, diabetes e obesidade sejam variáveis associadas aos PE, sua influência perde significância quando são realizados estudos de regressão logística multivariada, sendo que o único fator de risco independente para a malignização dos PE parece ser o avançar da idade^(31,32).

Os esteroides hormonais, principalmente o estrogênio, têm um papel fundamental na patogênese da hiperplasia endometrial e do adenocarcinoma do tipo endometriode⁽⁸⁾. Sua estrutura lipofílica permite que o estrogênio atravesse livremente a membrana celular e se una ao receptor (RE) no núcleo da célula, controlando a expressão de vários genes, incluindo aqueles que codificam receptores de progesterona (RP) e fatores de crescimento⁽¹⁹⁾. A exposição ao estrogênio sem a oposição da progesterona propicia a ativação de oncogenes e a inativação de genes supressores de tumor, desregulando o ciclo celular e ocasionando disfunção de proteínas relacionadas à invasão e à progressão tumoral^(19,33). Acredita-se que um desequilíbrio no ciclo celular, entre a proliferação e a apoptose, influenciado pela concentração dos esteroides sexuais, possa ser um dos mecanismos desencadeadores para o desenvolvimento de diferentes afecções endometriais, tanto benignas quanto malignas^(15,34,35). Por isso, o reconhecimento da resposta hormonal do endométrio normal, de lesões benignas, pré-malignas e malignas torna-se tão importante, na busca por caracterizar o perfil de alterações com potencial de metastatização.

Dados da literatura demonstram uma concentração maior de RE e RP no epitélio glandular de pólipos endometriais quando comparados ao tecido endometrial normal, sugerindo que os PE apresentem uma sensibilidade aumentada aos esteroides sexuais e possam se desenvolver mesmo na presença de baixas concentrações hormonais séricas^(19,23,24,36). Contraditoriamente, no presente estudo, apesar dos PE e da neoplasia endometrial estarem associados à hiperestímulos hormonais, a concentração de RE foi significativamente maior no endométrio normal quando comparada ao PE e ao câncer de endométrio $[4,0+ (0,0;4,0+)^b \text{ vs } 2,5+ (1,0+;4,0+)^a \text{ vs } 1,0+ (0,0;4,0+)^a; P<0,001]$, assim como a concentração de RP foi maior no endométrio normal quando comparado ao câncer endometrial $[4,0+ (0,0;4,0+)^b \text{ vs } 2,0+ (0,0;4,0+)^a; P<0,05]$. Acredita-se que um mecanismo de retroalimentação positiva, em resposta às baixas taxas hormonais endógenas durante a menopausa, possa explicar o aumento no número de receptores no endométrio atrófico do grupo controle⁽³⁷⁾.

Interessante notar que, em concordância com recente trabalho publicado, a receptividade estrogênica e progesteragênica também foi maior no tecido glandular dos PE que no câncer de endométrio, ainda que não tenha atingido significância⁽¹¹⁾ (Tabela 2). A indiferenciação do tecido neoplásico, associada à perda de seus mecanismos regulatórios, seria o principal fator responsável por este achado^(38,39). De igual maneira, a diminuição dos RP estaria associada a alterações da decidualização, o que favoreceria o desenvolvimento de lesões endometriais⁽¹⁹⁾. Dessa forma, os PE corresponderiam a um estágio intermediário, em que o tecido é bem diferenciado, porém com uma resposta inadequada à produção hormonal em relação ao endométrio adjacente, enquanto que a neoplasia endometrial seria um estágio avançado do processo hiperplásico, no qual o endométrio perdeu sua capacidade de resposta aos hormônios, progredindo de maneira desordenada, causando invasão e disseminação da doença^(38,40). A caracterização do tipo

de pólipos e a distinção precisa da presença ou ausência de atipias, relacionada com o aumento ou diminuição na quantidade de receptores hormonais, pode explicar a divergência dos dados apresentados e futuras pesquisas tornam-se necessárias.

No presente estudo pudemos observar que houve uma diferença significativa no número de vasos neoformados, estimados pelo marcador CD105, entre o endométrio normal, os PE e o câncer de endométrio [6,5 (0,0;26,0)^a vs 20,8 (12,0;48,7)^b vs 18,0 (0,0;45,0)^b; P<0,001], reafirmando a existência de um mecanismo de neovascularização necessário para nutrir o processo hiperplásico e neoplásico. A microdensidade vascular estimada pela endogлина (CD105) foi demonstrada ser maior na hiperplasia complexa com atipia quando comparada à hiperplasia simples⁽⁴¹⁾. Contudo, não houve diferenças significativas entre os PE e a neoplasia endometrial (Tabela 2).

Os resultados apresentados estão em concordância com recentes pesquisas que também demonstraram que a mensuração de marcadores endoteliais parece não distinguir os pólipos do câncer de endométrio^(11,42). Partindo-se do princípio que ambas as condições estão associadas à hiperplasia da camada endometrial, os mecanismos de vascularização necessários para nutrir o processo hiperplásico seriam os mesmos. Contudo, há evidências de que a endogлина (CD105) tenha papel muito mais amplo, modulando a proliferação, a adesão e a migração de células neoplásicas⁽⁴⁰⁾. Com isso, a endogлина, em um primeiro momento, teria um papel regulador na carcinogênese, inibindo o desenvolvimento da doença e impedindo a metastatização⁽⁴³⁾. Em estádios mais avançados, o aumento da endogлина estaria relacionado com a progressão da doença, promovendo a migração e a invasão de células tumorais por um mecanismo autônomo, propiciando a neovascularização⁽⁴⁰⁾.

Observou-se, ainda, ausência de atividade mitótica no grupo controle [0,0% (0,0;0,0)^a; $P < 0,001$], enquanto que, ainda que discreta, identificou-se atividade proliferativa das células nos PE e na neoplasia de endométrio [$< 1,0\%$ (0,0;15,0%)^b vs 2,0% (0,0;100,0%)^b; $P \geq 0,05$]. A proteína Ki-67 se manifesta nas fases ativas do ciclo celular (G1, S, G2 e mitose), mas não está expressa na fase de repouso celular (G0), sendo excelente marcador para quantificar o crescimento de determinada população de células⁽²⁵⁾. Nos processos neoplásicos espera-se que o Ki-67 esteja aumentado de maneira expressiva, principalmente nos tumores de alto grau, indicando a intensa atividade mitótica associada à condição^(20,37). Contudo, assim como no marcador endotelial, ao analisarmos a taxa de proliferação celular estimada pelo Ki-67, não houve diferenças significativas entre os PE e o adenocarcinoma de endométrio tipo endometriode.

Tais fatos podem parcialmente ser explicados pelo predomínio de casos de neoplasia endometrial bem diferenciada (grau histológico I) em estágio precoce da doença (FIGO grau I), analisados no presente estudo. Sendo assim, a atividade proliferativa tumoral no grupo do câncer não teria atingido seu pico máximo, apresentando um resultado discretamente aumentado em relação ao grupo dos PE. Da mesma forma, acredita-se que a baixa expressão da endoglinina no grupo do câncer, possa estar associada ao seu mecanismo regulatório no início do processo tumoral. Estudos indicam que em estágios tardios, o aumento da microdensidade vascular, estimada pelo CD105, possa estar associada à invasão angiolímfática e metástase para linfonodos, indicando pior prognóstico^(41,44).

As claudinas 3 e 4 são proteínas componentes das junções estreitas das células epiteliais, participando da barreira paracelular e do controle do fluxo de moléculas no espaço intercelular⁽⁴⁵⁾. Estão envolvidas na manutenção da polaridade das células, assim

como na regulação de sua proliferação e diferenciação, por apresentarem a capacidade de selecionar proteínas sinalizadoras^(45,46). Acredita-se que a perda da integridade epitelial ocorra devido a alterações nos níveis das claudinas e no consequente rompimento da comunicação paracelular, contribuindo para o aparecimento de espaços que propiciam a mobilidade celular e o aumento de suprimento nutricional para as células neoplásicas^(45,47). Estudos preliminares indicam que as claudinas 3 e 4 são altamente expressas nos carcinomas seroso papilífero e de células claras do endométrio, formas agressivas deste tipo de neoplasia associadas a altas taxas de recorrência e pobre prognóstico⁽⁴⁸⁾.

Pan et al. na tentativa de esclarecer os papéis das claudinas na carcinogênese endometrial, verificaram que a expressão das claudinas 3 e 4 foi significativamente maior na hiperplasia atípica e no adenocarcinoma endometriode quando comparado ao endométrio normal⁽¹⁶⁾. No presente estudo, em relação à claudina 3, pudemos observar um predomínio de padrão de coloração difuso na membrana celular do câncer de endométrio, contrastado com um padrão de membrana focal no grupo controle [2,0 (0,0;3,0)^b vs 1,0 (0,0;1,0)^a; P<0,005], sugerindo um aumento na concentração de claudina 3 na membrana de células tumorais, quando comparadas ao endométrio normal.

Observou-se também maior intensidade da coloração nos pólipos e no câncer endometrial em comparação ao endométrio normal [3,0 (0,0;3,0)^b vs 3,0 (0,0;3,0)^b vs 2,0 (0,0;3,0)^a; P<0,001] e uma distribuição mais homogênea da coloração no tecido endometrial normal quando comparado aos PE [4,0 (0,0;4,0)^b vs 3,0 (0,0;4,0)^a; P<0,05]. Estes resultados sugerem um aumento na concentração de claudina 3 no tecido hiperplásico dos PE e neoplásico do câncer de endométrio associado a uma distribuição irregular, compatível com um rearranjo desorganizado destas proteínas, esperado nas

displasias teciduais. Em relação à claudina 4, apenas a distribuição tecidual deste marcador mostrou diferença (Tabela 2), ainda que não significativa, sugerindo uma disfunção na atividade celular dos tecidos displásicos, através do comportamento biomolecular desigual, caracterizado pela hipercaptação irregular desta proteína na extensão dos tecidos analisados.

As metaloproteinases (MMPs) são um grupo de endopeptidases dependentes do zinco (Zn^{2+}) que parecem desempenhar um papel fundamental no processo de invasão e metastatização tumoral, nos quais ocorra proteólise da camada basal e da matriz extracelular⁽⁴⁹⁾. As MMPs têm sido associadas ao comportamento agressivo de algumas neoplasias e a expressão das MMP 2 e MMP 9 parece apresentar um papel prognóstico no carcinoma de endométrio^(17,18). Estudos recentes sugerem que as MMPs estão envolvidas em diversos outros processos associados ao desenvolvimento tumoral, tais como regulação do crescimento da lesão, apoptose, promoção da neoangiogênese, perda da adesão intercelular, invasão e metastatização⁽⁴⁹⁾.

Erdemoglu et al. demonstraram que pólipos de mulheres na pré- e pós-menopausa apresentam expressão imunoistoquímica para MMP 2 e MMP 9, e que a mesma parece variar com o status hormonal⁽⁴⁹⁾. No presente estudo, a expressão imunoistoquímica das MMP 2 e MMP 9 não foi caracterizada no endométrio normal, nem nos PE e no tecido neoplásico, sendo que novos estudos devem ser realizados para elucidar a participação das metaloproteinases de matriz 2 e 9 na patogênese da hiperplasia e neoplasia endometriais.

Uma das limitações de nosso estudo foi o método de pontuação imunoistoquímica utilizado. A automação surgiu como uma abordagem confiável para avaliar os resultados de imunoistoquímica. No entanto, no presente estudo, procurou-se

avaliar a imunocoloração visualmente para evitar interpretações equivocadas devido à elevada heterogeneidade da qualidade morfológica das amostras armazenadas. Sendo assim, a subjetividade foi utilizada para favorecer a confiabilidade, com exclusão de casos inadequados para análise.

CONCLUSÃO

O uso de marcadores hormonais parece esclarecer em parte a fisiopatogenia das afecções endometriais, sendo um promissor marcador para diferenciação de lesões com potencial de malignização. Contudo, os níveis de resposta à produção hormonal relacionados à caracterização de atipias nucleares em lesões pré-malignas deveriam ser estabelecidos, e outros estudos com enfoque para esta área são necessários. Entre as mulheres avaliadas, não foi demonstrada diferenciação imunoistoquímica entre os pólipos e a neoplasia endometrial em relação aos marcadores endoteliais e à expressão do Ki-67. O uso de marcadores endoteliais e do índice de proliferação celular parece não auxiliar na detecção dos casos de neoplasia endometrial em estádios precoces.

A expressão das claudinas 3 e 4 tendem a modificar durante o processo neoplásico do endométrio, com um aumento na produção associada a uma distribuição irregular no tecido, supostamente relacionados à produção de um tipo de proteína não funcionante. A ruptura da integridade paracelular parece ser componente fundamental na patogênese das displasias endometriais. No presente estudo não foi caracterizada expressão imunoistoquímica das MMPs nas amostras analisadas indicando uma possível via independente no desenvolvimento da neoplasia endometrial ou uma alteração na produção das proteínas da matriz extracelular apenas em estádios tardios do processo, sendo necessários outros estudos para determinar estas associações.

Acknowledgment

Este estudo contou com o suporte da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, **Processo número 2012/17297-3**.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dreisler E, Sorensen SS, Ibsen PH, Lose G. Value of endometrial thickness measurement for diagnosing focal intrauterine pathology in women without abnormal uterine bleeding. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2009;33(3):344-8.
2. Salim S, Won H, Nesbitt-Hawes E, Campbell N, Abbott J. Diagnosis and management of endometrial polyps: a critical review of the literature. *J Minim Invasive Gynecol.* 2011;18(5):569-81.
3. Bueloni-Dias FN, Spadoto-Dias D, Nahas Neto J, Nahas EA. [Predictive factors for occurrence of endometrial polyps in postmenopausal women.]. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2014;36(11):489-96.
4. Dreisler E, Stampe Sorensen S, Ibsen PH, Lose G. Prevalence of endometrial polyps and abnormal uterine bleeding in a Danish population aged 20-74 years. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2009;33(1):102-8.
5. Miranda SM, Gomes MT, Silva ID, Girao MJ. [Endometrial polyps: clinical and epidemiological aspects and analysis of polymorphisms]. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2010;32(7):327-33.
6. Wethington SL, Herzog TJ, Burke WM, Sun X, Lerner JP, Lewin SN, et al. Risk and predictors of malignancy in women with endometrial polyps. *Ann Surg Oncol.* 2011;18(13):3819-23.
7. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011;61(2):69-90.
8. Group SGOCECW, Burke WM, Orr J, Leitao M, Salom E, Gehrig P, et al. Endometrial cancer: a review and current management strategies: part I. *Gynecol Oncol.* 2014;134(2):385-92.
9. Weiderpass E, Antoine J, Bray FI, Oh JK, Arbyn M. Trends in corpus uteri cancer mortality in member states of the European Union. *Eur J Cancer.* 2014;50(9):1675-84.

10. Brasil. Ministério da Saúde. INCA (Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva). *Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil*. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde. 2014.
11. Dias DS, Bueloni-Dias FN, Dias R, Nahas-Neto J, Petri Nahas EA, Leite NJ, et al. Usefulness of clinical, ultrasonographic, hysteroscopic, and immunohistochemical parameters in differentiating endometrial polyps from endometrial cancer. *J Minim Invasive Gynecol*. 2014;21(2):296-302.
12. Lieng M, Qvigstad E, Sandvik L, Jorgensen H, Langebrekke A, Istre O. Hysteroscopic resection of symptomatic and asymptomatic endometrial polyps. *J Minim Invasive Gynecol*. 2007;14(2):189-94.
13. Sington JD, Manek S. Cytological atypia in endometrial polyps and immunostaining for p16, p53 and Ki67. *Histopathology*. 2002;41(1):86-8.
14. Maia H, Jr., Maltez A, Studart E, Athayde C, Coutinho EM. Ki-67, Bcl-2 and p53 expression in endometrial polyps and in the normal endometrium during the menstrual cycle. *BJOG*. 2004;111(11):1242-7.
15. Dias DS, Bueloni-Dias FN, Dias R, Nahás-Neto J, Nahás EAP. [Endometrial polyps and the risk of malignancy: epidemiological, clinical and immunohistochemical aspects]. *Femina*. 2013;41 (1):33-8.
16. Pan XY, Wang B, Che YC, Weng ZP, Dai HY, Peng W. Expression of claudin-3 and claudin-4 in normal, hyperplastic, and malignant endometrial tissue. *Int J Gynecol Cancer*. 2007;17(1):233-41.
17. Bogusiewicz M, Stryjecka-Zimmer M, Rechberger T. [Activity of matrix metalloproteinases -2 and -9 (MMP-2 and MMP-9) and content of their tissue inhibitors in endometrial cancer--a preliminary study]. *Ginekol Pol*. 2007;78(5):366-72.
18. Honkavuori M, Talvensaaari-Mattila A, Soini Y, Turpeenniemi-Hujanen T, Santala M. MMP-2 expression associates with CA 125 and clinical course in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol*. 2007;104(1):217-21.
19. Leao RB, Andrade L, Vassalo J, Antunes A, Jr., Pinto-Neto A, Costa-Paiva L. Differences in estrogen and progesterone receptor expression in endometrial polyps and atrophic endometrium of postmenopausal women with and without exposure to tamoxifen. *Mol Clin Oncol*. 2013;1(6):1055-60.
20. Truskinovsky AM, Lifschitz-Mercer B, Czernobilsky B. Hyperplasia and carcinoma in secretory endometrium: a diagnostic challenge. *Int J Gynecol Pathol*. 2014;33(2):107-13.
21. Fons G, Hasibuan SM, van der Velden J, ten Kate FJ. Validation of tissue microarray technology in endometrioid cancer of the endometrium. *J Clin Pathol*. 2007;60(5):500-3.
22. 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(9):794-8.

23. Sant'Ana de Almeida EC, Nogueira AA, Candido dos Reis FJ, Zambelli Ramalho LN, Zucoloto S. Immunohistochemical expression of estrogen and progesterone receptors in endometrial polyps and adjacent endometrium in postmenopausal women. *Maturitas*. 2004;49(3):229-33.
24. Lopes RG, Baracat EC, de Albuquerque Neto LC, Ramos JF, Yatabe S, Depesr DB, et al. Analysis of estrogen- and progesterone-receptor expression in endometrial polyps. *J Minim Invasive Gynecol*. 2007;14(3):300-3.
25. Cimpean AM, Saptefrati L, Ceausu R, Raica M. Characterization of endoglin and Ki-67 expression in endothelial cells from benign and malignant lesions of the uterine cervix. *Pathol Int*. 2009;59(10):695-700.
26. Goodman LA. Simultaneous confidence intervals for contrasts among multinomial populations. *Ann Math Stat*. 1964;35(2):716-25.
27. Goodman LA. On simultaneous confidence intervals for multinomial proportions. *Technometrics*. 1965;7(2):247-54.
28. Zar JH. *Biostatistical analysis*. 5th ed. Upper Saddle River, N.J.: Prentice-Hall/Pearson; 2010. xiii, 944 p. p.
29. Antunes A, Jr., Costa-Paiva L, Arthuso M, Costa JV, Pinto-Neto AM. Endometrial polyps in pre- and postmenopausal women: factors associated with malignancy. *Maturitas*. 2007;57(4):415-21.
30. American Association of Gynecologic L. AAGL practice report: practice guidelines for the diagnosis and management of endometrial polyps. *J Minim Invasive Gynecol*. 2012;19(1):3-10.
31. Nappi L, Indraccolo U, Di Spiezio Sardo A, Gentile G, Palombino K, Castaldi MA, et al. Are diabetes, hypertension, and obesity independent risk factors for endometrial polyps? *J Minim Invasive Gynecol*. 2009;16(2):157-62.
32. Costa-Paiva L, Godoy CE, Jr., Antunes A, Jr., Caseiro JD, Arthuso M, Pinto-Neto AM. Risk of malignancy in endometrial polyps in premenopausal and postmenopausal women according to clinicopathologic characteristics. *Menopause*. 2011;18(12):1278-82.
33. Hecht JL, Mutter GL. Molecular and pathologic aspects of endometrial carcinogenesis. *J Clin Oncol*. 2006;24(29):4783-91.
34. Risberg B, Karlsson K, Abeler V, Lagrelius 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(2):155-60.
35. Hecht JL, Pinkus JL, Pinkus GS. Enhanced detection of atypical hyperplasia in endometrial polyps by PTEN expression. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2004;12(1):36-9.

36. Zitao L, Kuokkanen S, Pal L. Steroid hormone receptor profile of premenopausal endometrial polyps. *Reprod Sci.* 2010;17(4):377-83.
37. McGurgan P, Taylor LJ, Duffy SR, O'Donovan PJ. Are endometrial polyps from premenopausal women similar to post-menopausal women? An immunohistochemical comparison of endometrial polyps from pre- and post-menopausal women. *Maturitas.* 2006;54(3):277-84.
38. Kato K. Endometrial cancer stem cells: a new target for cancer therapy. *Anticancer Res.* 2012;32(6):2283-93.
39. Chiang S, Soslow RA. Updates in diagnostic immunohistochemistry in endometrial carcinoma. *Semin Diagn Pathol.* 2014;31(3):205-15.
40. Perez-Gomez E, Del Castillo G, Juan Francisco S, Lopez-Novoa JM, Bernabeu C, Quintanilla M. The role of the TGF-beta coreceptor endoglin in cancer. *ScientificWorldJournal.* 2010;10:2367-84.
41. Saad RS, Jasnosz KM, Tung MY, Silverman JF. Endoglin (CD105) expression in endometrial carcinoma. *Int J Gynecol Pathol.* 2003;22(3):248-53.
42. Miranda SP, Traiman P, Candido EB, Lages EL, Freitas GF, Lamaita RM, et al. Expression of p53, Ki-67, and CD31 proteins in endometrial polyps of postmenopausal women treated with tamoxifen. *Int J Gynecol Cancer.* 2010;20(9):1525-30.
43. Henry LA, Johnson DA, Sarrio D, Lee S, Quinlan PR, Crook T, et al. Endoglin expression in breast tumor cells suppresses invasion and metastasis and correlates with improved clinical outcome. *Oncogene.* 2011;30(9):1046-58.
44. Erdem O, Taskiran C, Onan MA, Erdem M, Guner H, Ataoglu O. CD105 expression is an independent predictor of survival in patients with endometrial cancer. *Gynecol Oncol.* 2006;103(3):1007-11.
45. Ouban A, Ahmed AA. Claudins in human cancer: a review. *Histol Histopathol.* 2010;25(1):83-90.
46. Pan XY, Li X, Che YC, Li HY, Li X, Zhang Y, et al. Overexpression of claudin-4 may be involved in endometrial tumorigenesis. *Oncol Lett.* 2013;5(4):1422-6.
47. Morin PJ. Claudin proteins in human cancer: promising new targets for diagnosis and therapy. *Cancer Res.* 2005;65(21):9603-6.
48. Konecny GE, Agarwal R, Keeney GA, Winterhoff B, Jones MB, Mariani A, et al. Claudin-3 and claudin-4 expression in serous papillary, clear-cell, and endometrioid endometrial cancer. *Gynecol Oncol.* 2008;109(2):263-9.
49. Erdemoglu E, Guney M, Karahan N, Mungan T. Expression of cyclooxygenase-2, matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in premenopausal and postmenopausal endometrial polyps. *Maturitas.* 2008;59(3):268-74.

Tabela 1. Dados clínicos, epidemiológicos e antropométricos das 60 pacientes com diagnóstico de pólipos endometrial (Grupo I, 30 pacientes) e câncer de endométrio (Grupo II, 30 pacientes).

	Grupo I	Grupo II	Valor de P
Idade [§]	52,2 (±10,9)	60,3 (±10,9)	<0,001
Paridade [¶]	3 (0;8)	2 (0;6)	≥0,05
IMC [£]	31,9 (±6,1)	30,2 (±4,8)	≥0,05
Menopausa*	17 (56,7)	27 (90,0)	<0,05
Terapia hormonal*	3 (10,0)	6 (20,0)	≥0,05
Hipertensão arterial*	17 (56,7)	21 (70,0)	≥0,05
Diabetes mellitus*	6 (20,0)	8 (26,7)	≥0,05
Câncer de mama*	2 (6,7)	2 (6,7)	≥0,05

§ ANOVA complementado com Teste de Tukey. Valor médio; desvio-padrão entre parênteses;

¶ Teste não paramétrico de Mann-Whitney. Valor médio; mínimo e máximo entre parênteses;

£ Teste t de Student para grupos independentes. Valor médio; desvio-padrão entre parênteses;

* Teste de associação de Goodman. Número absoluto; porcentagem entre parênteses;

IMC: Índice de massa corpórea.

Tabela 2. Análise de parâmetros imunoistoquímicos das 90 pacientes com diagnóstico de pólipos endometrial (Grupo I , 30 pacientes), câncer de endométrio (Grupo II, 30 pacientes) e controle (Grupo III, 30 pacientes).

	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Valor P
Receptor de Estrogênio*	2,5+ (1,0+;4,0+) ^a	1,0+ (0,0;4,0+) ^a	4,0+ (0,0;4,0+) ^b	<0,001
Receptor de Progesterona*	3,0+ (0,0;4,0+) ^{ab}	2,0+ (0,0;4,0+) ^a	4,0+ (0,0;4,0+) ^b	<0,05
CD105*	20,8 (12,0;48,7) ^b	18,0 (0,0;45,0) ^b	6,5 (0,0;26,0) ^a	<0,001
Ki67*	<1,0% (0,0;15,0%) ^b	2,0% (0,0;100,0%) ^b	0,0% (0,0;0,0) ^a	<0,001
Claudina 3 (padrão de membrana)*	1,0 (0,0;2,0) ^{ab}	2,0 (0,0;3,0) ^b	1,0 (0,0;1,0) ^a	<0,005
Claudina 3 (intensidade)*	3,0 (0,0;3,0) ^b	3,0 (0,0;3,0) ^b	2,0 (0,0;3,0) ^a	<0,001
Claudina 3 (extensão)*	3,0 (0,0;4,0) ^a	3,5 (0,0;4,0) ^{ab}	4,0 (0,0;4,0) ^b	<0,05
Claudina 4 (padrão de membrana)*	1,0 (0,0;2,0)	1,0 (0,0;3,0)	1,0 (0,0;1,0)	≥0,05
Claudina 4 (intensidade)*	2,0 (0,0;3,0)	2,0 (0,0;3,0)	2,0 (0,0;2,0)	≥0,05
Claudina 4 (extensão)*	1,0 (0,0;4,0)	2,0 (0,0;4,0)	4,0 (0,0;4,0)	≥0,05
MMP2 (intensidade)*	0,0 (0,0;0,0)	0,0 (0,0;0,0)	0,0 (0,0;0,0)	≥0,05
MMP2 (extensão)*	0,0 (0,0;0,0)	0,0 (0,0;0,0)	0,0 (0,0;0,0)	≥0,05
MMP9 (intensidade)*	0,0 (0,0;3,0)	0,0 (0,0;0,0)	0,0 (0,0;0,0)	≥0,05
MMP9 (extensão)*	0,0 (0,0;3,0)	0,0 (0,0;0,0)	0,0 (0,0;0,0)	≥0,05

* **Teste de Kruskal-Wallis com comparações múltiplas de Dunn.** Mediana; valores mínimo e máximo entre parênteses; Dois valores (medianas) seguidos de uma mesma letra não diferem entre si ($P>0,05$).

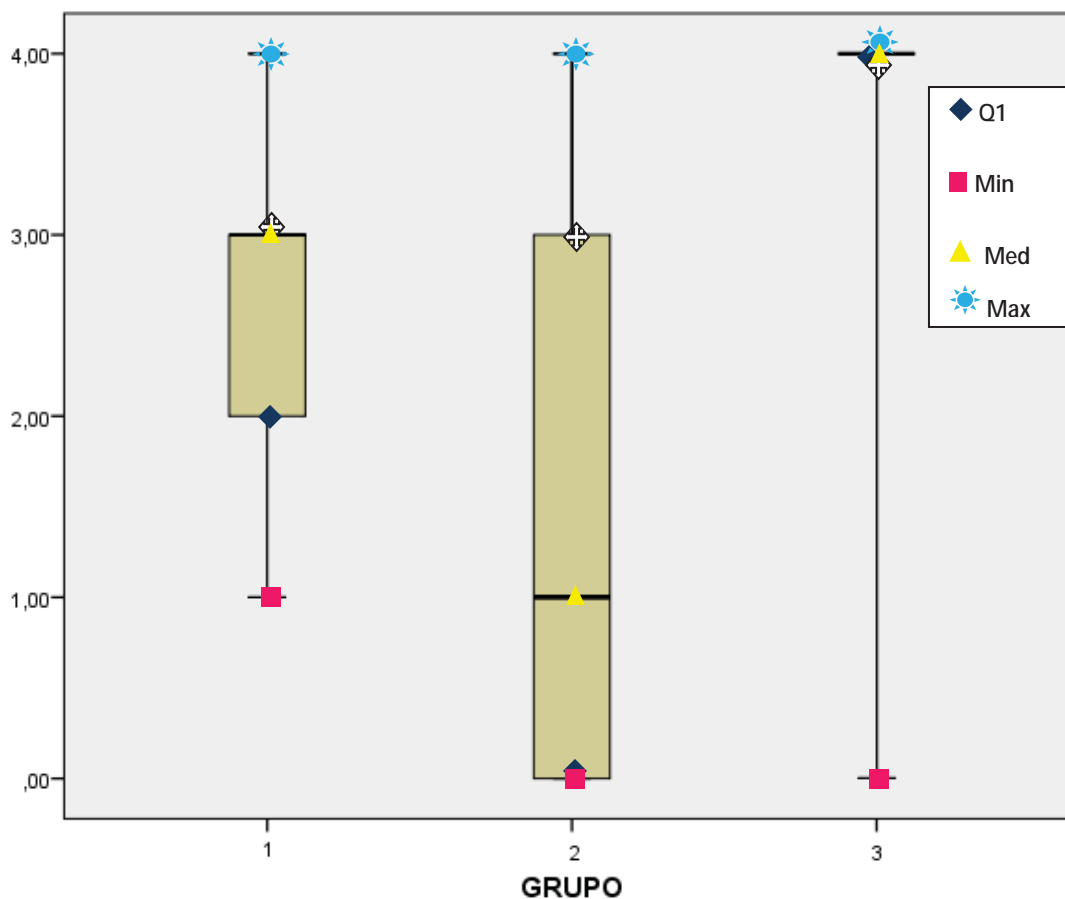


Figura 1. Boxplot da expressão imunohistoquímica do receptor de estrogênio (RE) em função dos grupos. Q1 = primeiro quartil, Min. = valor mínimo, Med. = mediana, Max. = valor máximo, Q3 = terceiro quartil.

Grupo I = pólipos endometriais (n=30 pacientes)

Grupo II = câncer de endométrio (n=30 pacientes)

Grupo III = controle (n=30 pacientes)

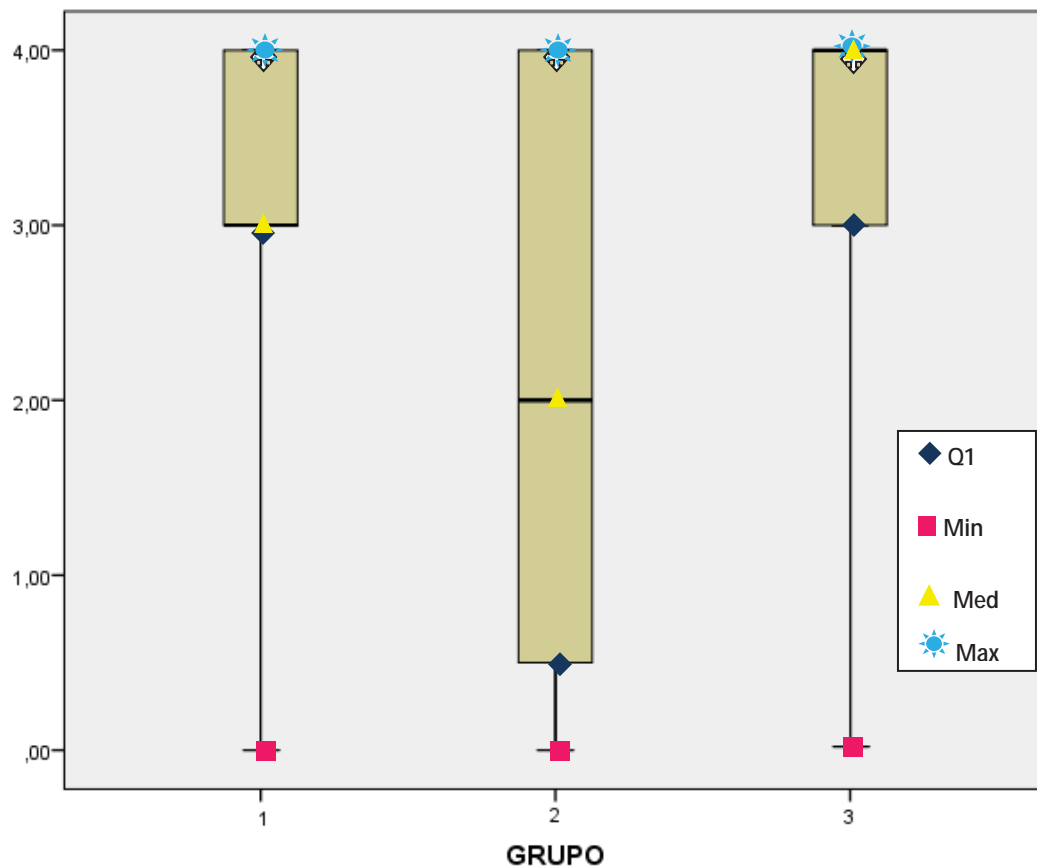


Figura 2. Boxplot da expressão imunoistoquímica do receptor de progesterona (RP) em função dos grupos. Q1 = primeiro quartil, Min. = valor mínimo, Med. = mediana, Max. = valor máximo, Q3 = terceiro quartil.

Grupo I = pólipos endometriais (n=30 pacientes)

Grupo II = câncer de endométrio (n=30 pacientes)

Grupo III = controle (n=30 pacientes)

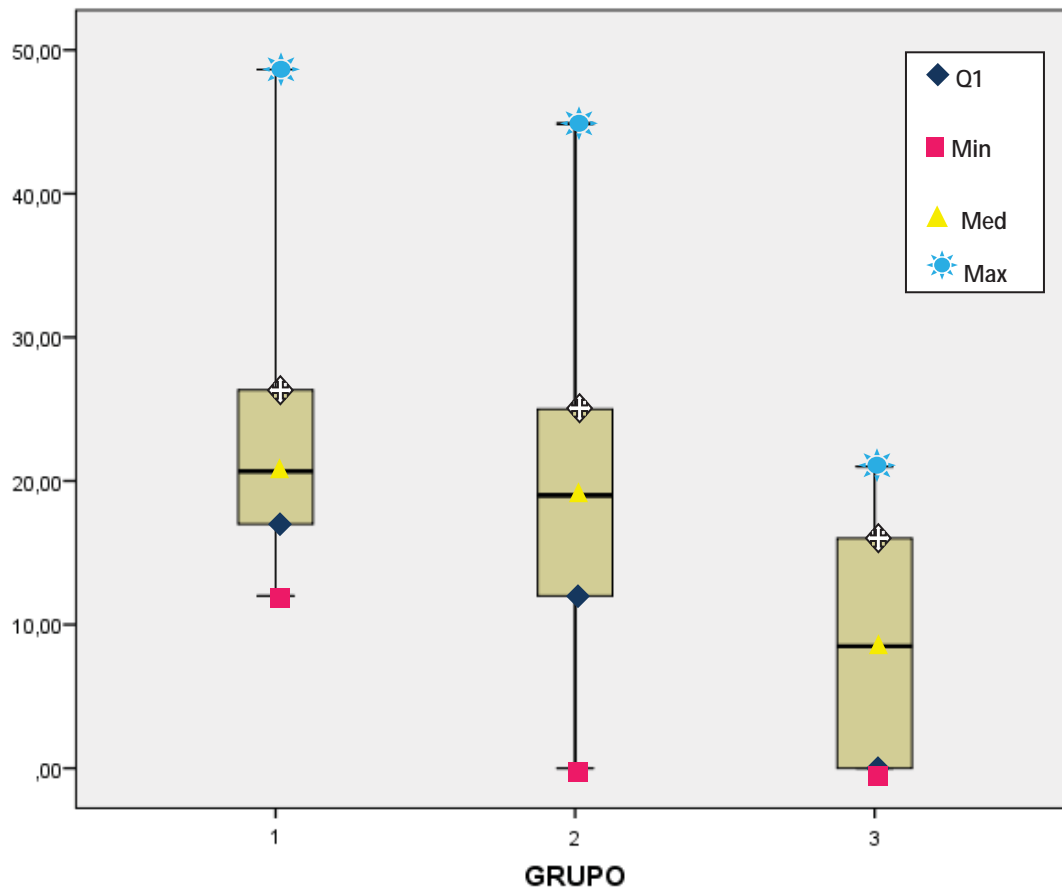


Figura3. Boxplot da expressão imunoistoquímica do marcador endotelial de neoangiogênese (endoglina - CD105) em função dos grupos. Q1 = primeiro quartil, Min. = valor mínimo, Med. = mediana, Max. = valor máximo, Q3 = terceiro quartil.

Grupo I = pólipos endometriais (n=30 pacientes)

Grupo II = câncer de endométrio (n=30 pacientes)

Grupo III = controle (n=30 pacientes)

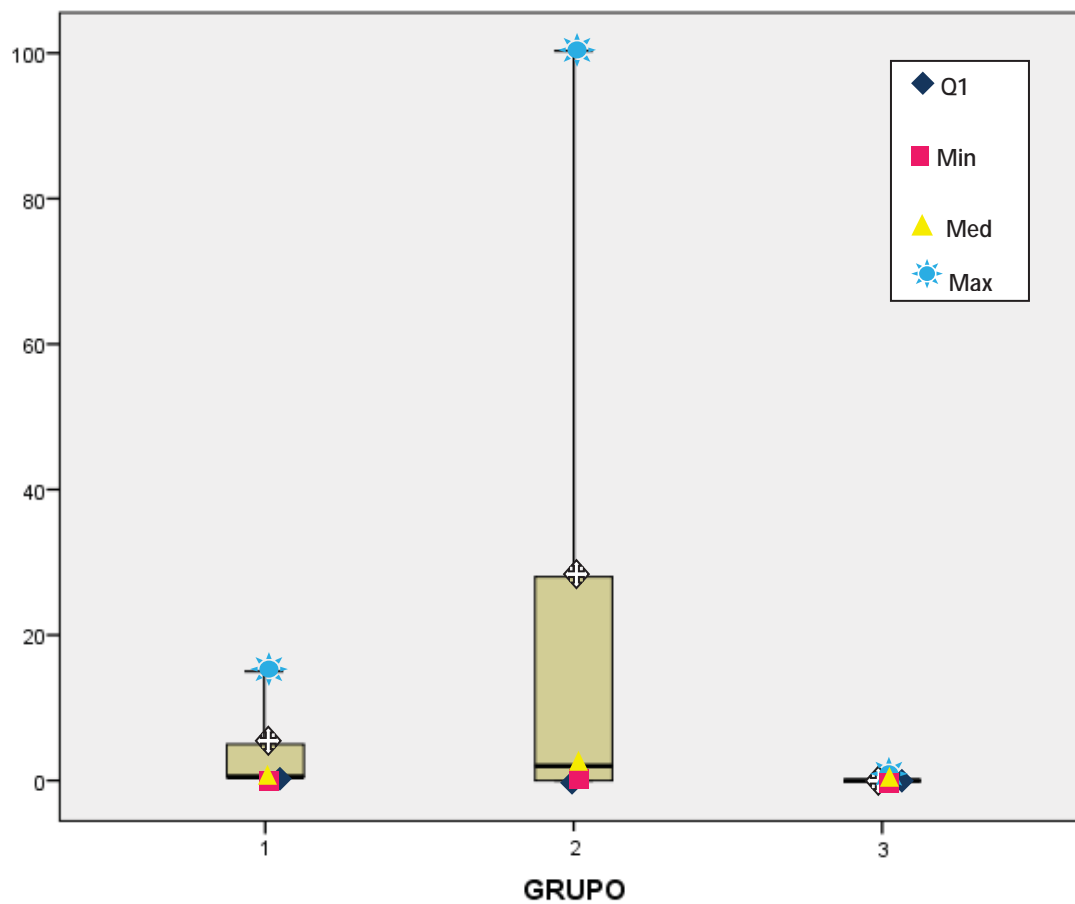


Figura 4. Boxplot da expressão imunoistoquímica do Ki-67 em função dos grupos. Q1 = primeiro quartil, Min. = valor mínimo, Med. = mediana, Max. = valor máximo, Q3 = terceiro quartil.

Grupo I = pólipos endometriais (n=30 pacientes)

Grupo II = câncer de endométrio (n=30 pacientes)

Grupo III = controle (n=30 pacientes)

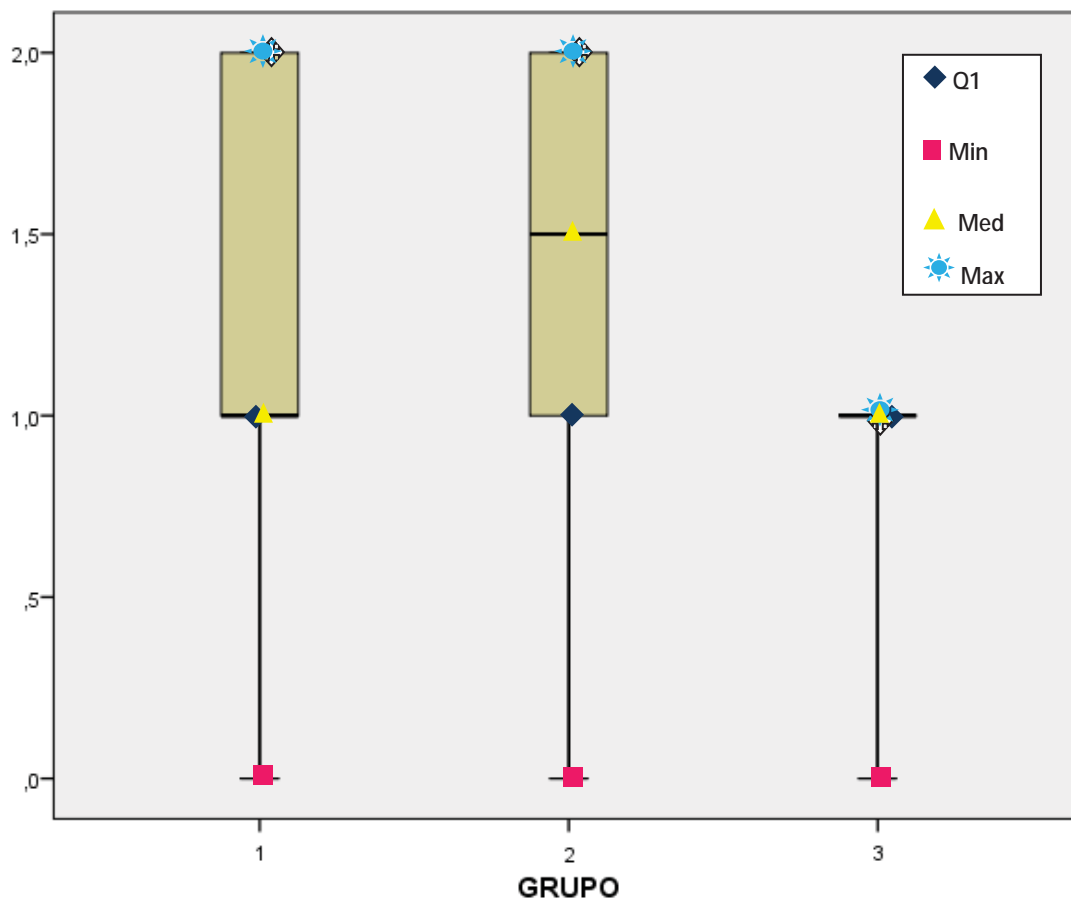


Figura 5. Boxplot da expressão imunohistoquímica do padrão de coloração de membrana da claudina 3 em função dos grupos. Q1 = primeiro quartil, Min. = valor mínimo, Med. = mediana, Max. = valor máximo, Q3 = terceiro quartil.

Grupo I = pólipos endometriais (n=30 pacientes)

Grupo II = câncer de endométrio (n=30 pacientes)

Grupo III = controle (n=30 pacientes)

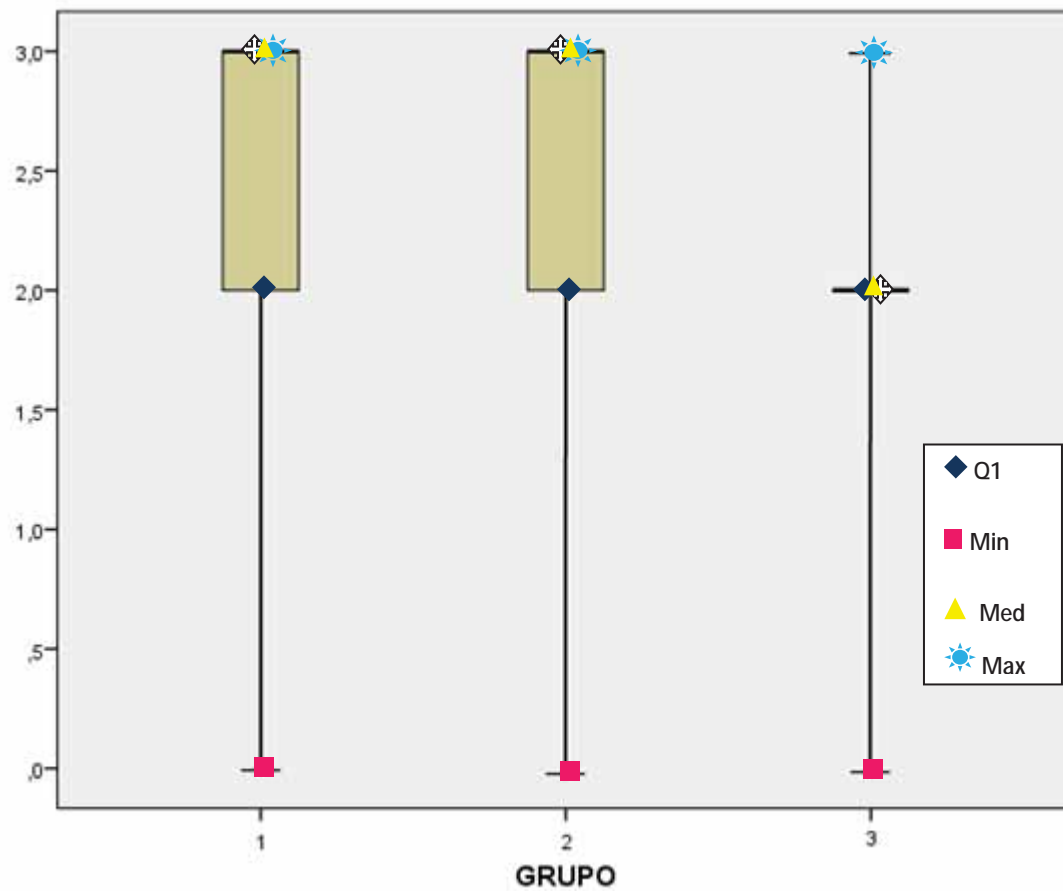


Figura 6. Boxplot da expressão imunohistoquímica da intensidade da marcação de claudina 3 em função dos grupos. Q1 = primeiro quartil, Min. = valor mínimo, Med. = mediana, Max. = valor máximo, Q3 = terceiro quartil.

Grupo I = pólipos endometriais (n=30 pacientes)

Grupo II = câncer de endométrio (n=30 pacientes)

Grupo III = controle (n=30 pacientes)

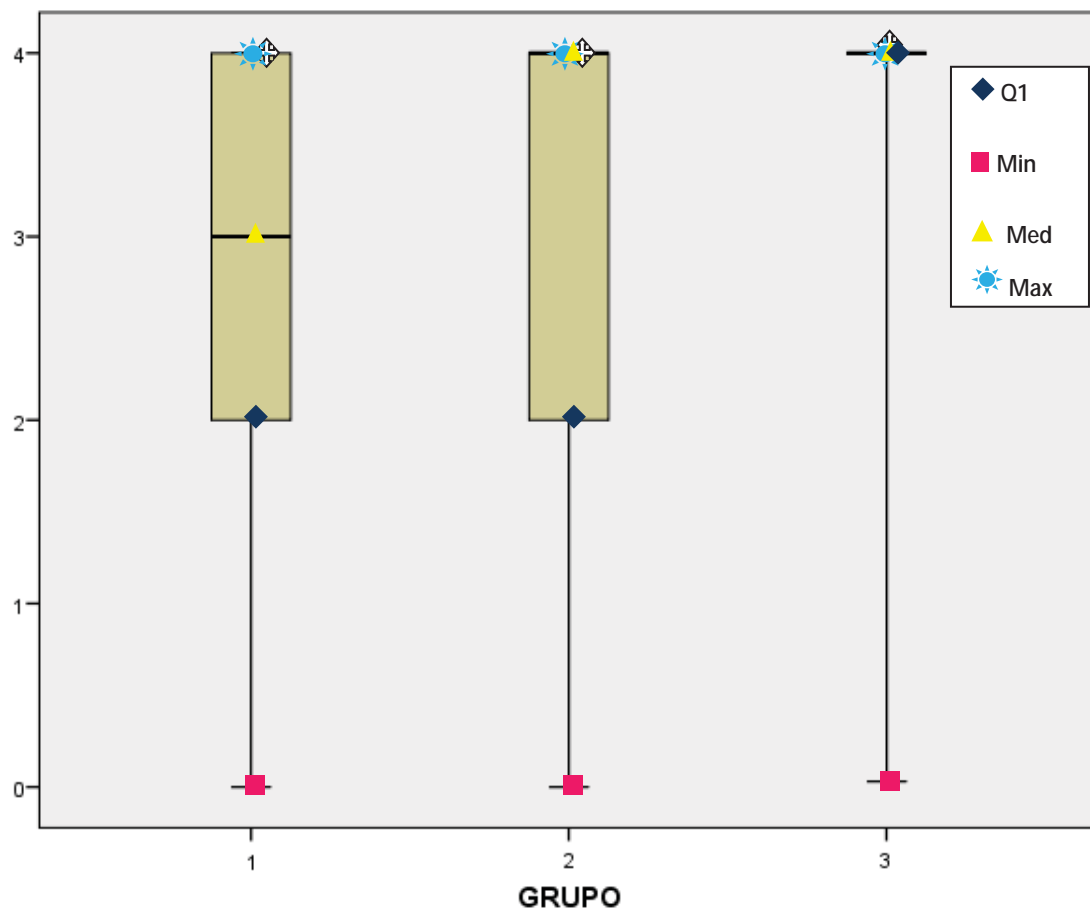


Figura 7. Boxplot da expressão imunohistoquímica da extensão de marcação da claudina 3 em função dos grupos. Q1 = primeiro quartil, Min. = valor mínimo, Med. = mediana, Max. = valor máximo, Q3 = terceiro quartil.

Grupo I= pólipos endometriais (n=30 pacientes)

Grupo II = câncer de endométrio (n=30 pacientes)

Grupo III = controle (n=30 pacientes)

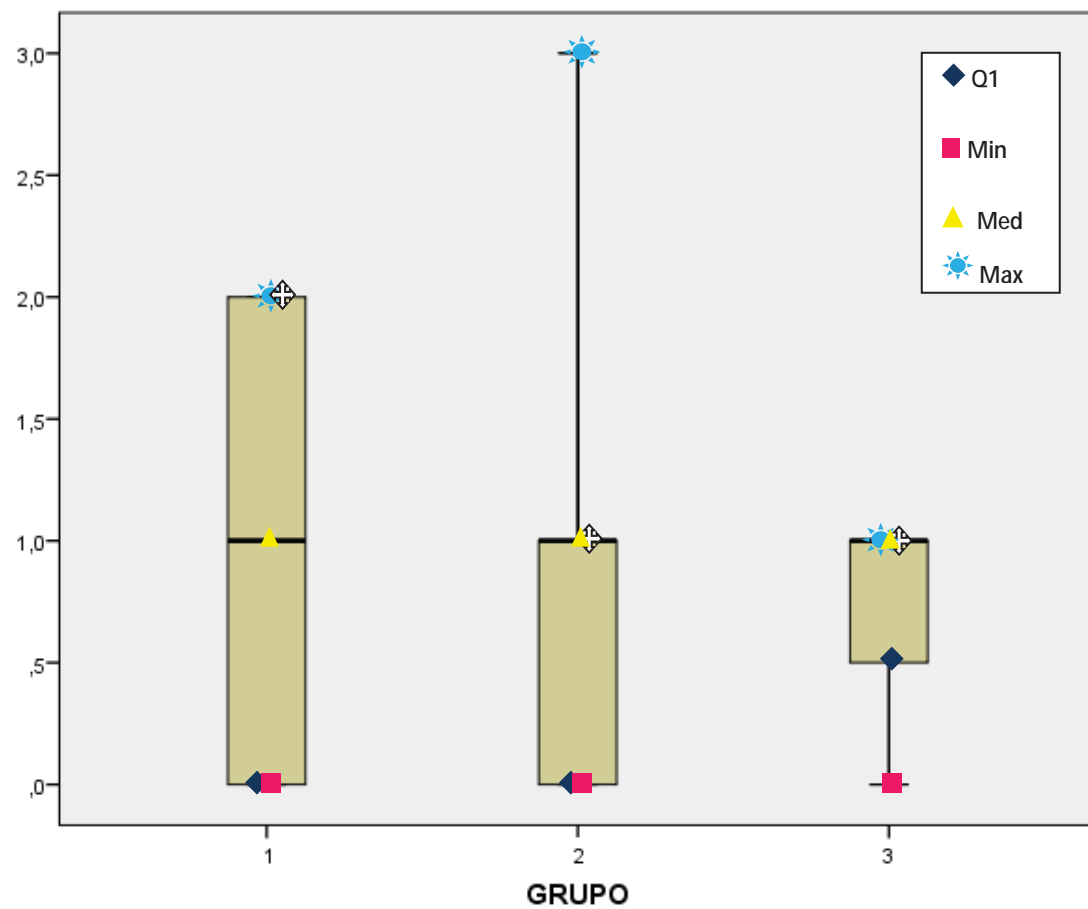


Figura 8. Boxplot da expressão imunohistoquímica do padrão de coloração de membrana da claudina 4 em função dos grupos. Q1 = primeiro quartil, Min. = valor mínimo, Med. = mediana, Max. = valor máximo, Q3 = terceiro quartil.

Grupo I = pólipos endometriais (n=30 pacientes)

Grupo II = câncer de endométrio (n=30 pacientes)

Grupo III = controle (n=30 pacientes)

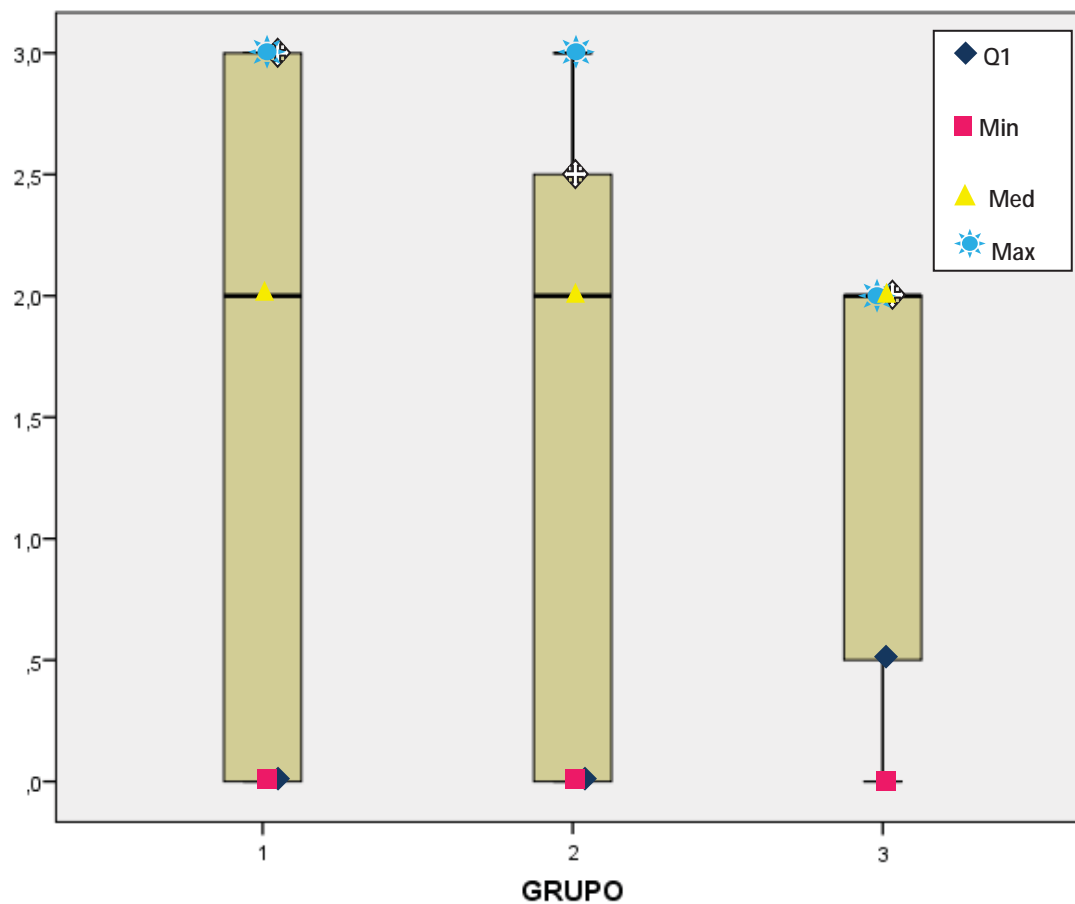


Figura 9. Boxplot da expressão imunoistoquímica da intensidade da marcação de claudina 4 em função dos grupos. Q1 = primeiro quartil, Min. = valor mínimo, Med. = mediana, Max. = valor máximo, Q3 = terceiro quartil.

Grupo I = pólipos endometriais (n=30 pacientes)

Grupo II = câncer de endométrio (n=30 pacientes)

Grupo III = controle (n=30 pacientes)

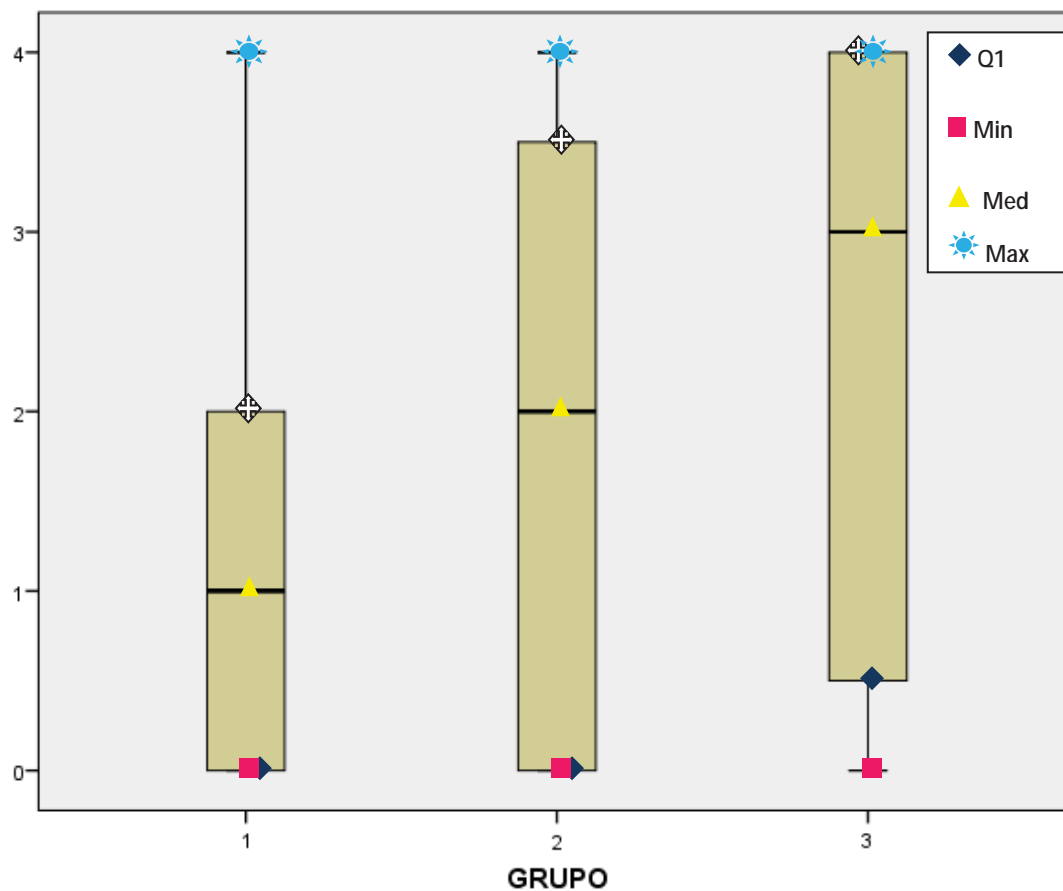


Figura 10. Boxplot da expressão imunohistoquímica da extensão de marcação da claudina 4 em função dos grupos. Q1 = primeiro quartil, Min. = valor mínimo, Med. = mediana, Max. = valor máximo, Q3 = terceiro quartil.

Grupo I = pólipos endometriais (n=30 pacientes)

Grupo II = câncer de endométrio (n=30 pacientes)

Grupo III = controle (n=30 pacientes)



Anexos

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: "Investigação da Evolução dos Pólipos Endometriais em Câncer do Endométrio"

Pesquisador: Rogério Dias

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 15487913.4.0000.5411

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu

Patrocinador Principal: Fundação de Amparo a Pesquisa de São Paulo ((FAPESP))

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 272.637

Data da Relatoria: 15/05/2013

Apresentação do Projeto:

Ver parecer anterior

Objetivo da Pesquisa:

Ver parecer anterior

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Ver parecer anterior

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Ver parecer anterior

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Ver parecer anterior

Recomendações:

Ver parecer anterior

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Os pesquisadores atenderam de forma satisfatória a todos os questionamentos solicitados pelo CEP, estando o presente projeto APROVADO, sem necessidade de envio à CONEP.

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

UF: SP

Município: BOTUCATU

CEP: 18.618-970

Telefone: (14)3880-1608

E-mail: capellup@fmb.unesp.br

FACULDADE DE MEDICINA DE
BOTUCATU -UNESP



Continuação do Parecer: 272.637

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião extraordinária do CEP de 15 de maio de 2013, sem a necessidade de envio à CONEP.

BOTUCATU, 15 de Maio de 2013



Assinador por:
Trajano Sardenberg
(Coordenador)

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1608

CEP: 18.618-970

E-mail: capellup@fmb.unesp.br



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



SOLICITAÇÃO DE DISPENSA DE APLICAÇÃO DE TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, Prof. Adjunto Rogério Dias executor do Projeto de Pesquisa "**Investigação da Evolução dos Polioendometriais em Câncer do Endométrio**", venho por meio deste solicitar a esse Colegiado "**Dispensa de aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**" para realizar a Projeto acima, com a seguinte justificativa:

JUSTIFICATIVA:

Solicito tal dispensa pelo fato das pacientes a serem estudadas já não serem mais acompanhadas neste hospital, muitas moram em cidades distantes ficando difícil a solicitação do consentimento. Algumas já faleceram ficando difícil inclusive o consentimento dos familiares, salientando ainda que muitas mudaram de endereço desde a última consulta.

Botucatu, 13 de maio de 2013

Prof. Adjunto III Rogério Dias
Pesquisador Responsável