

SHELDON RODRIGO BOTOGOSKI¹

SÔNIA MARIA ROLIM ROSA LIMA²

MARIA ANTONIETA LONGO GALVÃO³

PAULO AUGUSTO AYROSA GALVÃO RIBEIRO⁴

SÉRGIO BRUNO HATSCHBACH⁵

JOSÉ CLEMENTE LINHARES⁶

Tsutomu Aoki⁷

Efeitos do tamoxifeno sobre a expressão das proteínas TGF- β e p27 em pólipos e endométrio adjacente de mulheres após a menopausa

Effects of tamoxifen on the expression of TGF- β and p27 proteins in polyps and adjacent endometrium in postmenopausal women

Artigo original

Palavras-chave

Fator transformador de crescimento beta
Pólipos/quimioterapia
Endométrio
Menopausa
Tamoxifeno/uso terapêutico

Keywords

Transforming growth factor beta
Polyps/drug therapy
Endometrium
Menopause
Tamoxifen/therapeutic use

Resumo

OBJETIVO: avaliar os efeitos do uso do tamoxifeno sobre a expressão das proteínas TGF- β e p27 em pólipos e endométrio adjacente de mulheres após a menopausa. **MÉTODOS:** estudo prospectivo, com 30 mulheres, após a menopausa com diagnóstico de câncer de mama, usuárias de tamoxifeno (20 mg/dia), que apresentavam diagnóstico de pólipo endometrial suspeito por meio de ultrassonografia transvaginal, submetidas à histeroscopia diagnóstica e cirúrgica para retirada dos pólipos e do endométrio adjacente. Realizado estudo imunistoquímico para verificar a expressão das proteínas TGF- β e p27 nos pólipos e no endométrio adjacente. A quantificação dessas proteínas foi realizada por morfometria. **RESULTADOS:** a média de idade foi 61,7 anos; média da idade na menopausa, 49,5 anos; e o tempo médio de uso do tamoxifeno, de 25,3 meses. A concentração média de células positivas para proteína TGF- β no pólipo epitélio glandular e estroma foi 62,6 \pm 4,5 células/mm². Para a p27, no pólipo epitélio glandular, foi de 24,2 \pm 18,6 cel/mm² e estroma 19,2 \pm 15,2 cel/mm². Não houve diferença significativa entre a expressão do TGF- β e p27 nos epitélios glandulares dos pólipos e do endométrio adjacente. A expressão das proteínas do pólipo e endométrio adjacente com os seus respectivos epitélios glandular e estromal apresentou diferença significativa para a proteína p27 ($r=0,9$, $p<0,05$). **CONCLUSÕES:** concluímos que a expressão do TGF- β não está relacionada ao efeito do tamoxifeno sobre o crescimento dos pólipos endometriais, mas a ausência de malignização dos pólipos induzida pelo tamoxifeno pode ser explicada pela alta expressão da proteína p27 no seu epitélio glandular.

Abstract

PURPOSE: to evaluate the effects of tamoxifen on the expression of TGF- β and p27 proteins in polyps and adjacent endometrium of women after menopause. **METHODS:** prospective study with 30 post-menopausal women with diagnosis of breast cancer, taking tamoxifen (20 mg/day), presenting diagnosis of suspect endometrial polyps through transvaginal ultrasonography, and submitted to diagnostic and surgical hysterectomy to withdraw the polyps and adjacent endometrium. A immunohistochemical study has been done to verify the expression of the TGF- β and p27 proteins in the polyps and adjacent endometrium. These proteins' quantification has been done by morphometry. **RESULTS:** the patients' average age was 61.7 years old; their average age at the menopause onset was 49.5; and the average of using tamoxifen was 25.3 months. The average concentration of positive cells for TGF- β protein in the glandular and stroma polyp epithelium was 62.6 \pm 4.5 cells/mm². For the p27, in the glandular polyp epithelium, it was 24.2 \pm 18.6 cells/mm² and for the stroma, 19.2 \pm 15.2 cells/mm². There was no significant difference between the expression of TGF- β and p27 in the glandular epithelial form the polyps and the adjacent endometrium. The expression of proteins in the polyp and adjacent endometrium with its respective glandular and stroma epithelium showed a significant difference for the p27 protein ($r=0.9$, $p<0.05$). **CONCLUSIONS:** we have concluded that the TGF- β expression is not related to the effect of tamoxifen on the growing of endometrial polyps, but the absence of polyps' malignization by tamoxifen may be explained by the high expression of p27 protein in its glandular epithelium.

Correspondência:

Sheldon Rodrigo Botogowski
Rua Alferes Angelo Sampaio, 1.278, apto. 901
CEP 80250-120 – Curitiba (PR), Brasil
Fone/Fax: (41) 3642-2752 ou 9917-0022
E-mail: sheldon@centroeurop.eu.com.br

Recebido

7/7/08

Aceito com modificações

16/3/09

Departamento de Ginecologia e Mama do Hospital Erasto Gaertner - HEG - Curitiba (PR), Brasil.

¹ Médico Pesquisador do Departamento de Ginecologia e Mama do Hospital Erasto Gaertner – HEG – Curitiba (PR), Brasil; e Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo – FCMSCSP – São Paulo (SP), Brasil.

² Coordenadora do Ambulatório de Climatério do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo – ISCMSP – São Paulo (SP), Brasil; e Professor Adjunto da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo – FCMSCSP – São Paulo (SP), Brasil.

³ Professora-assistente da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo – FCMSCSP – São Paulo (SP), Brasil.

⁴ Coordenador da Endoscopia do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo – ISCMSP – São Paulo (SP), Brasil; Professor-Assistente da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo – FCMSCSP – São Paulo (SP), Brasil.

⁵ Professor e Chefe do Departamento de Ginecologia e Mama do Hospital Erasto Gaertner – HEG – Curitiba (PR), Brasil.

⁶ Professor e Responsável pela Residência Médica do Departamento de Ginecologia e Mama do Hospital Erasto Gaertner – HEG – Curitiba (PR), Brasil.

⁷ Diretor do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo – ISCMSP – São Paulo (SP), Brasil; e Professor Adjunto da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo – FCMSCSP – São Paulo (SP), Brasil.

Introdução

O tamoxifeno (TMX)¹ é modulador seletivo de receptor de estrogênio utilizado no tratamento adjuvante para mulheres com câncer de mama com receptor de estrogênio positivo², e seu uso foi aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA)³. Caracteriza-se por ser lipídeo solúvel, com difusão livre através da célula e membrana nucleares, ligando-se aos receptores de estrogênio (RE) no núcleo celular e formando um metabólito hidroxilado⁴. Apresenta um efeito antagonista no tecido mamário e agonista nos tecidos ósseo e endometrial⁵. Apesar de indicações precisas e específicas, o TMX apresenta efeitos adversos e, no endométrio, pode ocasionar aumento da incidência de proliferação de pólipos e risco relativo de 1,3-7,5 de neoplasia endometrial. Resultados mais recentes sugerem que mulheres com câncer de mama e alterações genotípicas podem ter uma chance aumentada de desenvolver câncer endometrial quando usuárias de TMX⁶.

Os pólipos que surgem nas mulheres usuárias de TMX são descritos como sendo diferentes daqueles usualmente encontrados no endométrio, por apresentarem características histológicas peculiares, destacando-se a diferenciação epitelial aberrante, atividade proliferativa e condensação estromal focal periglandular⁷.

A reprodução celular ocorre por uma série elaborada de eventos chamada ciclo celular, e a ligação de um fator de crescimento com seus receptores específicos na superfície da célula ou em seu interior inicia o processo de proliferação celular. O fator de crescimento de transformação beta (TGF- β) faz parte de uma família de proteínas diméricas secretadas e estruturalmente relacionadas, que atuam como mediadores locais regulando as funções biológicas das células⁸. Estimula o crescimento celular do tecido mesenquimal, regula a expressão da matriz proteica extracelular, os componentes envolvidos na adesão celular e apresenta potentes efeitos inibidores sobre células epiteliais, tecido linfóide e endotélio⁹. O TGF- β também pode atuar por meio de um mecanismo celular autônomo por ação nas células cancerosas, com promoção de invasão celular e formação de metástases^{10,11}.

Sinais mitogênicos que levam a célula à divisão são controlados por mudanças na concentração intracelular e atividade de dois grupos de proteínas: as ciclinas e as quinases proteicas dependentes das ciclinas (CDK)¹². As ciclinas são uma família de proteínas que têm a característica de ligarem e ativarem as CDK, e estas são um pequeno grupo de enzimas que dependem das mesmas para serem ativadas¹³.

A p27 é membro universal de uma família inibidora das ciclinas-dependentes das quinases. O aumento da p27 leva à inibição de todas as atividades essenciais das CDK, que contribui para paralisar a célula na fase G1

(gap 1) do ciclo e, além disso, a p27 é uma proteína com 27-kDa clonada em fungos e a expressão da proteína está reduzida durante o desenvolvimento e a progressão em alguns tipos de tumor, como: epitelial, linfóide e tecidos endócrinos¹⁴. A expressão da proteína p27 parece ser essencial no controle da proliferação endometrial e sua redução ou ausência parece ser um importante passo na carcinogênese endometrial¹⁵.

Este estudo prospectivo teve como objetivo analisar a expressão das proteínas TGF- β e p27 avaliada por imunistoquímica e morfometria em pólipos e endométrio adjacente de mulheres com câncer de mama usuárias de TMX.

Métodos

Foi desenvolvido um estudo prospectivo, no qual foram incluídas 74 mulheres menopausadas com diagnóstico de câncer de mama. Todas eram usuárias de TMX (20 mg/dia) e apresentavam diagnóstico de pólipo endometrial sugeridos pela ultrassonografia transvaginal (USTV). Essas pacientes foram atendidas no período de abril de 2005 a maio de 2007 no Ambulatório de Mastologia do Hospital Erasto Gaertner (HEG), em Curitiba (PR). Foram excluídas do estudo 19 mulheres por não apresentarem pólipo endometrial confirmado por histeroscopia diagnóstica, cirúrgica e estudo histopatológico; 11 devido à atrofia do canal endocervical, impossibilitando a realização da histeroscopia; 3 devido à presença de características de malignidade no estudo histopatológico do endométrio adjacente e 11 por se recusarem a assinar o termo de consentimento livre e esclarecido. Restaram para análise, portanto, 30 casos. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa do HEG.

A menopausa foi definida como a parada definitiva da menstruação, resultante da perda da atividade folicular ovariana, observada após 12 meses consecutivos de amenorreia e níveis plasmáticos de FSH >30 mUI/mL. Os critérios de inclusão foram: mulheres com tumor maligno de mama primário usuárias de TMX (20 mg/dia), com menopausa confirmada e suspeita de pólipos endometriais pela USTV. Tanto os pólipos endometriais como o endométrio adjacente, retirados por histeroscopia diagnóstica e cirúrgica, deveriam ter o diagnóstico confirmado pelo estudo histopatológico. Os critérios de exclusão foram: mulheres usuárias de terapia hormonal ou inibidores da aromatase ou USTV anormal prévia ao uso do TMX.

Para ultrassonografia, foi utilizado um equipamento marca Hitachi, modelo 405, acoplado a transdutor setorial transvaginal convexo com frequência de 6,5 MHz. Após informações sobre o procedimento, foi realizada a avaliação morfológica do útero, da cavidade e do volume uterinos e da morfologia dos ovários, com medidas dos eixos

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

Para exames histeroscópicos, utilizou-se microcolpo-histeroscópio de Hamou I e II (Storz[®], Germany) constituído por óptica de 4,0 mm de diâmetro, com ângulo de inclinação visual de 30° e camisa de 5,0 mm de diâmetro. Essa camisa possui canal para passagem de meio distensor e cabo de fibra óptica flexível com 6,0 mm de diâmetro e 120 cm de comprimento. O exame consistiu na avaliação da cavidade uterina, das características do endométrio adjacente e no diagnóstico da lesão polipoide pelo aspecto histeroscópico. Os pólipos endometriais e o endométrio adjacente foram obtidos pela ressecção histeroscópica, em ambiente cirúrgico, com anestesia raquidiana e sem uso de antibióticos pós-operatório. Para a ressecção, foi empregado sistema óptico de 5,0 mm de diâmetro e ângulo de inclinação visual de 30°, inserido em elemento de trabalho acoplado à alça diatérmica, que perfaz um diâmetro total de 10 mm. Para a distensão e lavagem contínua da cavidade, foi utilizada solução de manitol a 3% infundido, usando bomba infusora com controle automático de fluxo e pressão intrauterina Endomat, Storz[®], Germany. A pressão variou de 80 a 100 mmHg. A lesão focal foi identificada e completamente removida e, em seguida, foi realizada biópsia do endométrio adjacente, sendo as amostras fixadas em solução de formaldeído tamponado a 10%.

Para o estudo histopatológico, o material em solução de formaldeído foi desidratado em álcool etílico, diafinizado em xilol e embebido em parafina, para confecção dos blocos. Em seguida, foi cortado em micrótomo rotativo de parafina em espessura de 4 μ e corado pela técnica de hematoxilina de Harris e eosina. O tipo histológico do pólipo e do endométrio adjacente foi determinado pela leitura em microscópio óptico da marca Nikon[®], modelo Eclipse E400 (Figura 1). Para diagnóstico anatomopatológico, foram adotados os critérios conforme alterações estromais e glandulares bem estabelecidas na literatura^{16,17}, sendo o diagnóstico firmado por dois patologistas do Serviço de Anatomia Patológica do HEG. No diagnóstico anatomopatológico dos pólipos, as lesões relacionadas ao TMX (tamoxifen-related lesion, TRL) diferem das habituais por serem maiores, com base de implantação larga e aspecto em favo de mel, e o endométrio adjacente difere por apresentar condensação estromal periglandular e aspecto estrelado com metaplasia epitelial e estromal^{16,17}.

Para imunistoquímica, os blocos parafinados foram cortados em micrótomo rotativo de parafina, e os cortes

de 5 μ de espessura foram estendidos em lâminas previamente lavadas em solução sulfocrômica, emulsionadas com adesivo à base de poli-L-lisina (Poly-L-Lysine, Sigma[®], USA, código P8920) a 10% e colocadas em estufa a 60 °C durante 12 horas. Depois de identificadas de acordo com o anticorpo a ser empregado, as lâminas voltaram à estufa a 60 °C durante 20 minutos e, a seguir, foram colocadas em três banhos de xilol e em três banhos de álcool, em concentrações decrescentes de 95, 70 e 50%. Em seguida, a atividade da peroxidase endógena foi bloqueada pela imersão em peróxido de hidrogênio a 3% e metanol a 70% durante 20 minutos.

Conforme os anticorpos, a recuperação antigênica seguiu os procedimentos descritos nas instruções dos fabricantes. As lâminas do anticorpo p27 (diluição 1:250), marca Dako[®] código M7203, foram mergulhadas em tampão citrato de sódio a 0,01 mol com pH igual a 6,0. Em seguida, foram colocadas em câmara de pressão PASCAL[®] com o seguinte protocolo: pressão de 20 a 23 psi e temperatura de 123 °C, durante 20 segundos.

As lâminas do anticorpo TGF- β (diluição 1:100), marca Santa Cruz Biotechnology[®], INC código sc-90, foram tratadas em banho-maria à temperatura de 97,5 °C, durante 40 minutos, e resfriadas em temperatura ambiente, por 20 minutos. Após essa etapa, as lâminas foram lavadas em água destilada e colocadas em tampão PBS pH 7,4 com TWIN 20 (Sigma[®], código P7949). A seguir, os cortes foram circulados por uma caneta hidrofóbica da marca Dako[®], código S2002; para evitar que a solução com o anticorpo diluído escorresse, foram incubadas com bloqueador de proteínas inespecíficas (Dako[®], código X0909) durante 20 minutos, e foi aplicado o anticorpo previamente diluído em solução de PBS-TWIN 20 + BSA a 0,1%. Após 40 minutos de reação em temperatura ambiente, as



Figura 1 - Corte histológico de pólipo endometrial atrófico; observar a glândula endometrial e seu interior sem conteúdo e o estroma demonstrando hipocelularidade com vasos sanguíneos (hematoxilina eosina - 100X).

lâminas receberam os anticorpos (Dako Advance[®], código K4068), e foi adicionado o cromógeno DAB (Dako[®], código K3466). Então, as lâminas foram lavadas em água destilada e contra coradas em hematoxilina de Harris, desidratadas em álcool com concentrações crescentes de 50, 70, 90% e álcool puro, tiveram quatro banhos de xilol e, finalmente, foram montadas com goma de Damar (Proquímios[®]) para fixação das lamínulas e posterior observação ao microscópio óptico (Figuras 2 e 3).

Para o método morfométrico, foram confeccionadas lâminas de cada amostra de pólipo endometrial (duas) e endométrio adjacente (duas), para estudo imunoistoquímico. Cada lâmina preparada pela reação de imunoistoquímica específica foi avaliada por meio de microscópio de luz Axioskop 40, Zeiss, com objetiva de 400 vezes de aumento original, adaptado à microcâmara e ao monitor

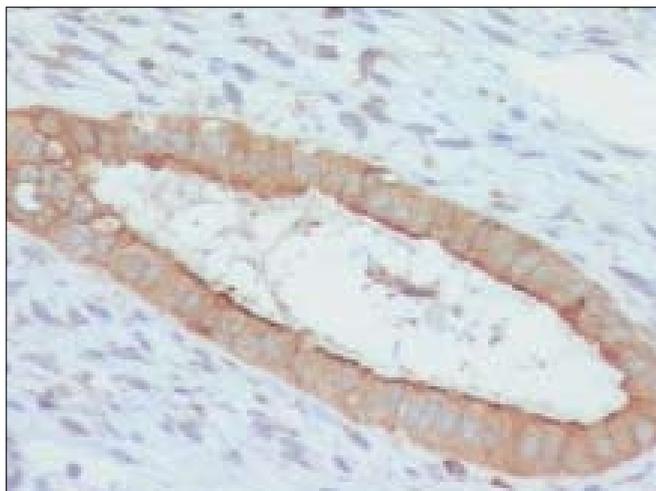


Figura 2 - Corte histológico de pólipo endometrial com expressão da proteína TGF- β no epitélio glandular; observar a coloração marrom sépia da membrana celular e os núcleos não corados (400X).



Figura 3 - Corte histológico com expressão da proteína p27; observar a coloração marrom sépia no núcleo do epitélio glandular, sendo o citoplasma e a membrana celular não corados (400X).

de vídeo (LG Flatron 14'). O cálculo da área em mm² por campos de grande aumento foi feito com auxílio de lâmina espessa de vidro, com área reticulada central. Nesta, cada quadrado apresenta área de 0,0025 mm². Por fim, calculou-se que um campo de grande aumento (400 vezes) corresponde a 0,094 mm². Conhecida a área examinada, foi contado o número de membranas com expressão da proteína TGF- β e o número de núcleos com expressão da proteína p27, por campo de grande aumento, identificados pela coloração marrom sépia. Em cada corte, foram registrados dez campos de leitura em microscópio de luz. A contagem celular foi determinada por área epitelial total definida e expressa como densidade numérica, isto é, o número de células com membranas celulares ou núcleos positivos corados por mm². A contagem das células foi realizada conjuntamente por dois observadores do Serviço de Anatomia Patológica da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo (ISCMSp), desconhecedores da identidade e das características clínicas de cada caso.

Para análise estatística, utilizou-se o programa Microsoft Excel 2003, para arquivamento de informações e contagem de campos (Statistical Package for Social Sciences for Windows, versão 12.0). Para as variáveis descritivas, como idade, tempo de menopausa, idade na menopausa, raça, tempo de uso de TMX, índice de massa corpórea (IMC) e distribuição das células imunocoradas das proteínas TGF- β e p27, foi utilizado o teste *t*, com os resultados expressos em média e desvio padrão (DP). Quanto aos achados ultrassonográficos e histeroscópicos, utilizou-se o teste de proporção simples, com valores expressos em porcentagem. Para a correlação da expressão das proteínas TGF- β e p27 nos epitélios glandulares dos pólipos e do endométrio adjacente, utilizou-se a correlação linear de Pearson; $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Resultados

Observamos que a média de idade dos casos foi de 61,7 \pm 9,2 anos. O tempo transcorrido após a menopausa foi 12,2 \pm 8 anos, em média. A média de idade da menopausa foi de 49,5 \pm 4,5 anos. Da amostra estudada, 29 (96,7%) eram da raça branca e uma (3,3%) era parda. A média do tempo de uso do TMX foi de 25,3 \pm 13,6 meses. O peso variou de 67,3 \pm 10 kg; a altura, 1,63 \pm 7 m; e o IMC, 25,3 \pm 3,5.

Entre as informações obtidas pela USTV, a espessura média do endométrio foi de 15,6 \pm 8,1 mm. A média do volume uterino variou de 104,2 \pm 68,6 cm³; o volume ovariano direito, 2,7 \pm 2,1 cm³; e o volume ovariano esquerdo, 2,4 \pm 1,6 cm³.

Os achados histeroscópicos revelaram que dez (33,4%) eram pólipos com 1,0 cm de diâmetro; sete (23,2%)

eram pólipos com 1,5 cm; cinco (16,7%) com 0,5 cm; três (9,9%) com 3,0 cm; dois (6,7%) com 2,0 cm; dois (6,7%) com 4,0 cm; e um (3,3%) com 3,5 cm. Quanto à localização no endométrio, nove (30%) estavam no fundo uterino, nove (30%) na parede posterior, seis (20%) na parede anterior e seis (20%) na parede lateral direita.

O diagnóstico anatomopatológico dos pólipos retirados por visão direta histeroscópica revelou que 16 (53,3%) eram atróficos, 8 (26,7%) eram atróficos com características de TRL, 4 (13,3%) eram hiperplásicos e 2 (6,7%) funcionais. Quanto ao endométrio adjacente, 11 (36,7%) foram considerados atróficos; 8 (26,7%) eram epitélio TRL; 5 (16,7%), epitélio com atrofia cística; 2 (6,7%), epitélio proliferativo; 1 (3,3%), epitélio secretor; 1 (3,3%), epitélio descamativo; 1 (3,3%), epitélio com hiperplasia simples; e 1 (3,3%), epitélio com hiperplasia complexa.

Observamos que a distribuição de células imunocoradas para proteína TGF- β no pólipo (epitélio glandular e estroma) foi de $62,6 \pm 4,5$ cel/mm² e no endométrio adjacente (epitélio glandular e estroma) foi de $62,1 \pm 12,0$ cel/mm². Para a proteína p27 no epitélio glandular do pólipo, o número foi de $24,2 \pm 18,6$ cel/mm², e no estroma foi $19,2 \pm 15,2$ cel/mm². No endométrio adjacente (glandular), foi $17,7 \pm 18,4$ cel/mm², e no estroma do endométrio adjacente, $13,6 \pm 14,3$ cel/mm².

Quando comparamos a expressão do TGF- β e p27 nos epitélios glandulares dos pólipos e do endométrio adjacente, observamos que não houve diferença significativa na expressão destas proteínas (Tabela 1). No entanto, quando comparamos a expressão de TGF- β e p27 no pólipo e no endométrio adjacente, tanto no epitélio glandular como no estroma, observamos que há uma diferença significativa apenas para a proteína p27 (Tabela 2).

Discussão

Os benefícios da incorporação do TMX no tratamento adjuvante hormonioterápico de mulheres após a menopausa com tumores mamários malignos e RE positivo já não são questionados, mas a relação com as alterações endometriais e o aumento do risco causado por esse medicamento ainda precisam ser definidos.

O TMX apresenta diferentes ações na dependência do tipo de tecido, quantidade e tipo de RE. Assim, no epitélio do tecido mamário, o TMX inibe o crescimento das células cancerosas por competitividade antagonista com o estrogênio e, no endométrio, exerce atividade ora agonista ora antagonista, podendo apresentar, como efeito colateral, estímulo para a proliferação endometrial, com aparecimento de alterações, como pólipos, hiperplasias, carcinomas e sarcomas^{18,19}.

A maior frequência de pólipos endometriais nas mulheres não usuárias de TMX está entre 40 e 50 anos.

A média de idade das usuárias de TMX com pólipos foi de 61,7 anos, o que concorda com o observado em outros estudos^{20,21}.

Sabe-se que diversos métodos são eficazes para investigação da mucosa uterina, como biópsia endometrial, curetagem, histeroscopia, ultrassonografia e histerossonografia. Quando a espessura endometrial medida pela USTV apresenta-se maior que 5 mm ou com alterações focais em mulheres usuárias de TMX após a menopausa, é indicada a investigação por metodologia invasiva^{22,23}. Em nosso estudo, todos os endométrios avaliados pela USTV apresentavam aspecto heterogêneo, e a espessura endometrial variou de $15,6 \pm 8,1$ mm, sendo, portanto, todos os casos submetidos à histeroscopia diagnóstica e cirúrgica.

A atividade endometrial do TMX irá depender da ação de cofatores que, ligando-se ao complexo formado RE-TMX, poderá exercer ação repressora ou ativadora, e este mecanismo de ação está fortemente associado à carcinogênese endometrial. Contudo, o mecanismo molecular que regula de forma negativa a proliferação das células do endométrio não é bem conhecido^{24,25}. Avanços nos estudos do ciclo celular têm revelado que a divisão celular é regulada pela interação entre as ciclinas e ciclinas-dependentes das quinases, dos inibidores das ciclinas-dependentes das quinases e produtos dos genes

Tabela 1 - Distribuição de células marcadas (cel/mm²) e desvio padrão e da expressão das proteínas TGF- β e p27 no epitélio glandular e estromal do pólipo e endométrio adjacente

Parâmetro	Pólipo (cel/mm ²)	Endométrio (cel/mm ²)	Valor de p*	r**
TGF-β				
Epitélio glandular	62,6 (4,5)	62,1 (12,0)	0,1	-0,2
Estroma	62,6 (4,5)	62,1 (12,0)	0,1	-0,2
p27				
Epitélio glandular	24,2 (18,6)	17,7 (18,4)	0,6	-0,0
Estroma	19,2 (15,2)	13,6 (14,3)	0,6	-0,0

cel/mm²=células por milímetro quadrado.

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

Tabela 2 - Distribuição de células marcadas e desvio padrão (cel/mm²) e correlação das proteínas TGF- β e p27 no pólipo e endométrio e o epitélio glandular e estroma.

Parâmetro	Epitélio glandular (cel/mm ²)	Estroma (cel/mm ²)*	Valor de p*	r**
TGF-β				
Pólipo	62,6 (4,5)	62,6 (4,5)		1
Endométrio	62,1 (12,0)	62,1 (12,0)		1
p27				
Pólipo	24,2 (18,6)	19,2 (15,2)	0,0	0,9
Endométrio	17,7 (18,4)	13,6 (14,3)	0,0	0,9

cel/mm²= células por milímetro quadrado.

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

supressores dos tumores^{26,27}. Poucos estudos têm investigado a distribuição das proteínas ligadas ao ciclo celular nos pólipos endometriais e endométrio adjacente em mulheres usuárias de TMX.

Acredita-se que o TGF- β atue por uma via dupla no processo da carcinogênese, com habilidade de inibir a proliferação celular e suprimir o desenvolvimento do tumor nos estágios iniciais. Porém, no curso da progressão tumoral, as células inicializadas adquirem resistência aos fatores inibidores do crescimento mediados pelo TGF- β ^{28,29}. Observamos que o tratamento com o TMX resultou em uma indução de TGF- β , tanto no epitélio glandular do pólipo quanto no seu estroma. No epitélio glandular e no estroma do endométrio adjacente, a proteína TGF- β esteve altamente expressa em ambos os compartimentos estudados. Não se notou diferença significativa quando foram comparados o epitélio glandular do pólipo e do endométrio e o estroma do pólipo e do endométrio.

Estudando útero de ratas ooforectomizadas tratadas com TMX, foi observado que há aumento da expressão do TGF- β tanto no epitélio glandular quanto no estroma, sendo esse aumento mais pronunciado no estroma endometrial³⁰. Em mulheres, observou-se elevação da proteína TGF- β no epitélio glandular do endométrio³¹, fato que pode estar associado a maior incidência de hiperplasias endometriais nas usuárias de TMX. Tais achados foram semelhantes aos nossos, porém não houve correlação entre o epitélio glandular e o estroma do endométrio. Não encontramos na literatura estudo que faça correlação da expressão de TGF- β no pólipo endometrial e endométrio adjacente e usuárias de TMX.

Concentrações teciduais normais da p27 são importantes para o controle da proliferação celular, oposição à progressão tumoral e, quando baixas, estão associadas a pior prognóstico em uma variedade de tumores, incluindo mama, ovários e cérvix. No endométrio, sua redução ou ausência pode ser um importante passo na carcinogênese endometrial^{32,33}. O tratamento com o TMX resultou em expressão celular positiva da proteína p27 no epitélio glandular do pólipo. Quando comparamos somente o epitélio glandular do pólipo com o do endométrio adjacente, não observamos diferença significativa, mas

quando comparamos o epitélio glandular do pólipo com seu estroma e os mesmos tecidos no endométrio adjacente, observamos que houve uma expressão significativamente maior no epitélio glandular do pólipo.

Em estudo com 53 amostras de endométrios de mulheres após a menopausa usuárias de TMX, observou-se que a terapia com o TMX não esteve diretamente envolvida na carcinogênese endometrial, desde que a expressão da proteína p27 esteja normal³⁴. Em outro estudo, foram retirados nove úteros por histerectomia e foram extraídos os leiomiomas e o miométrio adjacente aos mesmos, para realização da avaliação da proteína p27 por imunistoquímica, e foi concluído que a expressão reduzida desta proteína é passo importante no crescimento dos leiomiomas e que a superexpressão ocasiona a morte celular³⁵.

Trabalhos que investigam a patogênese dos pólipos endometriais após a menopausa em mulheres usuárias de TMX são raros na literatura, bem como a metodologia utilizada para o estudo da distribuição da expressão das proteínas por imunistoquímica. Nesse estudo, utilizamos um único parâmetro: o número de células com expressão da proteína TGF- β na membrana ou núcleos corados para a proteína p27 por mm², em vez de se empregar a metodologia de escore para a graduação da coloração. A forma de avaliação empregada diferiu da habitual, que é a porcentagem de células coradas em relação ao total, pelo fato de que esta última técnica necessita controle rigoroso de tempo do tecido no formol, o que não seria possível, em nossa pesquisa.

Concluímos que a expressão do TGF- β não está relacionada ao efeito do TMX sobre o crescimento dos pólipos endometriais, mas a ausência de malignização dos pólipos induzidas pelo TMX pode ser explicada pela alta expressão da proteína p27 no seu epitélio glandular.

Agradecimento

Agradecemos ao Núcleo de Apoio à Publicação da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo (NAP-SC), pelo suporte técnico-científico à publicação desse manuscrito.

Referências

- Jordan VC. The development of tamoxifen for breast cancer therapy: a tribute to the late Arthur L. Walpole. *Breast Cancer Res Treat.* 1988;11(3):197-209.
- Bland AE, Calingaert B, Secord AA, Lee PS, Valea FA, Berchuck A, et al. Relationship between tamoxifen use and high risk endometrial cancer histologic types. *Gynecol Oncol.* 2009;112(1):150-4.
- Haskell SG. Selective estrogen receptor modulators. *South Med J.* 2003;96(5):469-76.
- Polin SA, Ascher SM. The effect of tamoxifen on the genital tract. *Cancer Imaging.* 2008;8:135-45.
- Lindahl B, Andolf E, Ingvar C, Ranstam J, Willén R. Adjuvant tamoxifen in breast cancer patients affects the endometrium by

- time, an effect remaining years after end of treatment and results in an increased frequency of endometrial carcinoma. *Anticancer Res.* 2008;28(2B):1259-62.
6. Chu W, Fyles A, Sellers EM, McCready DR, Murphy J, Pal T, et al. Association between CYP3A4 genotype and risk of endometrial cancer following tamoxifen use. *Carcinogenesis.* 2007;28(10):2139-42.
 7. Gielen SC, Santegoets LA, Hanifi-Moghaddam P, Burger CW, Blok LJ. Signaling by estrogens and tamoxifen in the human endometrium. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2008;109(3-5):219-23.
 8. Rodriguez GC, Rimel BJ, Watkin W, Turbov JM, Barry C, Du H, et al. Progesterin treatment induces apoptosis and modulates transforming growth factor-beta in the uterine endometrium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008;17(3):578-84.
 9. Bachman KE, Park BH. Dual nature of TGF-beta signaling: tumor suppressor vs. tumor promoter. *Curr Opin Oncol.* 2005;17(1):49-54.
 10. Lecanda J, Parekh TV, Gama P, Lin K, Liarski V, Uretsky S, et al. Transforming growth factor-beta, estrogen, and progesterone converge on the regulation of p27Kip1 in the normal and malignant endometrium. *Cancer Res.* 2007;67(3):1007-18.
 11. Muraoka-Cook RS, Dumont N, Arteaga CL. Dual role of transforming growth factor beta in mammary tumorigenesis and metastatic progression. *Clin Cancer Res.* 2005;11(2 Pt 2):937s-43s.
 12. Fujiwara K, Enomoto T, Fujita M, Kanda T, Fujii S, Ito K, et al. Alterations of the K-ras and p53 genes in Tamoxifen-associated endometrial carcinoma. *Oncol Rep.* 2008;19(5):1293-8.
 13. Murray AW. Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell.* 2004;116(2):221-34.
 14. Roy S, Gu M, Ramasamy K, Singh RP, Agarwal C, Siriwardana S, et al. p21/Cip1 and p27/Kip1 are essential molecular targets of inositol hexaphosphate for its antitumor efficacy against prostate cancer. *Cancer Res.* 2009;69(3):1166-73.
 15. Menendez JA, Oza BP, Atlas E, Verma VA, Mehmi I, Lupu R. Inhibition of tumor-associated fatty acid synthase activity antagonizes estradiol- and tamoxifen-induced agonist transactivation of estrogen receptor (ER) in human endometrial adenocarcinoma cells. *Oncogene.* 2004;23(28):4945-58.
 16. Tavassoli FA, Devilee P, editors. World Health Organization classification of tumors: pathology and genetics of tumors of the breast and female genital organs. Lyon: IARC Press; 2003.
 17. Crum CP, Hornstein MD, Stewart EA. Endometrial carcinoma and carcinosarcomas. In: Crum CP, Lee KR, editors. *Diagnostic gynecologic and obstetric pathology.* Philadelphia: WB Saunders; 2006. p. 476.
 18. Garuti G, Grossi F, Centinaio G, Sita G, Nalli G, Luerti M. Pretreatment and prospective assessment of endometrium in menopausal women taking tamoxifen for breast cancer. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2007;132(1):101-6.
 19. Cirpan T, Terek MC, Ulukus M, Ulukus EC, Akman L, Kanit L. Immunohistochemical evaluation of cell proliferation and apoptosis markers in ovaries and uterus of tamoxifen-treated rats. *Int J Gynecol Cancer.* 2008;18(1):141-5.
 20. Garuti G, Cellani F, Centinaio G, Sita G, Nalli G, Luerti M. Baseline endometrial assessment before tamoxifen for breast cancer in asymptomatic menopausal women. *Gynecol Oncol.* 2005;98(1):63-7.
 21. Markovitch O, Tepper R, Fishman A, Aviram R, Cohen I. Aromatase inhibitors reverse tamoxifen induced endometrial ultrasonographic changes in postmenopausal breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2007;101(2):185-90.
 22. Buccoliero AM, Castiglione F, Gheri CF, Garbini F, Fambrini M, Bargelli G, et al. Liquid-based endometrial cytology: its possible value in postmenopausal asymptomatic women. *Int J Gynecol Cancer.* 2007;17(1):182-7.
 23. Capuano I, Caporale A, Vagnetti P, Di Domenico A, Felicetti M, Torella M, et al. [Endometrial ablation versus hysterectomy in women treated with tamoxifen]. *Minerva Ginecol.* 2007;59(5):499-504. Italian.
 24. Dowers TS, Qin ZH, Thatcher GR, Bolton JL. Bioactivation of selective estrogen receptor modulators (SERMs). *Chem Res Toxicol.* 2006;19(9):1125-37.
 25. Ball LJ, Levy N, Zhao X, Griffin C, Tagliaferri M, Cohen I, et al. Cell type- and estrogen receptor-subtype specific regulation of selective estrogen receptor modulator regulatory elements. *Mol Cell Endocrinol.* 2008;299(2):204-11.
 26. Nayak S, Salim S, Luan D, Zai M, Varner JD. A test of highly optimized tolerance reveals fragile cell-cycle mechanisms are molecular targets in clinical cancer trials. *PLoS ONE.* 2008;3(4):e2016.
 27. Pajalunga D, Mazzola A, Salzano AM, Biferi MG, De Luca G, Crescenzi M. Critical requirement for cell cycle inhibitors in sustaining nonproliferative states. *J Cell Biol.* 2007;176(6):807-18.
 28. Tang B, Yoo N, Vu M, Mamura M, Nam JS, Ooshima A, et al. Transforming growth factor-beta can suppress tumorigenesis through effects on the putative cancer stem or early progenitor cell and committed progeny in a breast cancer xenograft model. *Cancer Res.* 2007;67(18):8643-52.
 29. Niimi H, Pardali K, Vanlandewijck M, Heldin CH, Moustakas A. Notch signaling is necessary for epithelial growth arrest by TGF-beta. *J Cell Biol.* 2007;176(5):695-707.
 30. Sartor BM, Sartor O, Flanders KC. Analogous tamoxifen and estrogen effects on transforming growth factor-betas 1 and 2 in the rat uterus. *Reprod Toxicol.* 1995;9(3):225-31.
 31. Carmichael PL, Pole JC, Neven P. Modulation of endometrial transforming growth factor beta (TGFbeta) by tamoxifen. *Eur J Cancer.* 2000;36 Suppl 4:S42-3.
 32. le Sage C, Nagel R, Egan DA, Schrier M, Mesman E, Mangiola A, et al. Regulation of the p27(Kip1) tumor suppressor by miR-221 and miR-222 promotes cancer cell proliferation. *EMBO J.* 2007;26(15):3699-708.
 33. Nিকেleit I, Zender S, Kossatz U, Malek NP. p27kip1: a target for tumor therapies? *Cell Div.* 2007;2:13.
 34. Siufi AA, Cotrim G Da Silva ID, De Cássia M Dardes, Takita LC, Rodrigues De Lima G, Goncalves WJ. Effects of tamoxifen therapy on the expression of p27 protein in the endometrium of women with primary breast cancer. *Int J Oncol.* 2003;24(6):1545-51.
 35. Ramachandran S, Kwon KY, Shin SJ, Kwon SH, Cha SD, Bae I, et al. Cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 controls growth and cell cycle progression in human uterine leiomyoma. *J Korean Med Sci.* 2008;23(4):667-73.