

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DE PORTO ALEGRE – UFCSPA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

Raquel Papandreus Dibi

**Avaliação Imuno-histoquímica de
Pólipos Endometriais em Pós-
Menopáusicas Sintomáticas
Usuárias e não Usuárias de
Tamoxifeno**

UFCSPA
Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

**Porto Alegre
2013**

Raquel Papandreus Dibi

Avaliação Imuno-histoquímica de Pólipos Endometriais em Pós- Menopáusicas Sintomáticas Usuárias e não Usuárias de Tamoxifeno

Tese submetida ao Programa
de Pós-Graduação em
Patologia da Universidade
Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre como requisito
para a obtenção do grau de
Doutora

Orientador: Dr. Gustavo Py Gomes da Silveira
Co-orientador: Claudio Galleano Zettler

**Porto Alegre
2013**

AGRADECIMENTOS

- Ao meu orientador, **Dr Gustavo Py Gomes da Silveira**, e ao meu co-orientador, **Dr Claudio Galleano Zettler**, pela orientação, incentivo, confiança e disponibilidade durante a minha trajetória e realização desta tese. Com certeza foram dois professores indispensáveis na minha decisão de continuar na vida acadêmica. O apoio de vocês nos momentos mais difíceis fez com que eu seguisse acreditando. Muito obrigada, de coração.
- Ao **Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da UFCSPA**, pelo exemplo diário.
- A banca examinadora, professores: **Adriani Galão, Marco Aurélio Pinho de Oliveira, Mirela Foresti Jimenez, Patrícia El Beitune e Sergio Martins-Costa** pela disponibilidade do precioso tempo na leitura e avaliação desta tese. Estou honrada e extremamente agradecida com a participação de todos.
- À **Rosalva Thereza Meurer**, pelo auxílio na realização da parte imuno-histoquímica desta tese.
- A **Marli Chaves** pelo auxílio durante a formatação desta tese.
- Às minhas queridas **Sofia Noskoski** (residente do terceiro ano de GO da UFCSPA) e **Rafaela Vanin Pinto Ribeiro** (acadêmica de medicina da UFRGS), pela amizade e participação neste trabalho.
- A **Josiane Borges** (residente da Patologia da Santa Casa de Porto Alegre) pelo auxílio na análise das lâminas desta tese e participação neste trabalho.
- A minha grande amiga **Carla Vanin**, amiga que eu definiria com tranquilidade como amiga de todas as horas, agradeço imensamente por tudo.
- Ao **Ademar**, pelo amor, pelo companheirismo e auxílio nos momentos necessários.
- Agradeço a minha **família**, pela compreensão, pelo amor e por me fazer entender que família é a base de toda a construção.

Sumário

1. Introdução	6
1.1. Delimitação do Tema de Pesquisa	6
1.2. Justificativa	6
1.3. Pólipos Endometriais	8
1.3.1. Tamoxifeno	18
1.3.2.. Pólipos e Tamoxifeno	22
1.3.3. Marcadores Imuno-histoquímica	26
1.3.4. Receptores Esteróides	27
1.3.5..Bcl-2	30
1.4. Imuno-histoquímica e Tamoxifeno	31
1.5. Câncer de Endométrio	35
1.6. Hiperplasia Endometrial	38
2. Justificativa	40
3. Hipótese Diagnóstica	40
4. Objetivos	40
5. Referências	42
6. Artigo científico redigido em português	57
7. Artigo científico redigido em inglês	74

Lista de abreviaturas utilizadas

IHQ: imuno-histoquímica

RE: receptor de estrogênio

RP: receptor de progesterona

Ca: câncer

1. Introdução

1.1. Delimitação do Tema de Pesquisa

O presente estudo avalia os achados imuno-histoquímicos de pólipos endometriais ressecados por histeroscopia em pacientes pós-menopáusicas sintomáticas usuárias e não usuárias de tamoxifeno. Os marcadores imuno-histoquímicos analisados são receptor de estrogênio, receptor de progesterona, Ki-67 e Bcl-2.

1.2 Justificativa

Os pólipos endometriais são achados comuns na pós-menopausa; porém, sua patogênese ainda não é totalmente conhecida (MCGURGAN, et al, 2006). São mais comumente diagnosticados na quinta década de vida (VAN BOGAERT et al, 1988), ocorrendo em 16 a 54% das mulheres com sangramento pós-menopáusico (ALMEIDA et al, 2004). Menopausa tardia, uso de terapia hormonal (TH) e uso de tamoxifeno são considerados fatores de risco para o desenvolvimento dos pólipos endometriais. Estes, apesar da etiopatogenia desconhecida, são considerados fatores de risco para o câncer de endométrio (RESLOVA et al, 1999).

O papel do estrogênio (E) no desenvolvimento dos pólipos endometriais pode ser confirmado através da avaliação dos receptores celulares. McGurcan e colaboradores (2003) demonstraram que existe

uma expressão maior de receptores de estrogênio (RE) quando comparados aos receptores de progestogênio (RP) expressos no componente estromal dos pólipos endometriais. Apesar destes dados, outros resultados são conflitantes com os achados da literatura, alguns mostrando aumento e outros, diminuição de receptores hormonais nos pólipos do endométrio. Isto se explicaria, em parte, devido às mudanças naturais do endométrio de acordo com o “status” hormonal e também com a metodologia utilizada em cada estudo (BELISARIO et al, 2006). A proliferação e a apoptose celular tem sido quantificada através do uso de marcadores imunoistoquímicos como Ki-67 e Bcl-2. O Ki-67 se expressa exclusivamente em células proliferativas.

No endométrio de mulheres pré-menopáusicas saudáveis, um nível aumentado de estradiol coincide com um aumento na expressão do Ki-67, do receptor de progesterona e do receptor de estrogênio. Pode-se deduzir que o tamoxifeno, devido ao seu efeito agonista no endométrio, induziria um aumento na expressão do Ki67 no epitélio glandular e isto se relacionaria ao status de receptor de estrogênio. Devido ao fato de que agonistas do estrogênio no endométrio podem induzir a expressão do receptor de progesterona, receptores de progesterona podem estar aumentados em usuárias de tamoxifeno (MOURITS et al. 2002). Nestes casos de pré-menopáusicas, a maior expressão do Ki-67 ocorre durante a fase proliferativa; porém, nos pólipos endometriais a expressão do Ki-67 é baixa (RISBERG et al, 2002). Esse estudo foi idealizado porque a patogenia dos pólipos endometriais em pacientes pós- menopáusicas ainda não é totalmente conhecida.

1.3. Pólipos endometriais

Os pólipos endometriais são alterações exofíticas do útero, hormônio-dependentes, caracterizados por uma proliferação do estroma, glândulas e vasos endometriais. O estroma é denso e as glândulas costumam ser tortuosas, irregulares e mais dilatadas que o normal.

São classificados em hiperplásicos/proliferativos, atróficos, adenomiomatosos, mistos endometriais/endocervicais e adenomioma polipoide atípico. Podem ainda apresentar lesões focais como hiperplasias e adenocarcinoma in situ. Essas alterações apresentam baixo potencial de malignização, cuja incidência na literatura é variável. A prevalência dos pólipos endometriais na população geral varia de 9 a 25%; porém, (KUMAN, 1995; ORVIETO, 1999; RESLOVA, 1999; ALMEIDA, 2003; OLIVEIRA, 2003; NOGUEIRA, 2005) é difícil de ser estabelecida, pois pólipos assintomáticos não são investigados e a sensibilidade e especificidade variam conforme o exame diagnóstico realizado. Lo e Yuen (2000) incluíram 1468 pacientes pré e pós-menopáusicas submetidas à histeroscopia e identificaram uma prevalência de 7.1% de pólipos endometriais. Na série de Nagele e cols. (1996) com 2500 pacientes, a prevalência de pólipos foi de 21,2% no sangramento pós-menopáusico e de 10% nos casos de menorragia.

A prevalência de lesões malignas e pré-malignas encontradas em pólipos varia de 0,8% a 4,8% (TABRIZI et al, 2011).

Alguns estudos demonstraram a presença de adenocarcinoma em pólipos endometriais representando uma incidência de 0,8 a 32%.(HILEETO, 2005; GERBAUER et al, 2001)

Uma revisão sistemática de 17 estudos observacionais incluindo mais de 10.000 mulheres demonstrou que a incidência de pólipos malignos ou pré-malignos eram significativamente maior em mulheres pós-menopáusicas comparados a mulheres na pré-menopausa (5.4 versus 1.7%; RR 3.86; 95% IC 2.9–5.1) e com sinal clínico de sangramento (4.2 versus 2.2%; RR 2.0; 95% IC 1.2–3.1) (LEE et al, 2010).

Os fatores de risco para o desenvolvimento de pólipos são muitos, dentre eles: mulheres pós-menopáusicas tratadas com Tamoxifeno (risco de 2 a 36%),(COHEN, 2004; RUNOWICZ, 2011),obesidade (OGUZ, 2005; ONALAN, 2009; RESLOVA, 1999), terapia de reposição hormonal na pós-menopausa – particularmente em regimes com dose elevada de estrogênio e/ou com uma progesterona com baixa atividade antiestrogênica – (OGUZ, 2005; MAIA, 2004) e mulheres com síndrome de Lynch (LÉCURU et al, 2007).

São mais frequentes nas mulheres multíparas, peri-menopáusicas, entre 40 e 50 anos, aumentando progressivamente conforme a idade (CAMPANER et al,2011). Os pólipos são raros antes dos 20 anos, mais comuns na quinta década de vida e tendem a diminuir na menopausa tardia. (STEWART, 2011).

Na pós-menopausa, costumam ser assintomáticos sendo diagnosticados através da ultrassonografia e/ou podem estar associados

a presença de sangramento anormal em torno de um terço dos casos (ORVIETO, 1999; SAVELLI, 2003; GOLDSTEIN, 2002).

A sintomatologia mais comum é o sangramento uterino anormal; porém, parece não haver relação entre os sintomas e o tamanho, a localização e o número de pólipos. A polipectomia resulta na melhora dos sintomas em 75 a 100% das pacientes.

A histeroscopia com visualização direta da cavidade uterina representa importância para o diagnóstico e para o tratamento. O diagnóstico diferencial do pólipo endometrial pode ser feito com a hiperplasia de endométrio, adenocarcinoma polipóide, adenomiomas e adenossarcomas.

A melhor maneira de se realizar a polipectomia é a histeroscópica, principalmente em casos de pólipos menores ou de difícil localização (GEBAUER et al., 2001).

Histologicamente, os pólipos endometriais apresentam mais células proliferativas do que o endométrio normal. O estrogênio (E) e a progesterona (P) são estimuladores da proliferação e diferenciação do tecido endometrial, sendo o número de receptores desses hormônios responsável pelo crescimento estromal. O aumento das células proliferativas encontradas nos pólipos deve-se ao aumento da expressão imunohistoquímica do Ki-67 e, conseqüente, diminuição da apoptose celular, demonstrada pela presença do Bcl-2.

Os pólipos endometriais podem ter uma expressão aumentada de RE, diminuída de RP ou ambos (MITTAL et al, 1996)

Mittal et al (1996) avaliando pólipos em pré menopáusicas e em diferentes fases do ciclo, concluíram que os pólipos resultam de uma diminuição dos RE e P no estroma celular , insensíveis às mudanças do ciclo hormonal percebidas no endométrio adjacente.

Koshiyama et al (1996) avaliaram 33 pacientes pós menopáusicas e encontraram uma diminuição dos RE com o aumento da idade (ARCHER et al, 1991). Belisário et al (2006) não identificaram relação entre a idade e a expressão dos receptores hormonais nos pólipos. Almeida et al (2004) e Belisario et al (2006) identificaram expressão aumentada de RE em pólipos, comparativamente com o endométrio adjacente, sendo que Almeida et al também identificaram uma expressão aumentada dos RP.

Gul et al (2010) identificaram uma diminuição dos RP no estroma do pólipo endometrial e aumento da idade da paciente.

Níveis aumentados de RE e RP nas células glandulares do endométrio suportam a noção de que os receptores são as estruturas mais importantes na resposta hormonal. O significado dos níveis aumentados de RE nas glândulas dos pólipos endometriais poderia justificar o papel dos receptores hormonais na proliferação aumentada e consequente formação dos pólipos endometriais (BELISÁRIO et al, 2006). Em comparação com os pólipos de pós-menopáusicas sem uso de TH, Altaner e colaboradores (2006) encontraram níveis aumentados de Bcl-2 e Ki-67 nos de usuárias de tamoxifeno. Tal achado sugere que pólipos de usuárias de tamoxifeno apresentam um nível aumentado de proliferação

celular e inibição da apoptose, o que poderia favorecer a malignização desses pólipos.

A maioria dos pólipos são benignos; porém, a hiperplasia atípica, assim como o câncer, ocorrem em 3% dos pólipos ressecados de pacientes com sangramento uterino anormal (BEN-ARIE e cols., 2004; KELLY e cols., 2007). Mittal e da Costa (2008) avaliaram 31 pólipos endometriais com adenocarcinoma ou hiperplasia atípica de pacientes que foram submetidas posteriormente à histerectomia. Em 66% dos casos de hiperplasia complexa atípica no pólipo havia hiperplasia complexa atípica ou adenocarcinoma no endométrio e em 90% dos casos de pólipos que continham adenocarcinoma havia hiperplasia complexa atípica ou adenocarcinoma também no endométrio.

Numa série de 766 pacientes com pólipo endometrial, os fatores de risco clínicos para pré-malignidade (3,26%) ou malignidade (0,52%) foram menopausa (RR 4.85; 95% IC, 2.09-11.27), sangramento anormal (RR, 3.97; 95% IC, 1.71-9.18) e diâmetro do pólipo (RR 2.93; 95% IC, 1.191-7.20) (WANG e cols., 2010).

No estudo de Ferrazzi e cols. (2009), com 1152 mulheres assintomáticas e 770 com sangramento na pós-menopausa submetidas à polipectomia histeroscópica, a única variável associada significativamente com histologia anormal foi o diâmetro do pólipo maior que 18 mm nas pacientes assintomáticas (RR 6,9 IC 2,2-21,4).

Em outra revisão sistemática, Lieng e cols. (2010) encontraram uma prevalência de 0,2 a 23,8% de lesões pré-malignas em pólipos, e de 0 a 12,9% de lesão maligna.

Na série de Golan e cols. (2010), de 1.124 pacientes com pólio endometrial, lesões pré-malignas e malignas foram identificadas tanto na pré como na pós-menopausa, bem como em pacientes sintomáticas e em assintomáticas. O autor recomenda a retirada de todos os pólipos identificados.

Há descrição de 13 casos do tipo seroso-papilífero confinados no pólio endometrial, com má evolução (TRAHAN e cols., 2005).

O diagnóstico de pólio endometrial tem se tornado mais frequente. Até então, a curetagem uterina era o método de avaliação da cavidade endometrial, mas como é um método sem visão direta, a detecção de pólipos não era feita em 50-85% dos casos (LOVE et al., 1999; EARLY BREAST CANCER TRIALISTS COLLABORATIVE GROUP, 1998). A relação entre o uso de medicações que agem nos receptores de estrogênio e a ocorrência de pólipos já é bem estabelecida (SENKUS-KONEFKA et al., 2004). No trabalho de Biron-Shental et al (2003), foi detectada a presença de pólio endometrial em 25.9% das pacientes pós-menopáusicas usuárias de tamoxifeno com câncer de mama.

A transformação maligna é relatada em 3-10.7% dos pólipos endometriais detectados nas pós-menopáusicas que fazem uso da medicação (tamoxifeno) (COHEN et al., 2000; COHEN et al., 1999; SCHLESINGER et al., 1998; RAMONDETTA et al., 1999).

Das doenças endometriais, o pólio representa a que mais se associa com o uso do tamoxifeno (COHEN, 2004). Lahti et al (1993) encontraram em seu estudo de caso-controle uma frequência de 36% de pólipos endometriais em pós-menopáusicas usuárias de tamoxifeno. A

freqüência relatada de pólipos endometriais na literatura varia de 5,38 a 36% (NEVEN et al., 1989; LAHTI et al., 1993; COHEN et al., 1995; COHEN et al., 1997; CHENG et al., 1997; MAUGERI et al., 2001; MCGONIGLE et al., 1998; BIRON-SHENTAL et al., 2003; NUOVO et al., 1989; COHEN et al., 2000).

A presença de uma alta expressão de receptores hormonais nas glândulas dos pólipos sugere uma sensibilidade aumentada destas estruturas aos hormônios esteróides, e pode explicar como estruturas polipóides se desenvolvem em níveis baixos de estrogênio com endométrio atrófico adjacente (SENKUS-KONEFKA et al., 2004). O pólipo endometrial é mais encontrado em pós-menopáusicas com câncer de mama e usuárias de tamoxifeno que apresentam sangramento pós-menopáusico do que no grupo de pacientes assintomáticas (BORENSTEIN et al., 1994; COHEN et al., 1999; MARCONI et al., 1997). Independente do status hormonal, alguns autores sugerem que o pólipo endometrial representa um estágio intermediário entre a hiperplasia e o câncer de endométrio (ISMAIL et al., 1994).

O potencial de transformação carcinomatosa de um pólipo endometrial é baixo, porém muitos trabalhos demonstraram que em usuárias de tamoxifeno não é incomum o achado de câncer ou hiperplasia dentro de um pólipo endometrial (NEVEN et al., 1998; COHEN et al., 1999; CECI et al., 2000; RAMONDETTA et al., 1999). Garuti et al (2002), detectaram 36,3% dos casos de hiperplasia e 33,3% dos casos de câncer confinados a um pólipo. Baseados nesses achados, sugerem que os pólipos devem ser diagnosticados em usuárias de tamoxifeno e se

presentes cuidadosamente avaliados. Em relação ao diagnóstico, referem que muitos pólipos não são diagnosticados devido às técnicas às cegas de obtenção endometrial ou devido ao cut-off inadequado utilizado na realização do US TV destas pacientes.

Sintomas (sangramento pós-menopáusico) acontecem em torno de 50% dos casos (DELIGDISCH et al., 2000; COHEN et al., 1999; RAMONDETTA et al., 1999) e, por isso, se recomenda que a ressecção do pólipo seja realizada em pacientes sintomáticas e assintomáticas. Marchesoni et al (2001) consideram os pólipos endometriais um importante estágio intermediário na carcinogênese endometrial relacionada com o tamoxifeno, mesmo na ausência de hiperplasia endometrial. Todos os pólipos endometriais diagnosticados devem ser ressecados. A histeroscopia cirúrgica parece ser a melhor maneira de remover estes pólipos, já que a curetagem pode não removê-los completamente.

Como não se pode excluir patologia maligna em pólipos de pós-menopáusicas usuárias de tamoxifeno assintomáticas por achados ecográficos, recomenda-se a retirada completa do pólipo por histeroscopia cirúrgica e análise anátomo-patológica de todo o material ressecado, já que muitas vezes apenas um foco dentro do pólipo apresenta transformação maligna (TEPPER et al., 1997; COHEN et al., 1999).

Os índices de malignização de pólipos endometriais nas usuárias de tamoxifeno têm se mostrado superior aos índices de não usuárias, embora ainda não se explique o real mecanismo desta transformação

maligna (COHEN, 2004; BIRON-SHENTAL et al., 2003; COHEN et al., 1999). Observa-se que a exposição do endométrio de pós-menopáusicas ao tamoxifeno pode contribuir para a malignização de pólipos endometriais (DELIGDISCH et al., 2000; BERLIERE et al., 1998; RAMONDETTA et al., 1999).

Há na literatura um número pequeno de estudos investigando a patogenia do pólipo endometrial; porém, alguns estudos sugerem que o pólipo se desenvolve devido a um decréscimo no processo da apoptose mais significativo do que o aumento da proliferação celular (BERLIERE et al., 1998; TAYLOR et al., 2003).

Altaner et al (2006) compararam, através de técnicas de imunohistoquímica, pólipos endometriais em pós-menopáusicas usuárias e não usuárias de tamoxifeno. O Bcl-2 (para avaliar apoptose) e o Ki-67 (para avaliar a proliferação celular) foram os marcadores estudados. Encontraram um aumento de Ki-67 e Bcl-2 em pólipos de pós-menopáusicas usuárias de tamoxifeno. Esses achados sugerem que os pólipos endometriais apresentam uma maior proliferação celular e uma inibição da apoptose que pode representar uma via importante na malignização desses pólipos. O epitélio glandular dos pólipos destas pacientes expressou um aumento do Bcl-2 e altos índices mitóticos, resultado que parece refletir o efeito estrogênico do tamoxifeno nos pólipos endometriais.

McGurgan P et al (2006) observaram que o uso do tamoxifeno nas pós-menopáusicas se relaciona com uma diminuição da expressão do RE na glândula e um aumento do RP no estroma do pólipo endometrial. O

tamoxifeno possui, em nível de receptores, um efeito similar no câncer endometrial (JAMIL et al., 1991; VERING et al., 1993).

Schwartz et al (1997) avaliaram 15 usuárias de tamoxifeno e um grupo controle de 8 não-usuárias também pós-menopáusicas. Observaram uma diminuição de expressão do RE no estroma do pólipo endometrial, sendo que no estudo não houve alteração na expressão de receptores de progesterona. Cohen et al (1997) avaliaram 28 pós-menopáusicas usuárias de tamoxifeno com pólipo endometrial e 14 não usuárias e encontraram uma diminuição dos receptores de estrogênio tanto na glândula quanto no estroma dos pólipos de pacientes usuárias de tamoxifeno.

O tamoxifeno não alterou a expressão de Ki-67 no trabalho de McGurgan (2006), mas alterou a apoptose. No contexto de proliferação celular e morte, a exposição do pólipo ao tamoxifeno ocorre com uma baixa proliferação celular e um decréscimo na taxa de apoptose. Esses achados colaboram com a hipótese de que os pólipos endometriais são tumores com alterações no controle da apoptose e o tamoxifeno parece ser um acelerador deste processo. Os resultados de McGurgan corroboram com a hipótese de que o tamoxifeno tem um importante efeito no desenvolvimento de pólipos endometriais, que aparece na imunohistoquímica com o aumento da expressão do Bcl-2.

1.3.1. Tamoxifeno

O tamoxifeno é a droga mais prescrita no tratamento hormonal do câncer de mama. Ele prolonga a sobrevida global e o intervalo livre de doença, diminui a recidiva do câncer na mama contralateral e pode reduzir o risco de desenvolver câncer de mama em mulheres assintomáticas com forte história familiar para câncer de mama (EARLY BREAST CANCER TRIALISTS COLLABORATIVE GROUP, 1992). O mecanismo primário de ação do tamoxifeno, como antiestrogênio, é o antagonismo à molécula do estrogênio nos seus receptores específicos (KARCK et al. 2000; ELKAS et al. 2000). Alguns autores referem que o mecanismo de ação do tamoxifeno é complexo (RODRIGUES et al. 1996; RULLO et al., 1993) e ainda não está bem elucidado. Sua ação poderia ser explicada por diversos efeitos: inibição da calmodulina, estimulação da secreção do fator de crescimento Beta, indução da apoptose, interação com glicoproteína P, inibição da proteína quinase e fosfolipase C, estimulação da ativação da fosfoinositida quinase, influência na expressão do fator-1 de crescimento insulina-like e efeito anti-angiogênico (TREILLEUX et al., 1999; FRIEDMAN 1998; SEOUND et al., 1999; HAGUE et al., 2002).

O tamoxifeno apresenta também uma atividade agonista ao estrogênio, sendo esta atividade a responsável pelos efeitos negativos no trato genital (DANIEL et al., 1996; KAVAK et al., 2000). Sabe-se que os antiestrogênios comportam-se como antagonistas puros ou agonistas/antagonistas parciais, dependendo da espécie animal ou da

célula-alvo, o que dificulta a elucidação do seu mecanismo de ação (GALLO & KAUFMAN, 1997).

Como o seu mecanismo de ação no trato genital não é totalmente elucidado, não se sabe o porquê de, em alguns casos, o tamoxifeno exercer uma função agonista e em outros casos uma função antagonista ao estrogênio no endométrio (DELIGDISCH et al., 2000). Sugere-se que o efeito exercido tenha relação com o nível de estrogênio: em níveis altos, o tamoxifeno atuaria primeiramente como antagonista; já em níveis baixos, atuaria como agonista ao estrogênio (YANG et al., 2001; COHEN et al., 1994). O papel do tamoxifeno na carcinogênese do endométrio ainda não é completamente determinado. Estudos sugerem que o efeito carcinogênico exercido pelo tamoxifeno seja diferente do exercido pelo estrogênio no endométrio (BERGMAN et al., 2000; DANIEL et al., 1996; DECENSI et al., 1996).

O primeiro relato da utilização do tamoxifeno no tratamento do câncer de mama foi o de Cole (COLE et al., 1971). Em 1973, o "Committee on the Safety of Medicines", no Reino Unido, aprovou o tamoxifeno como tratamento adjuvante do câncer de mama e, em 30 de dezembro de 1977, foi aprovado pela "FDA – Food and Drug Administration" para o mesmo fim.

O tamoxifeno foi originalmente selecionado para o uso terapêutico devido à sua eficácia e baixa incidência de efeitos colaterais em relação a outros antiestrogênios não esteróides. Entretanto, alguns autores referiram sua influência na gênese de lesões endometriais, possibilitando, desse modo, maior risco de neoplasia de endométrio (BARAKAT, 1996;

FISHER et al., 1998; MOURITS et al., 2001; NISHIMURA et al., 2001). Sendo o fármaco um composto não esteróide que se liga ao receptor estrogênico e atua tanto como agonista quanto como antagonista do estrógeno, é referido como modulador seletivo do receptor estrogênico (SERM) (WILLET et al., 2000).

Muitas pesquisas são feitas sobre os SERMS, principalmente devido à atividade seletiva que exercem sobre os tecidos (agonista ou antagonista aos esteróides sexuais). O tamoxifeno interage com o receptor intranuclear de estrogênio e promove mudanças na conformação do receptor. Tais mudanças são capazes de inibir o efeito estrogênico ou induzir a transcrição gênica.

O tamoxifeno é um derivado do trifeniletilênico (isômero trans) agonista parcial, com efeito antiestrogênico, facilmente absorvido por via oral (na forma de citrato). É metabolizado pelo citocromo P450 no sistema microsomal hepático, resultando em vários metabólitos. Níveis máximos de tamoxifeno são detectados entre 4 e 7 horas após administração oral de 20 mg da droga. A concentração plasmática média é muito superior ao estradiol (300ng/ml, enquanto que a do estradiol é em média 0,041ng/ml). Sua meia vida de distribuição é de 7 a 14 horas. Sua excreção é lenta e o metabólito n-desmetiltamoxifeno apresenta meia-vida de eliminação de aproximadamente 14 dias, permanecendo no tecido mamário por até 5 meses depois de sua administração.

O principal mecanismo de ação na mama é a competição pelo receptor estrogênico, formando o complexo tamoxifeno-receptor. O tamoxifeno apresenta efeitos estrogênicos parciais sobre outros tecidos,

apesar de agir como antiestrogênico sobre a mama. Sua utilização aumentou o risco relativo para câncer de endométrio (RR 2,53) em mulheres na pós-menopausa e também a incidência de eventos tromboembólicos. Estes efeitos adversos parecem ser dependentes da dose e do tempo (LUCATO et al., 2006).

Por muito tempo, o tamoxifeno foi considerado uma medicação sem efeitos colaterais importantes. Observou-se, porém, que o tamoxifeno se associa com risco aumentado de anormalidades endometriais, como hiperplasias, pólipos e câncer de endométrio. Tendo em vista esses achados, a monitorização do endométrio das pacientes tratadas com tamoxifeno, com o intuito de diagnosticar precocemente essas lesões, foi recomendada, seja por histeroscopia (GONÇALVES et al. 1999; GEBAUER et al., 2001), por ultra-sonografia (FLEISCHER et al., 2001; SYMONDS, 2001) por curetagem uterina ou por biópsia endometrial (SYMONDS, 2001).

Não existe consenso na literatura sobre a ação do tamoxifeno no endométrio de mulheres na pós-menopausa com câncer de mama, bem como sobre a melhor forma de rastreamento das alterações endometriais. Alguns trabalhos na literatura sugerem que períodos longos de administração do tamoxifeno se associam com efeitos colaterais indesejáveis (GAL et al., 1991; CHENG et al., 1997; COHEN et al. 1999; COHEN et al., 2000; WILLEN et al., 1998; NEVEN et al., 1998; MAUGERI et al., 2001; WOLF & JORDAN, 1992) e com uma frequência aumentada de doença endometrial (COHEN et al., 1996). O estudo de Fornander (1989) observou uma incidência de câncer endometrial maior em

pacientes que usaram tamoxifeno por cinco anos em relação a pacientes que usaram por dois anos ($p < 0,01$). Outros trabalhos mostram a associação entre tempo de tratamento e incidência de câncer endometrial (FISHER et al., 1994; VAN LEEUWEN et al., 1994; DELIGDISCH et al., 2000; FOTIOU et al., 2000; RYDEN et al., 1992; CUMMINGS et al., 1993) e de sarcoma uterino (FOTIOU et al., 2000; BERGMAN et al., 2000; LASSET et al., 2001; CECCHINI et al., 1996).

Apesar disso, The American College of Obstetricians and Gynecologists não recomendam screening endometrial de rotina em pacientes com câncer de mama usuárias de tamoxifeno (ACOG COMMITTEE OPINION, 2006).

1.3.2. Pólipos e Tamoxifeno

Alterações do Tamoxifeno no Endométrio

Um dos efeitos colaterais mais importantes do tamoxifeno parece ser o proliferativo no endométrio. Em usuárias de tamoxifeno, a obtenção de tecido endometrial para análise é frequentemente difícil em casos de endométrio espessado ao US (COHEN et al., 1994; LOVE et al., 1999; DIJKHUIZEN et al., 1996; COHEN et al., 1993) - muitas vezes isso se explica pela imagem histeroscópica, usualmente demonstrando um endométrio atrófico. A análise patológica revela frequentemente nesses casos dilatação cística glandular com estroma periglandular condensado e atrofia epitelial (DALLENBACH-HELLWEG et al., 2000; MOURITS et al., 1999; BARAKAT et al., 2000; GERBER et al., 2000; MCGONIGLE et al.,

1998). Essas lesões são chamadas de atrofia glandular cística (LOVE et al., 1999; GERBER et al., 2000). Marchesoni et al (2001) citam em seu trabalho a atrofia cística endometrial como um achado anátomo-patológico muito comum em pacientes pós-menopáusicas tratadas com tamoxifeno. A atrofia endometrial cística é um processo benigno e pode estar relacionada ao efeito estrogênico do tamoxifeno. Este achado explica por que o endométrio pode aparecer anormal ao US transvaginal, apesar de não se detectarem lesões no exame histeroscópico.

Doenças endometriais são vistas em 15 a 61% das pacientes tratadas com tamoxifeno que realizaram biópsia endometrial (HANN et al., 1997). Na maioria dos casos os achados são benignos (DELIGDISCH et al., 2000; LOVE et al., 1999; DIJKHUIZEN et al., 1996; KAVAK et al., 2000; ASCHER et al., 1996). Kedar et al (1994) demonstraram um aumento do risco de hiperplasia atípica em usuárias de tamoxifeno (frequência de 16% no grupo de usuárias de tamoxifeno x 0% no grupo sem tamoxifeno). O risco de desenvolver doenças benignas, semelhante ao risco de desenvolver câncer de endométrio, parece estar relacionado com o tempo de uso do tamoxifeno (OZSENER et al., 1998; LOVE et al., 1999; ZARBO et al., 2000). Zarbo et al. (2000), em estudo prospectivo, acompanharam 219 mulheres com câncer de mama tratadas com tamoxifeno, durante seis anos, e descreveram prevalência de 26,9% de alterações endometriais, representadas principalmente por pólipos e atrofia cística. Achados semelhantes foram descritos em coletânea de 55 ensaios clínicos randomizados (EARLY BREAST CANCER TRIALISTS COLLABORATIVE GROUP, 1998).

Cohen (2004), na revisão que incluiu 106 estudos, demonstrou que a resposta endometrial em pós-menopáusicas ao tamoxifeno é variada, concluindo que as pacientes com câncer de mama que usam tamoxifeno apresentam maior frequência de doença endometrial do que as pacientes que não usam. As alterações endometriais devido ao tamoxifeno podem estar relacionadas com longo tempo de uso da medicação, com altas doses cumulativas de tamoxifeno, com a presença de sangramento vaginal e com a existência de doença endometrial prévia ao tratamento.

Conforme dados da literatura, 2/3 dos casos de câncer de endométrio diagnosticados em pós-menopáusicas com câncer de mama e usuárias de tamoxifeno são pouco diferenciados e com um prognóstico pior do que os casos de câncer de endométrio em não usuárias de tamoxifeno (MIGNOTTE et al., 1998; DELIGDISCH et al., 2000; NAROD et al., 2001; MAGRIPILES et al., 1993; BERGMAN et al., 2000; LASSET et al., 2001; BOUCHARDY et al., 2002). Muitos pesquisadores recomendam que pacientes pós-menopáusicas em uso de tamoxifeno recebam um acompanhamento rígido durante o tratamento, com screening para câncer de endométrio (WILLEN et al., 1998; MAUGERI et al., 2001; MIGNOTTE et al., 1998; FONG et al., 2001; TAYLOR et al., 2000; MENZIN et al., 2000; ASCHER et al., 2000; SUE-BERGMAN et al., 1999), especialmente as pacientes com história prévia de uso de TRH, obesas e usuárias de longo tempo de tamoxifeno (BERGMAN et al., 2000). A grande maioria dos estudos sobre o endométrio de usuárias de tamoxifeno sugere que todas as queixas ginecológicas devem ser consideradas, inclusive dor

pélvica (WICKERHAM et al., 2002) e, principalmente, o sangramento pós-menopáusico.

A indicação de suspender a terapia com tamoxifeno devido à doença uterina é apenas em casos de hiperplasia com atipias ou casos de câncer. A restituição da terapia com tamoxifeno após o tratamento cirúrgico da doença uterina parece ser segura (SENKUS-KONEFKA et al., 2004).

Diversas doenças endometriais, incluindo hiperplasia, pólipos e câncer, foram identificados em 35.5% das pacientes pós menopáusicas com câncer de mama e tratadas com tamoxifeno. A doença endometrial mais comum nestas pacientes é o pólipos endometrial benigno, com 8–36% de incidência. Algumas mulheres tendem a desenvolver pólipos endometriais recorrentes, com uma malignização em torno de 10.7%.

Além de ser considerado um fator de risco para o câncer de endométrio, o tamoxifeno aumenta a incidência de pólipos endometriais, sendo esta a principal doença endometrial relacionada ao uso de tamoxifeno (Cohen, 2004; Dibi et al, 2009). O ACOG recomenda que seja realizado um rastreio com ultrassonografia transvaginal, histerossonografia ou histeroscopia antes do início da terapia com tamoxifeno nas pós menopausicas, e se houver diagnóstico de pólipos endometrial, este dever ser removido antes do início da terapia com tamoxifeno (ACOG, 2006).

1.3.3. Marcadores Imuno-histoquímica

Ki-67

O Ki-67 é um antígeno nuclear encontrado nos núcleos das células durante a fase pré-mitótica da síntese de DNA, sendo um indicador reconhecido de atividade mitótica celular. O aumento de sua expressão é indicativo da elevação mitótica e proliferação das células. Verificando o ciclo menstrual normal, durante a fase proliferativa, sua expressão encontra-se aumentada.

O Ki-67 se expressa em todos os estágios do ciclo celular enquanto as células estão em mitose; porém, não se expressa nas células em repouso. A proliferação celular era considerada um risco para desenvolver neoplasia; porém, recentes estudos correlacionam a apoptose com este risco. Tais achados sugerem que esse marcador esteja interligado com a proliferação dos pólipos endometriais nas mulheres na pós-menopausa.

A exclusiva expressão deste antígeno em células em processo de proliferação faz com que os anticorpos se tornem uma ferramenta inestimável para o estudo da proliferação celular em pesquisa sobre câncer. O anticorpo Ki67 original só pode ser utilizado em tecido fresco ou congelado, uma vez que a fixação reduz ou anula a reação imunohistoquímica.

Este protótipo de anticorpo foi sucedido por outros anticorpos que podem reconhecer a proteína Ki67 em cortes de tecidos

convencionalmente fixados (o mais amplamente utilizado é o MIB-1) (BROWN et al., 2002; ENDL et al., 2000).

No endométrio de mulheres pré-menopáusicas saudáveis, um nível aumentado de estradiol coincide com um aumento na expressão do Ki-67, do receptor de progesterona e do receptor de estrogênio. Pode-se deduzir que o tamoxifeno, devido ao seu efeito agonista no endométrio, induziria a um aumento na expressão do Ki-67 no epitélio glandular e isto se relacionaria ao status de receptor de estrogênio. Devido ao fato de que agonistas do estrogênio no endométrio podem induzir a expressão do receptor de progesterona, esses podem estar aumentados em usuárias de tamoxifeno (MOURITS et al. 2002).

O número de células nucleares positivas para Ki-67 nos pólipos endometriais e no endométrio normal varia de acordo com a fase do ciclo menstrual. Durante a menstruação e no início do ciclo, as percentagens de células positivas no epitélio glandular é menor e possuem uma diferença pouco significativa em ambos, endométrio ou pólipo (RCOG, 2004).

1.3.4. Receptores Esteróides

No início da década de 1960, observou-se primeiramente que os estrogênios radiativamente marcados concentravam-se preferencialmente em órgãos alvos do estrogênio. Esta observação gerou o conceito de “receptor de estrogênio” (JENSEN et al., 2002). Os receptores de estrogênio e os receptores de progesterona pertencem a uma

superfamília de receptores nucleares de hormônios. Essas proteínas receptoras funcionam como fatores de transcrição quando se ligam aos seus receptores ligantes. Esses receptores compartilham uma organização funcional e estrutural comum; seus domínios funcionais foram designados de A-F.

Ao se ligar ao estrogênio, o RE forma homodímeros e liga-se pelo domínio de ligação do DNA (DBD), com alta afinidade em locais específicos, denominados elementos responsivos ao estrogênio (ERE) (KLEIN-HITPASS et al., 1988).

Por meio da ligação do DNA, o RE influencia a expressão dos genes responsivos ao estrogênio, como o RP, importante na sinalização mitogênica e cuja transcrição é estimulada por meio de, pelo menos, dois domínios distintos localizados na região amino-terminal A/B (AF-1) e na região carboxi-terminal E do receptor (AF-2). Essas duas regiões do receptor de estrogênio parecem agir juntas para promover a ativação transcricional completa dos genes responsivos ao estrogênio.

O AF-1 é um domínio de ativação do receptor do estrogênio hormônio independente, enquanto que o AF-2 é hormônio dependente (WEBSTER et al., 1989). Existe uma região no interior do AF-2 que é altamente conservada dentre os receptores nucleares de hormônios, e é composta por resíduos-alvos hidrofóbicos muito importantes para a ativação transcricional hormônio-dependente (DANIELIAN et al., 1992). Um terceiro domínio de ativação foi identificado no receptor de estrogênio humano dentro da porção amino-terminal do AF-2, que tem sido chamado AF2 alfa 23. Esta região possui tanto uma função ativadora transcricional

constitutiva quanto um efeito estimulador em AF-1 (CHAMBRAUD et al., 1990). Tanto o AF-1 quanto o AF-2 são necessários para uma atividade transcricional máxima dos RE na maior parte dos ambientes celulares, mesmo que em certos promotores o AF-1 e o AF-2 possam funcionar de maneira independente (TZUKERMAN et al., 1994).

Algumas pesquisas têm demonstrado que, quando o AF-2 é necessário para a atividade transcricional do RE, os antiestrogênicos como o tamoxifeno atuam como antagonistas puros (BOCQUEL et al., 1989). Entretanto no contexto celular no qual o AF-2 não é necessário e o AF-1 é suficiente para a atividade transcricional, o tamoxifeno pode atuar como agonista parcial (TZUKERMAN et al., 1994; McDONNELL et al., 1995). Assim, os antiestrogênicos podem agir como antagonistas de AF-2 e como agonistas de AF-1. O fato de que os antiestrogênicos interagem de maneira diferente com esses dois domínios transativacionais dependendo do ambiente celular pode explicar porque essas moléculas podem agir tanto como antagonistas no tecido mamário quanto como agonistas de RE no útero.

A técnica padrão para o estudo dos receptores hormonais era a avaliação através de um ligante bioquímico. Atualmente a imuno-histoquímica é considerada o padrão-ouro, pois além de ser aplicável a tecidos fixados em formalina, a tecidos parafinados, existem muitos reagentes disponíveis para a realização da técnica (HAYES, 2000).

A análise imuno-histoquímica pode ser realizada em finas secções de tecido, cortadas a partir de formas fixadas com formalina, parafina ou amostras de biópsias congeladas. Inicialmente são feitas secções de 4 a

5 micra e montadas sobre lâminas cobertas de proteínas. Para aumentar a sensibilidade de detecção, as amostras são primeiramente aquecidas (SHI et al., 1997). As secções são expostas a um anticorpo primário dirigido contra o RE ou ao RP, e então um anticorpo secundário que reconhece o primeiro é adicionado para amplificar o sinal subsequente. As amostras são coradas e contadas e a quantidade de proteínas presentes pode ser observada de forma semi-quantitativa.

Embora a técnica de imuno-histoquímica ofereça inúmeras vantagens, a análise pode possuir algumas desvantagens. Os resultados podem variar substancialmente devido às diferenças na fixação do tecido, modificação do procedimento, tipo de anticorpo utilizado (ELLEGE et al., 1994) e tratamento do antígeno (JACOBS et al., 1996).

O método é semi-subjetivo e a quantificação pode variar de acordo com o observador (Biesterfeld et al., 1996). As células com reação hormonal positiva revelam-se com uma coloração nuclear amarronzada. A melhor maneira de relatar os resultados da análise imuno-histoquímica ainda é discutível (ESTEBAN et al., 1994). Segundo o Consenso de Saint Gallen (2005), é considerado receptor hormonal positivo aquele tumor no qual pelo menos um dos receptores (RE ou RP) apresentar 1% de positividade na técnica de imunoistoquímica.

1.3.5. Bcl-2

O equilíbrio entre a atividade mitótica e a apoptose regula o desenvolvimento endometrial normal no ciclo menstrual. O Bcl-2 é um

proto-oncogene e um membro representativo da família dos genes que está relacionado com o prolongamento da sobrevivência celular, inibindo a apoptose. O Bcl-2 é uma proteína anti apoptótica que inibe a morte celular. Sua expressão é caracterizada no ciclo endometrial normal - durante o ciclo menstrual, a expressão máxima do Bcl-2 ocorre no meio da fase proliferativa e desaparece na fase secretora do ciclo, sugerindo uma regulação feita pelos hormônios esteroides (GOMPEL et al, 1994; TAYLOR et al, 2003; ALTANER et al, 2006).

Estudos recentes confirmaram ser grande a expressão da proteína na hiperplasia simples e complexa. Taylor et al (2003) testaram a hipótese de que os pólipos são um foco de hiperplasia simples, examinando o status do receptor hormonal e dos marcadores de proliferação (Ki-67) e apoptose (Bcl-2) no pólipo em diferentes estágios no ciclo menstrual.

Na fase proliferativa, níveis baixos de apoptose ainda são necessários para manter o funcionamento das células endometriais, podendo haver uma super expressão prolongada do Bcl-2 em uma área focal do endométrio, causando hiperplasia endometrial. A progesterona e o estrogênio influenciam a apoptose das células endometriais e, quando ocorre uma alteração na apoptose celular do endométrio, observamos a seqüência hiperplasia-atipia-adenocarcinoma (ARENDS, 1999).

1.4. Imuno-histoquímica e Tamoxifeno

Os receptores de estrogênio no endométrio de pós-menopáusicas decrescem gradativamente com o aumento da idade (KOSHIYAMA et al.,

1996). In vitro, o tamoxifeno ativa os receptores de estrogênio, causando up-regulation dos RE e RP no endométrio (GORODESKI et al., 1992). Alguns estudos confirmam que durante o uso do tamoxifeno em mulheres com câncer de mama ocorre um aumento no endométrio da expressão de receptores esteróides (KARCK et al., 2000; ELKAS et al., 2000; KOMMOSS et al., 1998) e de marcadores da proliferação celular (ELKAS et al., 2000).

Tregón ML et al (2003) avaliaram a expressão de RE, RP e Ki-67 em pacientes pós-menopáusicas sem diagnóstico de câncer de mama que fizeram uso de tamoxifeno por um curto período de tempo. Encontraram um aumento da expressão dos receptores de estrogênio e do índice de Ki-67 no epitélio glandular das usuárias, comparado com as não usuárias ($p < 0.05$). O aumento na expressão do receptor de progesterona encontrado pelo grupo não foi estatisticamente significativo.

Outros estudos com período mais longo de uso do tamoxifeno demonstraram um aumento expressivo nos receptores de progesterona (ELKAS et al., 2000; SCHWARTZ et al., 1997). Os achados heterogêneos da literatura em relação à expressão de receptores esteróides e Ki-67 no endométrio de pós-menopáusicas podem estar relacionados com o tempo de uso do tamoxifeno, já que a modulação exercida por ele sobre os receptores esteróides e sobre os marcadores de proliferação parece mudar conforme o tempo de uso (TREGÓN et al., 2003).

Até então, muita ênfase era dada ao Ki-67 no processo da carcinogênese celular, pois um aumento da expressão do Ki-67

representava o processo essencial para o desenvolvimento do câncer. Recentemente, têm-se aumentado o interesse pela apoptose celular, vista como um mecanismo fundamental no desenvolvimento do câncer (TAYLOR et al., 2003; IOFFE et al., 1998). Altaner et al (2006) avaliaram o risco de malignização dos pólipos endometriais comparando a expressão do Bcl-2 e do Ki-67 em pós-menopáusicas usuárias e não usuárias de tamoxifeno. O estudo demonstrou aumento da expressão do Bcl-2 e do Ki-67 nos pólipos endometriais das usuárias de tamoxifeno, demonstrando uma inibição da apoptose e um alto índice de mitose celular, sugerindo uma maior chance de transformação maligna desses pólipos endometriais expostos ao tamoxifeno. Esta expressão aumentada do Bcl-2 e do Ki-67 pode refletir o efeito estrogênico do tamoxifeno nos pólipos endometriais.

McGurgan et al (2006) realizaram um estudo em pólipos endometriais de pós-menopáusicas usuárias (com câncer de mama) e não-usuárias de tamoxifeno, considerando os possíveis efeitos do tamoxifeno na expressão dos receptores de estrogênio, receptores de progesterona, Ki-67 e Bcl-2. Observaram que, com o uso do tamoxifeno, houve uma diminuição na expressão dos receptores de estrogênio no epitélio glandular do pólipo endometrial e um aumento da expressão dos receptores de progesterona no estroma. O decréscimo na expressão de receptores de estrogênio no estroma dos pólipos foi descrito por outros autores (SCHWARTZ et al., 1997; COHEN et al., 1997), sendo que Cohen et al (1997) também encontraram uma diminuição dos receptores no

epitélio glandular. Tanto Cohen como Schwartz não encontraram alteração na expressão do receptor de progesterona.

O estudo de McGurgan et al (2006) não encontrou alterações na proliferação celular relacionadas com a exposição ao tamoxifeno (mensurada pelo Ki-67), detectando baixo índice de proliferação celular nos pólipos endometriais das pós-menopáusicas usuárias de tamoxifeno. A detecção do Bcl-2 foi superior neste grupo, mostrando o efeito do tamoxifeno na diminuição da apoptose nos pólipos das usuárias.

Em contraste com a alta expressão de receptores esteróides observada em pólipos endometriais, uma diminuição nos receptores esteróides é um evento precoce na carcinogênese endometrial, sendo que o carcinoma de endométrio geralmente tem um nível mais baixo de receptores esteróides do que o endométrio normal ou hiperplásico (PICKARTZ et al., 1990; LI et al., 1996).

O estudo Mourits et al (2002) avaliou o efeito do tamoxifeno na proliferação e na expressão dos receptores esteróides no endométrio de pacientes pós-menopáusicas. O estudo demonstrou uma proliferação de epitélio endometrial benigno maior (determinada através do MIB-1) no endométrio das usuárias de tamoxifeno, comparado com as não usuárias. No grupo das usuárias de tamoxifeno com câncer endometrial, a percentagem de tumores RE foi de 60%, inferior aos 88% de RE positivo do grupo das não usuárias.

1.5. Câncer de Endométrio

Muitos autores referem uma maior atividade endometrial em pacientes usuárias de tamoxifeno com câncer de mama (LAHTI et al., 1994; CORLEY et al., 1992; RULLO et al., 1993). Estudos mostram um aumento de duas vezes na incidência de câncer endometrial em usuárias de tamoxifeno (FISHER et al., 1994; COOK et al., 1995; KILLACKEY et al., 1995).

O primeiro relato de câncer endometrial em pacientes com câncer de mama usuárias de tamoxifeno foi publicado em 1985. A partir desta publicação, vários outros estudos demonstraram o aumento do risco de desenvolver câncer de endométrio nessas pacientes (FISHER et al., 1994; FORNADER et al., 1993; ANDERSON et al., 1992; VAN LEEUWEN et al., 1994).

Mignotte et al (1998), em um amplo estudo de caso-controle, encontraram uma incidência de carcinoma endometrial em usuárias de tamoxifeno com câncer de mama de aproximadamente 2-3/1000. Em 1996 a “International Agency for Research on Cancer” classificou o tamoxifeno como substância carcinogênica para o endométrio humano (IARC 1996). A coexistência de tumor de mama e endométrio é algumas vezes atribuída aos fatores de risco comuns aos dois tipos de tumores, principalmente a dependência de estrogênio (ADAMI et al., 1997; VAN LEEUWEN et al., 2001).

A associação entre o uso de tamoxifeno por pós-menopáusicas com câncer de mama e o câncer de endométrio já é conhecida, vários

trabalhos demonstram um risco relativo aumentado quando comparadas com não usuárias de tamoxifeno (FORNANDER et al., 1989; MIGNOTTE et al., 1998; DELIGDISCH et al., 2000; NAROD et al., 2001; EARLY BREAST CANCER TRIALISTS COLLABORATIVE GROUP, 1992; CURTIS et al., 1996; CUENCA et al., 1996; KATASE et al., 1998; EARLY BREAST CANCER TRIALISTS COLLABORATIVE GROUP, 1998; COHEN et al., 1999; BERNSTEIN et al., 1999; BERGMAN et al., 2000; LASSET et al., 2001).

Alguns trabalhos na literatura demonstram que o risco de câncer de endométrio aumenta ao longo do tempo de uso do tamoxifeno, com um risco relativo de 1.3 a 7.0.(LAHTI et al., 1993; KEDAR et al., 1994; COHEN et al., 1996; GIBSON et al., 1996). O risco relativo mais alto foi 7.5, observado em pacientes tratadas no trabalho NSABP B-14 (FISHER et al., 1994). Porém, o mesmo grupo (NSABP-06), em outro trabalho, encontrou um RR de 2.2 a 2.3. Tal diferença se justificaria pelo fato de que no NSABP B-14, o grupo controle apresentou um número muito pequeno de casos de câncer de endométrio. O risco de desenvolver câncer de endométrio parece aumentar com o tempo de uso (TREILLEUX et al., 1999; BERGMAN et al., 2000; MIGNOTTE et al., 1998; VAN LEEUWEN et al., 2001; CUENCA et al., 1996; DALLENBACH-HELLWEG et al., 2000; SASCO et al., 1996; BERNSTEIN et al., 1999) e com a dose cumulativa (FORNANDER et al., 1989; FISHER et al., 1994; ANDERSON et al., 1991) do tamoxifeno.

Outras evidências sobre o efeito do tamoxifeno no endométrio foram descritas em importantes ensaios clínicos (CHENG et al., 1997; DE

MUYLDER et al., 1991; COHEN et al., 1997), demonstrando uma razão de chance de 2.4 para desenvolver câncer de endométrio em pacientes tratadas com tamoxifeno ($p=0.0005$) (COHEN et al., 1997).

Muitos estudos sugerem que o comportamento biológico e o prognóstico dos tumores endometriais associados ao tamoxifeno não diferem dos outros tumores endometriais da população (FISHER et al., 1998; FISHER et al., 1994; MIGNOTTE et al., 1998; BARAKAT, 1998). Outros autores referem tumores endometrióides bem diferenciados em usuárias de tamoxifeno (MCGONIGLE et al., 1998; OZSENER et al., 1998). Garuti et al (2002) relataram em seu trabalho casos de adenocarcinoma endometrial G2 e G3 diagnosticados após o tratamento com tamoxifeno, sugerindo que pacientes tratadas com tamoxifeno poderiam apresentar um risco aumentado de desenvolver cânceres mais agressivos.

Outros trabalhos publicados demonstram que os tumores endometriais em usuárias de tamoxifeno são mais indiferenciados e de pior prognóstico, concordantes com os achados de Garuti, além de, na maioria dos casos, serem tumores RE negativo (DELIGDISCH et al., 2000; BERGMAN et al., 2000; DALLENBACH-HELLWEG et al., 2000; MAGRIPLES et al., 1993).

Provavelmente em razão da histologia desfavorável e do estágio do câncer no momento do diagnóstico, a mortalidade por câncer de endométrio é maior em usuárias de tamoxifeno do que em não usuárias (DELIGDISCH et al., 2000; MIGNOTTE et al., 1998; BERGMAN et al.,

2000; MAGRIPLES et al., 1993; NAROD et al., 2001; RAGAZ et al., 1998).

Cohen (2004) conclui em sua revisão sistemática que existem evidências na literatura mostrando a associação entre pacientes pós-menopáusicas com câncer de mama que usam tamoxifeno e câncer endometrial, além de um aumento do risco relativo para câncer de endométrio quando comparado a não usuárias. Na revisão de Cohen, a maioria dos estudos que avaliaram câncer endometrial, relatou casos de câncer de endométrio em pacientes sintomáticas, com longo tempo de uso de tamoxifeno e alta dose cumulativa da medicação (tabela 2). O tipo histológico mais comum foi o endometrióide ou adenocarcinoma.

É estimado que a população de risco para desenvolver câncer endometrial induzido pelo tamoxifeno seja de 406.000 pacientes por ano na população mundial. Dessas, 820 terão câncer de endométrio e 120 morrerão disto (SEOUD et al., 1999).

A redução relativa de mortes 0.002×0.15 (incidência anual de câncer de endométrio em usuárias de tamoxifeno $\times$ mortalidade do ca de endométrio) = 0.0003 ou 0.03% (BARAKAT, 1999), faz com que seja questionável o custo/benefício dos métodos de screening para câncer de endométrio.

1.6. Hiperplasia Endometrial

A taxa de hiperplasia identificada em pós-menopáusicas com câncer de mama e usuárias de tamoxifeno é alta, comparada com

pacientes não usuárias (DANIEL et al., 1996; COHEN et al., 1994; NEVEN et al., 1998; MAUGERI et al., 2001; LAHTI et al., 1993; BORENSTEIN et al., 1994; GIBSON et al., 1996; CHENG et al., 1997; COHEN et al., 1993; EXACOUSTOS et al., 1995; BERTELLI et al., 1998; MCGONIGLE et al., 1996). A hiperplasia endometrial é mais comumente diagnosticada em usuárias de tamoxifeno, sendo mais frequente em pós-menopáusicas com câncer de mama e sintomáticas (SPM) do que nas assintomáticas (COHEN, 2004). Ocorre em 2-30% das pós-menopáusicas usuárias do tamoxifeno (Tabela 3), conforme dados de estudos caso-controle. É sugerido por alguns estudos que pacientes sintomáticas (sangramento uterino anormal) apresentem as maiores incidências de hiperplasia endometrial. Cohen et al (1999) encontrou 35.7% de casos de hiperplasia em pacientes sintomáticas (SPM) e 5.6% em assintomáticas ($p<0.0001$).

Marconi et al (1997), comparando sintomáticas com assintomáticas, encontraram 13% de casos de hiperplasia endometrial em sintomáticas e 7.7% nas assintomáticas.

O estudo de K.F.McGonigle et al (2006) não detectou casos de hiperplasia na sua amostra, os autores atribuem ao fato de que as pacientes do estudo foram avaliadas previamente ao início da terapia com tamoxifeno, todas com histologia endometrial sem alterações. Concluem que, se o endométrio for histologicamente normal previamente ao tratamento, o risco de desenvolver hiperplasia durante o uso do tamoxifeno é muito baixo.

2. Justificativa

Ainda não existe na literatura um consenso sobre a patogênese e o real efeito do tamoxifeno nos receptores hormonais dos pólipos endometriais em pacientes pós- menopáusicas. O uso de tamoxifeno é fator de risco para hiperplasia endometrial, presença de pólipos e Ca de endométrio. Mulheres pós-menopáusicas usuárias de tamoxifeno apresentam pólipos hiperplásicos com maior risco de malignização quando comparadas às não usuárias.

3. Hipótese diagnóstica

Mulheres usuárias de tamoxifeno na pós-menopausa apresentam pólipos com maior expressão de Ki-67 e Bcl-2.

4. Objetivos

4.1. Objetivo principal:

Estudar a patogênese dos pólipos endometriais em pacientes pós-menopáusicas usuárias ou não de Tamoxifeno, através da avaliação da expressão dos receptores hormonais de estrogênio e progesterona e marcadores de proliferação/apoptose (ki-67 e Bcl-2) , através da imuno-histoquímica.

4.2. Objetivos secundários:

1. Correlacionar o tempo de menopausa com a expressão dos receptores hormonais (RE e RP)

5. Referências

1. ACOG Committee Opinion. Tamoxifen and endometrial cancer. Number 336, June 2006. American College of Obstetricians and Gynecologists. *Obstet Gynecol* 2006; 107: 1475– 8.
2. Almeida ECS, Nogueira AA, Reis FJC. Princípios para a conduta em pólipos endometriais. *Femina*. 2003; 30(9):665-7.
3. Almeida ECS, Nogueira AA, Reis FJC, Ramalho LNZ, Zucoloto S. Immunohistochemical expression of estrogen and progesterone receptors in endometrial polyps and adjacent endometrium in postmenopausal women. *Maturitas* 2004; 49:229-33
4. Altaner S, Gucer F, Tokatli F, Guresci S, Ozdemir C, Puyan F, Kutlu K. Tamoxifen-Associated Endometrial Polyps: Comparison with Postmenopausal Polyps *Onkologie* 2006;29:376-380)
5. Archer DF, McIntyre-Seltman K, Wilborn Jr WW, et al. Endometrial morphology in asymptomatic postmenopausal women. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 165:317-20
6. Ascher SM, Johnson JC, Barnes WA, Bae CJ, Patt RH, Zeman RK. MR imaging appearance of the uterus in postmenopausal women receiving tamoxifen therapy for breast cancer: histopathologic correlation. *Radiology* 1996; 200:105–10.
7. Ascher SM, Imaoka I, Lage JM. Tamoxifen-induced uterine abnormalities: the role of imaging. *Radiology* 2000; 214:29– 38.
8. Adami HO, Bergstrom R, Weiderpass E, et al. Risk for endometrial cancer following breast cancer: a prospective study in Sweden. *Cancer Causes Control* 1997; 8:821-7.
9. Andersson M, Storm H, Mouridsen T. Incidence of new primary cancers after adjuvant tamoxifen therapy and radiotherapy for early breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1991;83:1013– 7.
10. Anderson M, Storm HH, Mouridsen HT. Carcinogenic effects of adjuvant tamoxifen treatment and radiotherapy for early breast cancer. *Acta Oncol* 1992; 31:259-63.
11. Arends MJ. Apoptosis in the endometrium. *Histopathology*. 1999; 35(2):174-8.
12. Barakat RR. Tamoxifen and endometrial neoplasia. *Clin Obstet Gynecol* 1996; 39:629-40.
13. Barakat R. Tamoxifen and endometrial cancer: most cancers are early stage and highly curable. *Eur J Cancer* 1998;34 (Suppl 4):5-49-50.

14. Barakat RR. Screening for endometrial cancer in the patient receiving tamoxifen for breast cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17:1967–8.
15. Barakat RR, Gilewski TA, Almadrones L, et al. Effect of adjuvant tamoxifen on the endometrium in women with breast cancer: a prospective study using office endometrial biopsy. *J Clin Oncol* 2000;15:3459-63
16. Belisário M.S.N, Vassallo J, Andrade L.A.L.A, Alvarenga M, Pinto G.A, Monteiro I.M.U. The expression of the hormone receptors in the endometrium and endometrial polyps in postmenopausal women and its relationship to body mass index. *Maturitas* 2006; 53: 114-118
17. Ben-Arie A, Goldchmit C, Laviv Y, et al. The malignant potential of endometrial polyps. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2004; 10;115(2):206-10
18. Bergman L, Beelen ML, Galee MP et al. Risk and prognosis of endometrial cancer after tamoxifen for breast cancer. Comprehensive Cancer Centres'ALERT Group. Assessment of Liver and Endometrial cancer Risk following Tamoxifen. *Lancet* 2000;356:881-7.
19. Berliere M, Charles A, Galant C, et al. Uterine side effects of tamoxifen: a need for systemic pretreatment screening. *Obstet Gynecol* 1998;191:40–4.
20. Bernstein L, Deapen D, Cerhan JR, et al. Tamoxifen therapy for breast cancer and endometrial cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91:1654–62.
21. Bertelli G, Venturini M, Del Mastro L, et al. Tamoxifen and the endometrium: findings of pelvic ultrasound examination and endometrial biopsy in asymptomatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 1998;47:41–6.
22. Biesterfeld S, Veuskens U, Schmitz F-J, et al. Interobserver reproducibility of immunocytochemical estrogen and progesterone receptor status assessment in breast cancer. *Anticancer Res* 1996; 16: 2497.
23. Biron-Shental T, Tepper R, Fishman A, et al. Recurrent endometrial polyps in postmenopausal breast cancer patients on tamoxifen. *Gynecol Oncol* 2003; 90:382-6
24. Blaustein A, Kurman RJ, Blaustein's pathology of the female genital tract. 5th edition. New York: Springer; 2002.
25. Bocquel MT, Kumar V, Stricker C, et al. The contribution of the N- and C-terminal regions of steroid receptors in activation of

transcription is both receptor and cell-specific. *Nucleic Acids Res* 1989; 17: 2581.

26. Borenstein J, Auslender R, Pascal B, et al. Diagnostic pitfalls of ultrasonographic uterine screening in women treated with tamoxifen. *J Reprod Med* 1994; 39:674 – 8.
27. Bouchardy C, Verkooijen HM, Fioretta G, et al. Increased risk of malignant Increased risk of malignant mullerian tumor of the uterus among women with breast cancer treated by tamoxifen. *J Clin Oncol*. 2002;20(21):4403
28. Brown DC et al. Ki-67 protein: the immaculate deception? *Histopathology* 2002; 40, 2-11
29. Campaner AB, Carvalho S, Lima SMRR, et al. Differential expression of estrogen and progesterone receptors in endometrial polyps and adjacent endometrium in postmenopausal women. *Anal Quant Cytol Histol*. 2011; 33(2):61-7
30. Chambraud B, Berry M, Redcuilh G, et al. Several regions of human estrogen receptor are involved in the formation of receptor-heat shock protein 90 complexes. *J Biol Chem* 1990; 265: 20685.
31. Cecchini S, Ciatto S, Bonardi R, Mazzotta A, et al. Screening by ultrasonography for endometrial carcinoma in postmenopausal breast cancer patients under adjuvant tamoxifen. *Gynecol Oncol* 1996;60:409–11.
32. Ceci O, Bettocchi S, Mareello F, et al. Hysteroscopic evaluation of the endometrium in postmenopausal women taking tamoxifen. *J Am Assoc Gynecol Laparosc* 2000;7:185-189.
33. Cheng W-F, Lin H-H, Torng P-L, et al. Comparison of endometrial changes among symptomatic tamoxifen treated and nontreated premenopausal and postmenopausal breast cancer patients. *Gynecol Oncol* 1997; 66:233 – 7.
34. Cohen I, Rosen DJD, Shapira J, et al. Endometrial changes in postmenopausal women treated with tamoxifen for breast cancer. *Br J Obstet Gynaecol* 1993;100:567–70.
35. Cohen I, Rosen DJ, Shapira J, et al. Endometrial changes with tamoxifen: comparison between tamoxifen treated and nontreated asymptomatic postmenopausal breast cancer patients. *Gynecol Oncol* 1994;52:185-90.
36. Cohen I, Altaras MM, Beyth Y. Ultrasonographic evaluation of the endometrium in postmenopausal tamoxifen-treated patients. *Am J Obstet Gynecol*. 1995; 172(3):1067-8
37. Cohen I, Altaras MM, Shapira J, et al. Time-dependent effect of tamoxifen therapy on endometrial pathologies in asymptomatic

- postmenopausal breast cancer patients. *Int J Gynecol Pathol* 1996;15:152–7.
38. Cohen I, Altaras MM, Shapira J, Beyth Y. Different coexisting endometrial histological features in asymptomatic postmenopausal breast cancer patients treated with tamoxifen. *Gynecol Obstet Invest* 1997; 43:60-3.
 39. Cohen I, Azaria R, Fishman A, et al. Endometrial cancer in postmenopausal breast cancer patients with tamoxifen treatment. *Int J Gynecol Pathol* 1999; 18:304–9.
 40. Cohen I, Azaria R, Shapira J, et al. The significance of secondary ultrasonographic endometrial thickening in postmenopausal tamoxifen-treated women. *Cancer* 2000; 94:3101–6.
 41. Cohen I. Endometrial pathologies associated with postmenopausal tamoxifen treatment. *Gynecol Oncol* 2004; 94:256-266.
 42. Cole MP, Jones CTA, Todd IDH. A new anti-estrogenic agent in late breast cancer: an early clinical appraisal of ICI 46474. *Br J Cancer* 1971; 25:270-5.
 43. Consenso de Saint Gallen - Meeting Highlights: International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2005; Oxford Journals Medicine *Annals of Oncology*. 2005; 16:1569-1583.
 44. Cook LS, Weiss NS, Schwartz SM et al. Population-based study of tamoxifen therapy and subsequent ovarian, endometrial and breast cancer. *J Natl cancer Inst* 1995;87:1359-64
 45. Corley D, Rowe J, Curtis MT, et al. Postmenopausal bleeding from unusual endometrium polyps in women on chronic tamoxifen therapy. *Obstet Gynecol* 1992;79:11-116.
 46. Cuenca RE, Giachino J, Arredondo MA, et al. Endometrial carcinoma associated with breast carcinoma. *Cancer* 1996; 77: 2058– 63.
 47. Cummings FJ, Gray R, Tormey DC, et al. Adjuvant tamoxifen versus placebo in elderly women with node-positive breast cancer: long-term follow-up and causes of death. *J Clin Oncol* 1993;11:29–35.
 48. Curtis RE, Boice JD, Shriner DA, et al. Second cancers after adjuvant tamoxifen therapy for breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88:832– 4.
 49. Dallenbach-Hellweg G, Schmidt D, Hellberg P, et al. The endometrium in breast cancer patients on tamoxifen. *Arch Gynecol Obstet* 2000;263:170-7.

50. Daniel Y, Inbar M, Bar-Am A, et al. The effects of tamoxifen treatment on the endometrium. *Fertile steril* 1996;65:1083-9.
51. Danielian PS, White R, Lees JA, et al. Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptor. *EMBO J* 1992; 11: 1025.
52. Decensi A, Fontana V, Bruno S, et al. Effect of tamoxifen on endometrial proliferation. *J Clin Oncol* 1996;14:434-40.
53. De Muylder X, Neven P, De Somer M. Endometrial lesions in patients undergoing tamoxifen therapy. *Int J Gynecol Pathol* 1991; 36:127-9.
54. Deligdisch L, Kalir T, Cohen CJ, et al. Endometrial histopathology in 700 patients treated with tamoxifen for breast cancer. *Gynecol Oncol* 2000;78:181-6.
55. Dibi R P; Zettler C G; da Silveira G P G; et al. Tamoxifen use and endometrial lesions. *Menopause. JCR.* 2009;16:293-300.
56. Dijkhuizen FP, Brolmann HA, Oddens BJ, Roumen RM, Coebergh JW, Heintz AP. Transvaginal ultrasonography and endometrial changes in postmenopausal breast cancer patients receiving tamoxifen. *Maturitas* 1996; 25:45-50.
57. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Systemic treatment of early breast cancer by hormonal, cytotoxic and immune therapy. *Lancet* 1992; 339:1- 15, 71-85.
58. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomized trials. *Lancet* 1998; 351:15451-67.
59. Elkas J, Armstrong A, Pohl J, et al. Modulation of endometrial steroid receptors and growth regulatory genes by tamoxifen. *Obstet Gynecol.* 2000; 95(5):697-703.
60. Elledge RM, Clark GM, Fuqua SAW, et al. p53 protein accumulation detected by five different antibodies: relationship to prognosis and heat shock protein 70 in breast cancer. *Cancer Res* 1994; 54: 3752.
61. Endl E et al. The Ki-67 protein: Fascinating forms and an unknown function. *Exp Cell Res* 2000; 257:231-237
62. Esteban JM, Ahn C, Mehta P, et al. Biologic significance of quantitative estrogen receptor immunohistochemical assay by image analysis in breast cancer. *Am J Clin Pathol*, 1994; vol 102, n2: 158-162
63. Exacoustos C, Zupi E, Cangi B, et al. Endometrial evaluation in postmenopausal breast cancer patients receiving tamoxifen: an

ultrasound color flow Doppler, hysteroscopic and histological study. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 1995; 6(6):435-42.

64. Ferrazzi E, Zupi E, Leone FP, et al. How often are endometrial polyps malignant in asymptomatic postmenopausal women? A multicenter study. *Am J Obstet Gynecol.* 2009; 200(3):235.e1-6.
65. Fisher B, Costantino JP, Redmond CK, et al. Endometrial cancer in tamoxifen-treated breast cancer patients: findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) B-14. *J Natl Cancer Inst* 1994;86:527– 37.
66. Fisher B, Constantino JP, Wickerham DL, et al. Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90:1371-88
67. Fleischer AC, Wheeler JE, Lindsay I, et al. An assessment of the value of the ultrasonographic screening for endometrial disease in postmenopausal women without symptoms. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 184:70-5.
68. Fong K, Kung R, Lytwyn A, et al. Endometrial evaluation with transvaginal US and hysterosonography in asymptomatic postmenopausal women with breast cancer receiving tamoxifen. *Radiology* 2001; 220:765-3.
69. Fornander T, Cedermak B, Mattson A, et al. Adjuvant tamoxifen in early breast cancer: occurrence of new primary cancers. *Lancet* 1989;i:117– 20.
70. Fornander T, Hellstrom AC, Moberger B. Descriptive clinicopathologic study of 17 patients with endometrial cancer during or after adjuvant tamoxifen in early breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85:1850-5.
71. Fotiou S, Hatjefleftheriou G, Kyrousis G, et al. Long-term tamoxifen treatment: a possible etiological factor in the development of uterine carcinosarcoma: two case-reports and review of the literature. *Anticancer Res* 2000;20:2015– 20.
72. Friedman ZY. Recent advances in understanding the molecular mechanisms of tamoxifen action. *Cancer Invest* 1998;16:391-6.
73. Gal D, Kopel S, Bashevkin M. Oncogenic potential of tamoxifen on endometrium of postmenopausal women with breast cancer: a preliminary report. *Gynecol Oncol* 1991;42:120–3.
74. Gallo MA, Kaufman D. Antagonistic and agonistic effects of tamoxifen: significance in human cancer. *Semin Oncol* 1997; 24 Suppl 1:S1-71-S1-80.

75. Gao W, Zhang L, Li W et al. Three-year follow-up results of polypectomy with endometrial ablation in the management of endometrial polyps associated with tamoxifen in Chinese women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2012; 161(1):62-5.
76. Garuti G, Grossi F, Cellani F, et al: Hysteroscopic assessment of menopausal breast-cancer patients taking tamoxifen; there is a bias from the mode of endometrial sampling in estimating endometrial morbidity? *Breast Cancer Research and Treatment* 2002; 72:245-253.
77. Gebauer G, Hafner A, Siebzehnruhl E, Lang N. Role of hysteroscopy in detection and extraction of endometrial polyps: results of a prospective study. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 184:59-63.
78. Gerber B, Krause A, Muller H, et al. Effects of adjuvant tamoxifen on the endometrium in postmenopausal women with breast cancer: a prospective long-term study using transvaginal ultrasound. *J Clin Oncol* 2000; 18:3464–70.
79. Gibson LE, Barakat RR, Venkatraman ES. Endometrial pathology at dilatation and curettage in breast cancer patients: comparison of tamoxifen users and non-users. *Cancer J* 1996; 2:35– 8.
80. Golan A, Cohen-Sahar B, Keidar R, et al. Endometrial polyps: symptomatology, menopausal status and malignancy. *Gynecol Obstet Invest.* 2010;70(2):107-12.
81. Gompel A, Sabourin JC, Martin A, et al. Bcl-2 expression in normal endometrium during the menstrual cycle. *Am J Pathol* 1994;144(6):1195-202
82. Gonçalves MA, Gonçalves WJ, Matias MM, et al. Hysteroscopic evaluation of the endometrium of post-menopausal patients with breast cancer before and after tamoxifen use. *Int J Gynaecol Obstet* 1999; 66:273-9.
83. Gorodeski GI, Beery R. Tamoxifen increases plasma oestrogen binding equivalents and has an oestradiol agonistic effect on histologically normal pre-menopausal and post-menopausal endometrium. *Fertil Steril* 1992; 57(2):320-7.
84. Gul A, Ugur M, Iskender C, et al. Immunohistochemical expression of estrogen and progesterone receptors in endometrial polyps and its relationship to clinical parameters. *Arch Gynecol Obstet* (2010) 281:479-483
85. Hann LE, Geiss CS, Bach AM, et al. Endometrial thickness in tamoxifen-treated patients: correlation with clinical and pathologic findings. *AJR* 1997; 168:657– 61.

86. Hague S, Manek S, Oehler MK, et al. Tamoxifen induction of angiogenic factor expression in endometrium. *Br J Cancer* 2002; 86:761-7.
87. Hayes DT. Do We need prognostic factors in nodal-negative breast cancer? *Eur J cancer*, 2000; vol36, n 3:302-306.
88. Hileeto D, Fadare O, Martel M, Zheng W. Age dependent association of endometrial polyps with increased risk of cancer involvement. *World J Surg Oncol*. 2005 Feb 9;3(1):8.
89. IARC. Some pharmaceutical drugs. Lyon, France; IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum 1996; 66:253-65.
90. Ioffe OB, Papadimitriou JC, Drachenberg CB: Correlation of proliferation indices, apoptosis and related oncogene expression (bcl-2 and c-erbB-2) and p53 in proliferative, hyperplastic and malignant endometrium. *Hum Pathol* 1998;29:1150-9.
91. Ismail SM. Pathology of endometrium treated with tamoxifen. *J Clin Pathol* 1994; 47:827 – 33.
92. Jacobs TW, Prioleau JE, Stillman IE, et al. Loss of turner marker-immunostaining intensity on stored paraffin slides of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 1054.
93. Jamil A, Croxtall JD, White JO. The effect of anti-oestrogens on cell growth and progesterone receptor concentration in human endometrial cancer cell lines (Ishikawa). *J Mol Endocrinol* 1991;6:215-21.
94. Jensen EV, Jacobson HI. Basic guides to the mechanism of estrogen action. *Recent Prog Horm Res* 1962; 18: 387.
95. Karck U, Kommoss F. Does tamoxifen change oestrogen and progesterone receptor expression in the endometrium and breast? *Eur J Cancer* 2000; 36 Suppl 4:S45-6.
96. Katase K, Sugiyama Y, Hasumi K, et al. The incidence of subsequent endometrial carcinoma with tamoxifen use in patients with primary breast carcinoma. *Cancer* 1998; 82:1698–703.
97. Kavak ZN, Binoz S, Ceyhan N, et al. The effect of tamoxifen on the endometrium, serum lipids and hypothalamus pituitary axis in the postmenopausal breast cancer patients. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2000;86:761-7.
98. Kedar RP, Bourne TH, Powels TJ, et al. Effects of tamoxifen on uterus and ovaries of postmenopausal women in a randomized breast cancer prevention trial. *Lancet* 1994; 343:1318– 21.
99. Kelly P, Dobbs SP, McCluggage WG. Endometrial hyperplasia involving endometrial polyps: report of a series and discussion of

- the significance in an endometrial biopsy specimen. *BJOG*. 2007; 114(8):944-50
100. Killackey MA, Hakes TB, Pierce VK. Endometrial adenocarcinoma in breast cancer patients receiving antiestrogens. *Cancer Treat Rep*. 1985; 69(2):237-8
 101. Klein-Hitpass L, Ryffel GU, Heitlinger E, et al. A 13bp palindrome is a functional estrogen responsive element and interacts specifically with estrogen receptor. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 647.
 102. Kommoss F, Karck U, Prompeler H, et al. Steroid receptor expression in endometria from women treated with tamoxifen. *Gynecol Oncol* 1998; 70:188-191.
 103. Koshiyama M, Yoshida M, Takemura M, et al. Immunohistochemical analysis of distribution of estrogen receptors and progesterone receptors in the postmenopausal endometrium. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1996; 75:702-6
 104. Kurman RJ, Mazur MT. Benign diseases of the endometrium. In: Kurman RJ, editor. *Blaustein's pathology of the female genital tract*. 4th ed. New York: Springer-Verlag; 1995. p. 367- 409.
 105. Lahti E, Blanco G, Kauppila A, et al. Endometrial changes in postmenopausal breast cancer patients receiving tamoxifen. *Obstet Gynecol* 1993; 81:660– 4.
 106. Lahti E, Vuopala S, Kauppila A, et al. Maturation of vaginal and endometrial epithelium in postmenopausal breast cancer patients receiving long-term tamoxifen. *Gynecol Oncol*. 1994; 55(3 Pt 1):410-4
 107. Lasset C, Bellen MLR, Gallee MPW, et al. Tamoxifen and risk of endometrial cancer. *Lancet* 2001;357:66.
 108. Lasset C, Bonadona V, Mignotte H, Brémond A. Tamoxifen and risk of endometrial cancer. *Lancet*. 2001; 6;357(9249):66-7
 109. Lécuru F, Metzger U, Scarabin C, et al. Hysteroscopic findings in women at risk of HNPCC. Results of a prospective observational study. *Fam Cancer* 2007; 6:295.
 110. Lee SC, Kaunitz AM, Sanchez-Ramos L, Rhatigan RM. The oncogenic potential of endometrial polyps: a systematic review and meta-analysis. *Obstet Gynecol* 2010; 116:1197.
 111. Li SF, Shiozawa T, Nakayama K, et al. Stepwise abnormality of sex steroid hormone receptors, tumor suppressor gene products (p53 and Rb), and cyclin E in uterine endometrioid carcinoma. *Cancer* 1996; 77:321-9.

112. Lieng M, Istre O, Qvigstad E. Treatment of endometrial polyps: a systematic review. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2010; 89(8):992-1002
113. Lo e Yuen (2000)
114. Love CD, Muir BB, Scrimgeour JB, et al. Investigation of endometrial abnormalities in asymptomatic women treated with tamoxifen and an evaluation of the role of endometrial screening. *J Clin Oncol* 1999;17:2050–4.
115. Lucato M.T. et al.; Tamoxifeno e raloxifeno: Papel na Quimioprevenção do Câncer de Mama. *Rev. Femina* Fev2006 vol 34 n°2
116. Magriples U, Naftolin F, Schwartz PE, Carcangiu ML. Highgrade endometrial carcinoma in tamoxifen-treated breast cancer patients. *J Clin Oncol* 1993; 11:485–90.
117. Maia H, Maltez A, Athayde C, Coutinho E M. Proliferation profile of endometrial polyps in post-menopausal women. *Maturitas*. 2001; 14;40(3):273-81
118. Maia H Jr, Maltez A, Studard E, et al. Effect of previous hormone replacement therapy on endometrial polyps during menopause. *Gynecol Endocrinol* 2004; 18:299.
119. Marchesoni D, Driul L, Fabiani G, et al. Endometrial histologic changes in post-menopausal breast cancer patients using tamoxifen. *International Journal of Gynecology & Obstetrics* 2001; 75:257-262
120. Marconi D, Exacoustos C, Cangi B, et al. Transvaginal sonographic and hysteroscopic findings in postmenopausal women receiving tamoxifen. *J Am Gynecol Laparosc* 1997; 4:331 – 9.
121. Maugeri G, Nardo LG, Campione C, et al. Endometrial lesions after tamoxifen therapy in breast cancer women. *Breast J* 2001;7:240 – 4.
122. Maugeri G, Nardo LG, Campione C, et al. Endometrial lesions after tamoxifen therapy in breast cancer women. *Breast J* 2001;7:240– 4.
123. McDonnell D, Clemm D, Hermann T, et al. Analysis of estrogen receptor function in vitro reveals distinct classes of antiestrogens. *Mol Endocrinol* 1995; 9: 659.
124. McGonigle KF, Lantry SA, Odom-Maryon TL, et al. Histopathologic effects of tamoxifen on the uterine epithelium of breast cancer patients: analysis by menopausal status. *Cancer Lett* 1996; 101:59– 66.

125. McGonigle KF, Show SL, Vasilev SA et al. Abnormalities detected on transvaginal ultrasonography in tamoxifen treated postmenopausal breast cancer patients may represent endometrial cystic atrophy. *Am J Obstet Gynecol* 1998;178:1145-1150
126. McGonigle KF, Smith DD, Marx HF et al. Uterine effects of tamoxifen: a prospective study. *Int J Gynecol Cancer* 2006;16:814-820.
127. McGurgan P., Taylor L.J., Duffy S.R., O'Donovan P.J. Are endometrial polyps from pré-menopausal women similar to post-menopausal women? An immunohistochemical comparison of endometrial polyps from pre-and post-menopausal women. *Maturitas*. 2006; 54:277-284.
128. McGurgan P, Taylor L J, Duffy S R, et al. Does tamoxifen therapy affect the hormone receptor expression and cell proliferation indices of endometrial polyps? An immunohistochemical comparison of endometrial polyps from postmenopausal women exposed and not exposed to tamoxifen *Maturitas*. 2006; 54:252-259
129. Menzin AW, Gal D. Should women receiving tamoxifen be screened for endometrial cancer? An argument for screening. *Cancer Investig* 2000; 18:793– 5.
130. Mignotte H, Lasset C, Bonadona V, et al. Iatrogenic risks of endometrial carcinoma after treatment for breast cancer in a large French case-control study. *Int J Cancer* 1998; 76:325– 30.
131. Mittal K, Goswami S, Demopoulos R. Estrogen and progesterone receptor expression in endometrial polyps. *Int J Gynecol Pathol* 1996; 15: 345-8.
132. Mittal K, Da Costa D. Endometrial hyperplasia and carcinoma in endometrial polyps: clinicopathologic and follow-up findings. *Int J Gynecol Pathol*. 2008; 27(1):45-8
133. Monteagudo A, Popiolek D, Mayberry P, Timor-Tritsch I. Evaluation of endometrial polyps. *Am J Obstet Gynecol*. 2002;186(4):669-74.
134. Mourits MJ, Van der Zee AG, Willemse PH, et al. Discrepancy between ultrasonography and hysteroscopy and histology of endometrium in postmenopausal breast cancer patients using tamoxifen. *Gynecol Oncol* 1999; 73:21-6
135. Mourits MJ, De Vries EG, Willemse PH, et al. Tamoxifen treatment and gynecology side effects: a review. *Obstet Gynecol* 2001; 97:855-66.
136. Mourits MJE, Ten Hoor KA, Van der Zee AGJ et al. The effects of tamoxifen on proliferation and steroid receptor expression in postmenopausal endometrium. *J Clin Pathol* 2002; 55:514-519.

137. Nagele F, O'Connor H, Davies A, et al. 2500 out-patients diagnostic hysteroscopies. *Obstet Gynecol* 1996; 1:87-92.
138. Narod SA, Pal T, Graham T, et al. Tamoxifen and risk of endometrial cancer. *Lancet* 2001; 357:65– 6.
139. Neven P, De Mylder X, Van Belle Y, et al. Longitudinal hysteroscopic follow-up during tamoxifen treatment. *Lancet* 1998;351:36.
140. Neven P, De Muylder X, Van Belle Y, et al. Tamoxifen and the uterus and endometrium. *Lancet* 1989;2:375.
141. Nishimura N, Hachisuga T, Saito T, Kawarabayashi T. Subsequent endometrial carcinoma with adjuvant tamoxifen treatment in Japanese breast cancer patients. *Int J Gynecol Cancer* 2001; 11:272-6.
142. Nogueira AA. Pólipos endometriais. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2005;27(5):289-92.
143. Nuovo MA, Nuovo GJ, McCaffrey RM, et al. Endometrial polyps in PM patients receiving tamoxifen. *Int J Gynecol Pathol* 1989; 8:125-31.
144. Oguz S, Sargin A, Kelekci S, et al. The role of hormone replacement therapy in endometrial polyp formation. *Maturitas* 2005; 50:231.
145. Oliveira MAP, Melki LAH, Crispi CP, et al. Pólipos endometriais: diagnóstico e tratamento. *Femina.* 2003;31(10):885-90.
146. Onalan R, Onalan G, Tonguc E, et al. Body mass index is an independent risk factor for the development of endometrial polyps in patients undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2009; 91:1056.
147. Orvieto R, Bar-Hava I, Dicker D, et al. Endometrial polyps during menopause: characterization and significance. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1999; 78(10):883-6
148. Ozsener S, Ozaran A, Itil I et al. Endometrial pathology of 104 postmenopausal breast cancer patients treated with tamoxifen. *Eur J Gynecol Oncol* 1998; 19:580-583.
149. Pickartz H, Beckmann R, Fleige B, et al. Steroid receptors and proliferative activity in non-neoplastic and neoplastic endometria. *Virchows Arch A: Pathol Anat Histopathol* 1990;417:163-71.
150. Ragaz J, Coldman A. Survival impact of adjuvant tamoxifen on competing causes of mortality in breast cancer survivors, with analysis of mortality from contralateral breast cancer, cardiovascular events, endometrial cancer, and thromboembolic episodes. *J Clin Oncol* 1998;16:2018– 24.

151. Ramondetta LM, Sherwood JB, Dunton JD, et al. Endometrial cancer in polyps associated with tamoxifen use. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 180:340-1.
152. Reslova T, Tosner J, Resl M, et al. Endometrial polyps. A clinical study of 245 cases. *Arch Gynecol Obstet* 1999; 262:133-9.
153. Risberg B, Karlsson K, Abeler V, et al. Dissociated expression of Bcl-2 and Ki67 in endometrial lesions: diagnostic and histogenetic implications. *Int J Gynecol Pathol* 2002; 21:155-60
154. Rodrigues de Lima G, Nazário ACP. Câncer de mama, endométrio e tamoxifeno. *Rev Bras Mastol* 1996; 6:5-6.
155. Rullo S, Tagliaferri T, Bandiera F et al. Uterine changes during tamoxifen therapy. *Clin Exp Obstet Gynecol* 1993;20:116-119.
156. Runowicz CD, Costantino JP, Wickerham DL, et al. Gynecologic conditions in participants in the NSABP breast cancer prevention study of tamoxifen and raloxifene (STAR). *Am J Obstet Gynecol* 2011; 205:535.e1.
157. Ryden S, Fermo M, Moller T. Long-term effects of adjuvant tamoxifen and/or radiotherapy. The South Sweden Breast Cancer Trial. *Acta Oncol* 1992; 31:271-4.
158. Sasco AJ, Chaplin G, Amoros E, et al. Endometrial cancer following breast cancer: effect of tamoxifen and castration by radiotherapy. *Epidemiology* 1996;7:9-13.
159. Savelli L, De Iaco P, Santini D, et al. Histopathologic features and risk factors for benignity, hyperplasia and cancer in endometrial polyps. *Am J Obstet Gynecol*. 2003;188(4):927-31.
160. Schlesinger C, Kamoi S, Ascher S, et al. Endometrial polyps: a comparison study of patients receiving tamoxifen with two control groups. *Int J Gynecol Pathol* 1998; 17:302-11.
161. Schwartz L, Krey L, Demopoulos R, et al. Alterations in the steroid hormone receptors in the tamoxifen treated endometrium. *Am J Obstet Gynecol* 1997;176: 129-37.
162. Senkus-Konefka E, Konefka T, Jassem J. The effects of tamoxifen on the female genital tract. *Cancer treatment reviews* 2004; 30:291-301
163. Seoud M, El-saghir N, Salem Z et al. Tamoxifen and endometrial pathologies: a prospective study. *Gynecol Oncol* 1999; 75:15-9.
164. Shi SR, Cote RJ, Taylor CR. Antigen retrieval immunohistochemistry: past, present and future. *J Histochem Cytochem* 1997; 45: 327.

165. Stewart CJ, Duffy DL, Antill YC, et al. Report of Endometrial Cancer in Australian BRCA1 and BRCA2 mutation-positive Families. *Twin Res Hum Genet.* 2011; 14(2):111-8.
166. Sue-Bergman EJ, Goodman A. Surveillance for endometrial cancer in women receiving tamoxifen. *Ann Intern Med* 1999; 11:127–35.
167. Symonds I. Ultrasound, hysteroscopy and endometrial biopsy in the investigation of endometrial cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2001; 15:381-91
168. Tabrizi A D, Vahedi A, Hiedar A E. Malignant endometrial polyps: Report of two cases and review of literature with emphasize on recent advances. *J Res Med Sci.* 2011; 16(4): 574–579.
169. Taylor SW, Lee-Wilkins KL, Sparling Y, Goldstein PJ. Evaluation of the tamoxifen-exposed endometrium by transvaginal sonography. *Clin J Women's Health* 2000; 1:10– 5.
170. Taylor LJ, Jackson TL, Reid JG, Duffy SR. The differential expression of ER, PR, Bcl-2 and Ki67 in endometrial polyps *BJOG* 2003;110(9):794-8.
171. Tepper R, Beyth Y, Altaras MM, et al. Value of sonohysterography in asymptomatic postmenopausal tamoxifen-treated patients. *Gynecol Oncol* 1997;64:386–91.
172. Trahan S, Têtu B, Raymond PE. Serous papillary carcinoma of the endometrium arising from endometrial polyps: a clinical, histological, and immunohistochemical study of 13 cases. *Hum Pathol.* 2005; 36(12):1316-21
173. Treilleux T, Mignotte H, Clement-Chassagne C, et al. Tamoxifen and malignant epithelial-nonepithelial tumors of the endometrium: report of six cases and review of the literature. *Eur J Surg Oncol* 1999;25:477-82.
174. Tregón ML, Blümel JE, Tarín JJ, et al. The early response of the postmenopausal endometrium to tamoxifen: expression of estrogen receptors, progesterone receptors, and Ki-67 antigen. *Menopause* 2003; vol 10 n2: 154-159.
175. Tzukerman MT, Esty A, Santisomere D, et al. Human estrogen receptor transactivational capacity is determined by both cellular and promoter context and mediated by two functionally distinct intramolecular regions. *Mol Endocrinol* 1994; 8: 21.
176. Van Bogaert LJ. Clinicopathologic findings in endometrial polyps. *Obstet Gynecol* 1988; 71(5):771-3.
177. Van Leeuwen FE, Benraadt J, Coebergh JWW, et al. Risk of endometrial cancer after tamoxifen treatment of breast. *The Lancet* 1994; 343: 448-452

178. Van Leeuwen FE, Benraadt J, Coebergh JWW, et al. Risk of endometrial cancer after tamoxifen treatment of breast. *The Lancet* 1994; 343: 448-452
179. Van Leeuwen FE, bergman L, Beelen ML, et al. Tamoxifen and risk of endometrial cancer. *Lancet* 2001; 357:67
180. Vering A, Vockel A, Stegmuller M, et al. Immunobiochemical assay for determination of nuclear steroid receptors during tamoxifen therapy. *J Cancer Res Clin Oncol* 1993;119:415-20.
181. Wang JH, Zhao J, Lin J. Opportunities and risk factors for premalignant and malignant transformation of endometrial polyps: management strategies. *J Minim Invasive Gynecol*. 2010; 17(1):53-8
182. Webster NJG, Green S, Tasset D. The transcription activation function located in the hormone-binding domain of the human oestrogen receptor is not encoded by a single exon. *EMBO J* 1989; 8: 1441.
183. Wickerham DL, Fisher B, Wolmark N, et al. Association of tamoxifen and uterine sarcoma. *J Clin Oncol* 2002; 20:2758–60
184. Willen R, Lindhal B, Andolf E, et al. Histopathologic findings in thickened endometria, as measured by ultrasound, in asymptomatic postmenopausal breast cancer patients on various adjuvant treatment including tamoxifen. *Anticancer Res* 1998;18:667– 76.
185. Willet WC, Rockhi B, Hankinson SE, et al. Epidemiology and nongenetic causes of breast cancer. In: Harris JR, et al., editors. *Diseases of the Breast*. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2000. p.175-220.
186. Wolf DM, Jordan VC. Gynecologic complications associated with long-term adjuvant tamoxifen therapy for breast cancer. *Gynecol Oncol* 1992;45:118– 28.
187. Yang YJ, Trapkin LK, Demoski RK, et al. The small blue cell dilemma associated with tamoxifen therapy. *Arch Pathol Lab Med* 2001;125:1047-50.
188. Zarbo G, Caruso G, Zammitti M, et al. The effects of tamoxifen therapy on the endometrium. *Eur J Gynaecol Oncol* 2000; 21:86-8.

Artigo científico redigido em português

**AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE PÓLIPOS ENDOMETRIAIS
EM PACIENTES PÓS-MENOPÁUSICAS SINTOMÁTICAS USUÁRIAS E
NÃO USUÁRIAS DE TAMOXIFENO**

Raquel Papandreu Dibi¹, Claudio Galleano Zettler¹, Gustavo Py Gomes da Silveira¹.

¹ Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA),
Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

INTRODUÇÃO: Os pólipos endometriais são achados comuns na pós-menopausa, comumente diagnosticados na quinta década de vida. Sua prevalência na população geral varia de 3 a 25%, com uma malignização em torno de 10.7%. Ainda não existe na literatura um consenso sobre a patogênese e o real efeito do tamoxifeno nos receptores hormonais dos pólipos endometriais em pacientes pós- menopáusicas.

OBJETIVO: Avaliar a expressão dos receptores hormonais e dos marcadores de proliferação/apoptose (ki-67 e Bcl-2) nos pólipos endometriais de pós-menopáusicas não usuárias e usuárias de tamoxifeno.

PACIENTES E MÉTODOS: Foram incluídas 46 pacientes pós-menopáusicas, com idade entre 47 e 86 anos. Todas as pacientes apresentavam sangramento pós-menopáusico e foram submetidas à ressecção histeroscópica de pólipo endometrial. Quatorze pacientes estavam em uso de tamoxifeno, as demais sem uso de medicações hormonais. Para a análise imuno-histoquímica foi utilizado o tecido tumoral fixado em formalina e incluído em parafina. Foi utilizado o kit ADVANCETM HPR (DakoCytomation®) para detecção do Ki-67, Bcl2, REe RP.

RESULTADOS: Na nossa amostra avaliamos o componente glandular dos pólipos e encontramos uma expressão de 96,9% de receptores de progestogênio nos pólipos de não usuárias de tamoxifeno e de 92,3% nas usuárias (p0, 499). Em relação aos receptores de estrogênio, todos os pólipos de não usuárias de tamoxifeno expressaram receptor de estrogênio e 92,3% das usuárias de tamoxifeno também foram RE

positivas nos pólipos avaliados (p0,295). Encontramos uma expressão de 75% de ki-67 em pólipos de usuárias de tamoxifeno e de 82,8% em pós-menopáusicas não usuárias. Todas apresentaram expressão de Bcl-2 nos pólipos endometriais.

CONCLUSÕES: A avaliação imuno-histoquímica de pólipos endometriais deste estudo demonstrou que o tamoxifeno, apesar de ser considerado fator de risco para o pólipo endometrial, não alterou a expressão dos receptores hormonais significativamente em comparação com as não usuárias de tamoxifeno. Também não houve diferença entre os grupos na expressão do ki-67 e do Bcl-2, ambos apresentaram inibição da apoptose demonstrada através da expressão do Bcl-2 em todos os casos incluídos no estudo. Este achado reforça a teoria de que pólipos crescem por inibição da apoptose e não por proliferação celular isolada. Nas pós-menopáusicas a apoptose parece ocorrer independentemente dos mecanismos de controle dos receptores de estrogênio e dos receptores de progesterona.

Palavras Chaves: Endometrio, Tamoxifeno, Menopausa, Imuno-histoquímica, ki-67, Receptor de estrogênio, Receptor de progesterona, Bcl-2.

Introdução

Os pólipos endometriais são achados comuns na pós-menopausa, porém sua patogênese ainda não é totalmente conhecida ⁽¹⁾. São mais comumente diagnosticados na quinta década de vida ⁽²⁾, ocorrendo em 16 a 54% das mulheres com sangramento pós- menopáusico ^(3, 4). Menopausa tardia, o uso de terapia hormonal (TH) e de tamoxifeno são considerados fatores de risco para o desenvolvimento dos pólipos endometriais. Esses, apesar da etiopatogenia desconhecida, são considerados fator de risco para o câncer de endométrio. A incidência dos pólipos é maior nas mulheres expostas ao tamoxifeno, presumivelmente devido aos efeitos estrogênicos do tamoxifeno no endométrio ⁽⁵⁾.

Este estudo foi idealizado porque ainda não existe na literatura um consenso sobre a patogênese dos pólipos endometriais em pacientes pós- menopáusicas e sobre o efeito do tamoxifeno nos receptores hormonais destes pólipos. Também não existe um consenso sobre o real efeito do tamoxifeno nos marcadores de proliferação/apoptose celular dos pólipos de pós-menopáusicas expostas a este medicamento.

1. Pacientes e Métodos

a. Pacientes

Foram incluídas 46 pacientes pós- menopáusicas, com idade entre 47 e 86 anos. Todas as pacientes apresentavam sangramento pós-menopáusico e foram submetidas à ressecção histeroscópica de pólio endometrial.

Quatorze pacientes estavam em uso de tamoxifeno (no mínimo por um ano) para tratamento de câncer de mama (grupo 2), as demais estavam sem uso de nenhuma medicação hormonal por no mínimo seis meses (grupo 1). O tempo de menopausa variou de um a trinta e cinco anos.

Das 184 lâminas confeccionadas, foram excluídas 3 lâminas dos receptores de estrogênio e progesterona, 13 lâminas de ki-67 e 4 lâminas do Bcl-2, todas por dificuldade na confecção e leitura das mesmas.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição.

b. Métodos

Para a análise imuno-histoquímica foi utilizado o tecido tumoral fixado em formalina e incluído em parafina. Os blocos foram seccionados na espessura de 3µm, desparafinados e rehidratados

para a realização da técnica. Foi utilizado o kit ADVANCE™ HPR (DakoCytomation®) para detecção do Ki-67, Bcl2, RE, e RP. A recuperação antigênica do Ki 67 foi realizada com citrato de sódio (pH 6,0) e a recuperação antigênica do Bcl2, RE e RP foi realizada com Tris-EDTA (pH9,0) aquecido em banho-maria, (95-98°C) por 40 min. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada, utilizando-se dois banhos de 10 min em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 30V, a 5%, em metanol. O bloqueio das proteínas inespecíficas foi realizado com Albumina de Soro Bovino (BSA) 1% por 30min. A incubação com o anticorpo primário realizou-se durante a noite, à temperatura de 4°C. A incubação com anticorpo secundário e anticorpo terciário foi realizada durante 40min à temperatura ambiente. Como controle positivo para Ki-67 e Bcl2 foi utilizado amostra de tecido linfóide (tonsila palatina) e para os receptores de estrógeno (RE) e progesterona (RP) foi utilizado tecido mamário. Para controle negativo da técnica, foi utilizado o mesmo tecido, incubado com o mesmo anticorpo, exceto o primário, que foi substituído por BSA1%. A ligação antígeno-anticorpo foi visualizada com o cromógeno DAB (diaminobenzidina). A contra coloração foi feita com hematoxilina de Harris e as lâminas foram desidratadas e montadas com resina sintética.

Todas as lâminas imunocoradas foram analisadas e quantificadas por dois observadores em microscópio óptico para cada anticorpo separadamente. A leitura foi realizada, através da

análise da imunocoloração para receptores de estrógeno (ER), progesterona (PR), ki 67 e Bcl 2 em pelo menos 10 campos de grande aumento (10 x HPF) para todos os casos, considerando para análise do resultado a imunorreação no componente glandular.

Para os receptores de estrógeno (ER) e progesterona (PR), foram considerados positivos os casos em que se identificou imunocoloração do núcleo em pelo menos 1% das células glandulares de toda a amostra, e negativos, a ausência de qualquer coloração nuclear ou em menor de 1% da amostra.

A leitura do Bcl2 foi realizada através da identificação da imunocoloração citoplasmática das células glandulares. Foram considerados negativos os casos com ausência de coloração em qualquer glândula endometrial, e positivos quando identificado pelo menos uma glândula endometrial da amostra com reação positiva.

O Ki67 foi analisado semi-quantitativamente através da identificação de imunocoloração nuclear do componente glandular das amostras, sendo considerados com proliferação aumentada à identificação de 5% ou mais dos núcleos das células glandulares imunocorados. Os casos com ausência de imunocoloração ou menos de 5% dos núcleos corados não foram considerados com índice de proliferação aumentada.

c. Análise Estatística

As variáveis qualitativas foram descritas através de frequência absoluta e relativa e as variáveis quantitativas através de média e desvio-padrão ou mediana e intervalo interquartil.

A comparação entre média de idade da paciente e idade da menopausa em relação ao grupo foi através do teste T. O teste exato de Fischer foi utilizado para associar a presença/ausência de receptores hormonais (RE e RP) e marcadores de proliferação/apoptose (ki-67 e Bcl-2) com os grupos. A comparação do tempo de menopausa em relação aos grupos e presença/ausências de RP foi através do Teste não paramétrico Mann-Whitney.

As análises foram realizadas através do software SPSS versão 17.0 e o nível de significância adotado nas análises foi de 5%.

2. Resultados

A expressão dos receptores hormonais (RE e RP) e dos marcadores de proliferação/apoptose (ki-67 e Bcl-2) nos pólipos endometriais de pós-menopáusicas não usuárias (grupo 1) e usuárias de tamoxifeno (grupo 2) encontra-se na tabela 1.

Em ambos os grupos houve uma importante expressão de receptores de estrogênio e de progesterona no tecido glandular dos pólipos endometriais, sem diferença entre os grupos. A média de idade das pacientes não usuárias de tamoxifeno foi 60,91anos não

diferindo da média de idade das usuárias de tamoxifeno que foi 63,87 (p 0,360).

Conforme tabela 2, a idade média da menopausa nas pacientes não usuárias de tamoxifeno foi 49,90 anos também não diferindo da média de idade da menopausa das usuárias de tamoxifeno que foi 49,29 anos (p 0,727).

As pacientes foram encaminhadas para realização de histeroscopia após referirem sangramento pós-menopáusico e ecografia sugestiva de pólipos endometrial. A mediana do tempo de menopausa no momento da realização da ressecção histeroscópica do pólipo endometrial no grupo das não usuárias de tamoxifeno foi de 8,00 anos (intervalo inter-quartil 3,76-14,00) e no grupo de usuárias a mediana foi de 10,50 anos (intervalo interquartil 7,00- 21,75), também não havendo diferença significativa em relação a grupo (p=0,161). Em relação ao tempo de menopausa e a expressão de receptores hormonais, observa-se que na ausência de expressão do receptor de progesterona o tempo de menopausa (mediana de 28 anos) foi significativamente maior do que na presença de expressão (mediana 9 anos), conforme tabela 3 (p=0,026).

Os pólipos ressecados por histeroscopia foram classificados como hiperplásicos ou atróficos. Não tivemos nenhum caso de hiperplasia atípica ou câncer nos casos examinados.

3. Discussão

Em nosso estudo, tanto a média de idade das pacientes quanto a idade média da menopausa semelhantes nos dois grupos demonstram dados de uma população homogênea e randomizada. Além de não existir consenso sobre o tratamento dos pólipos endometriais na pós-menopausa, sua patogênese ainda não é completamente conhecida. Biron-Shental T et al identificaram pólipos endometriais em 25,9% das mulheres pós menopáusicas com câncer de mama e usuárias de tamoxifeno. Baseado na literatura, a malignização destes pólipos pode ocorrer em 3-10.7% dos casos ^(6, 7, 8, 9).

O papel do estrogênio no desenvolvimento dos pólipos endometriais pode ser avaliado através dos receptores celulares. Estudos demonstram que existem poucos receptores de progestogênio comparados com os receptores de estrogênio no estroma, mas não no componente glandular dos pólipos ^(10, 11). Na nossa amostra avaliamos o componente glandular dos pólipos e encontramos uma expressão de 96,9% de RP nos pólipos estudados no grupo de mulheres pos-menopáusicas não usuárias de tamoxifeno e de 92,3% nas usuárias de tamoxifeno (p0, 499). Em relação aos RE, todos os pólipos do grupo de mulheres pós-menopáusicas não usuárias de tamoxifeno expressaram RE e 92,3% dos pólipos avaliados no grupo de mulheres pós-menopáusicas das usuárias de tamoxifeno também apresentaram RE positivos (p0, 295).

Estes achados demonstram que o uso de tamoxifeno em mulheres pós-menopáusicas não parece ter efeito significativo na expressão de receptores de progesterona e estrogênio nos pólipos endometriais incluídos neste estudo.

Os pólipos endometriais podem crescer através de uma expressão aumentada dos RE, redução da expressão do RP ou ambos ⁽¹⁰⁾. Não identificamos uma diferença entre a expressão de receptores de estrogênio e progestogênio nos pólipos analisados na nossa amostra.

Na literatura Taylor et al (2003) demonstrou que pólipos tem expressão elevada de RE apenas no epitélio glandular, concordando com nossos achados porém, avaliamos somente o epitélio glandular dos pólipos⁽¹¹⁾.

Diversos outros estudos sobre a patogênese dos pólipos endometriais demonstram a participação do estrogênio e da progesterona, que parecem estar em desequilíbrio na presença dos pólipos endometriais ^(12, 10, 13, 14, 15, 11, 3). Enquanto alguns estudos demonstram diminuição, outros demonstram aumento dos receptores hormonais (RH) nos pólipos.

Almeida et al (2004) avaliando receptores hormonais nos pólipos endometriais e no endométrio adjacente dos pólipos estudados em mulheres pós-menopáusicas observaram uma expressão bem maior de receptores hormonais (estrogênio e progesterona) nos pólipos, sugerindo que pólipos endometriais podem se desenvolver em níveis baixos de estrogênio e com

endométrio adjacente atrófico ⁽³⁾. O estudo conclui que os receptores hormonais representam um papel importante na fisiopatologia dos pólipos endometriais das mulheres pós-menopáusicas, especialmente os receptores de estrogênio.

Conforme vários estudos, autores como Mittal et al (1996) e Belisario et al (2006) sugerem que o aumento na expressão dos receptores de estrogênio e progesterona em células glandulares de pólipos podem ser responsáveis pelo desenvolvimento de pólipos na ausência de níveis elevados de estrogênio ^(10, 16). As conclusões destes estudos indicam que a expressão dos receptores de estrogênio e progesterona difere entre as porções estromal e glandular do endométrio dos pólipos em pacientes na pós-menopausa.

Koshiyama et al (1996) estudaram 33 pacientes na pós menopausa e encontraram diminuição dos receptores de estrogênio com o aumento da idade ⁽¹¹⁾. Na nossa amostra identificamos uma diminuição dos receptores hormonais nos pólipos endometriais quanto maior o tempo de menopausa ($p=0,026$) ⁽¹²⁾.

Encontramos uma expressão de 75% de ki-67 nos pólipos de usuárias de tamoxifeno e de 82,8% nos pólipos das mulheres pós-menopáusicas não usuárias de tamoxifeno. Nosso estudo não identificou diferença na expressão do ki-67 nos dois grupos, concordante com a literatura ⁽¹⁾.

Em um endométrio normal pré-menopáusico a apoptose ocorre durante o meio e o final da fase secretora e durante os dois primeiros

dias da menstruação. O balanço entre a atividade mitótica e a apoptose é o que regula o desenvolvimento endometrial durante o ciclo menstrual ⁽¹⁷⁾. A expressão do Bcl-2 é inversamente proporcional a apoptose que ocorre no tecido. Em nosso estudo, todas as pacientes (usuárias e não usuárias de tamoxifeno) apresentaram expressão de Bcl-2 nos pólipos endometriais.

Morsi et al identificaram uma expressão significativa de Bcl-2 na porção glandular do endométrio de pós menopáusicas, apesar de mínima expressão no estroma endometrial ⁽¹⁸⁾. Alguns estudos sugerem que o crescimento do pólipo endometrial ocorre devido ao decréscimo da apoptose (caracterizado pelo aumento da expressão do Bcl-2) ^(11, 19).

4. Conclusão

Em relação ao tempo de menopausa observamos uma menor expressão de receptores hormonais nos pólipos endometriais quanto maior o tempo de menopausa. A avaliação imuno-histoquímica de pólipos endometriais deste estudo demonstrou que o tamoxifeno, apesar de ser considerado fator de risco para o pólipo endometrial, não alterou a expressão dos receptores hormonais significativamente em comparação com as pacientes não usuárias de tamoxifeno. Também não houve diferença entre os grupos na expressão do ki-67 e do Bcl-2, ambos apresentaram inibição da apoptose demonstrada através da expressão do Bcl-2 em todos os casos incluídos no

estudo. Este achado reforça a teoria de que pólipos crescem por inibição da apoptose e não por proliferação celular isolada.

Sabe-se que no endométrio funcional a apoptose se relaciona com a expressão dos receptores hormonais e varia ao longo do ciclo menstrual. Nas mulheres pós-menopáusicas a apoptose parece ocorrer independentemente dos mecanismos de controle dos receptores de estrogênio e dos receptores de progesterona.

Referencias

1. McGurgan P., Taylor L.J., Duffy S.R., O'Donovan P.J. Are endometrial polyps from pré-menopausal women similar to post-menopausal women? An immunohistochemical comparison of endometrial polyps from pre-and post-menopausal women. *Maturitas*; 54(2006)277-284.
2. Van Bogaert LJ. Clinicopathologic findings in endometrial polyps. *Obstet Gynecol*; 1988; 71(5):771-3.
3. Almeida ECS, Nogueira AA, Reis FJC, Ramalho LNZ, Zucoloto S. Immunohistochemical expression of estrogen and progesterone receptors in endometrial polyps and adjacent endometrium in postmenopausal women. *Maturitas*; 49(2004)229-233.
4. Saidi MH, Sadler RK, Theis VD, Akright BD, Farhat AS, Villanueva GR. Comparison of sonography, sonohysterography, and hysteroscopy for evaluation of anormal uterine bleeding. *J Ultrasound Med*; 1997;16:587-91.
5. Reslova T, Tosner J, Resl M, Kugler R, Vavrova I. Endometrial polyps. A clinical study of 245 cases. *Arch Gynecol Obstet* 1999;262(3/4):133-9.
6. Biron-Shental T, Tepper R, Fishman A, Shapira J, Cohen I. Recurrent endometrial polyps in postmenopausal breast cancer patients on tamoxifen. *Gynecol Oncol* 2003;90:382-6.
7. Schlesinger C, Kamoi S, Ascher s, et al. Endometrial polyps: a comparison study of patients receiving tamoxifen with two control groups. *Int J Gynecol Pathol* 1998;17:302-11.
8. Ramondetta LM, Sherwood JB, Dunton JD, et al. Endometrial cancer in polyps associated with tamoxifen use. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 180:340-1.
9. Cohen I, Perel E, Flex D, et al. Endometrial pathologies in postmenopausal tamoxifen treatment: comparison between gynaecological symptomatic and gynaecological asymptomatic breast cancer patients. *J Clin Pathol* 1999; 52: 278-82.
10. Mittal K, Schawrtz. Estrogen and progesterone receptor expression on endometrial polyps. *Int J Gynecol Pathol* 1996; 15(4); 345-8)
11. Taylor LJ, Jackson TL. The differential expression of ER, PR, Bcl-2 and Ki67 in endometrial polyps. *BJOG* 2003; 110 (9): 794-8)
12. Koshiyama M, Yoshida M, Takemura M, et al. Immunohistochemical analysis of distribution of estrogen receptors and progesteron receptors in the postmenopausal endometrium. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1996;75:702-6.
13. Maia H, Maltez A, Calmon LC, Oliveira M, Marques D, Coutinho EM. Histopathology and steroid receptors in endometrial polyps of

postmenopausal patients under hormone replacement therapy. *Gynaecol Endoscopy* 1998;5:267–72.

14. Thijs I, Neven P, Van Hooff I, et al. Oestrogen and progesterone receptor expression in postmenopausal endometrial polyps and their surrounding endometrium. *Eur J Cancer* 2000;36:S108–9.

15. Bergeron C. Effect of estrogens and antiestrogens on the endometrium. *Gynecol Obstet Fertil* 2002;30:933–7.

16. Belisário M.S.N, Vassallo J, Andrade L.A.L.A, Alvarenga M, Pinto G.A, Monteiro I.M.U. The expression of the hormone receptors in the endometrium and endometrial polyps in postmenopausal women and its relationship to body mass index. *Maturitas* 2006; 53: 114-118

17. Vinatier D, Dufour P, Subtil D. Apoptosis: a programmed cell death involved in ovarian and uterine physiology. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1996;67:85-102.

18. Morsi HM, Leers MP, Jager W, et al. The patterns of expression of an apoptosis-related CK18 neoepitope, the bcl-2 protooncogene, and the Ki-67 proliferation marker in normal, hyperplastic and malignant endometrium. *Int J Gynecol Pathol* 2000;19:118-26.

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

Anexo

Tabela 1-Prevalência dos receptores hormonais (RE e RP) e marcadores de proliferação/apoptose (ki-67 e Bcl-2) em pacientes pós-menopáusicas com pólipos endometriais sintomáticos

Positivo	Grupo		P
	1	2	
RP	31 (96,9%)	12 (92,3%)	0,499
RE	31 (100,0%)	12 (92,3%)	0,295
KI-67	24 (82,8%)	9 (75,0%)	0,627
Bcl-2	30 (100,0)	12 (100,0)	-

p*: Qui-quadrado

RP: Receptor de progesterona RE: Receptor de estrogênio

Ki-67: Marcador de proliferação Bcl-2: Marcador de apoptose

Grupo 1: Pós menopáusicas não usuárias de Tamoxifeno

Grupo 2: Pós menopáusicas usuárias de Tamoxifeno

Tabela 2- Caracterização da amostra entre grupos

	Grupo		P
	1	2	
Idade (anos)	60,91 ± 10,08	63,86 ± 9,66	0,360
Idade menopausa	49,90 ± 4,02	49,29 ± 5,86	0,727
Tempo de menopausa(anos)	8,00 (3,75 – 14,00)	10,50 (7,00 – 21,75)	0,161
média±DP mediana (P25-P75)			

p*: teste *t* de Student

Grupo 1: Pós menopáusicas não usuárias de Tamoxifeno

Grupo 2: Pós menopáusicas usuárias de Tamoxifeno

Tabela 3- Mediana e intervalo interquartil do tempo de menopausa em relação à presença/ausência de expressão do receptor de progesterona (RP)

	RP		p
	Positivo	Negativo	
Tempo de menopausa	9,00 (3,50 – 12,50)	28,00 (12,25 – 34,00)	0,026

p*: teste de Mann-Whitney

Artigo científico redigido em inglês

**IMMUNOHISTOCHEMICAL ASSESSMENT OF POSTMENOPAUSAL
ENDOMETRIAL POLYPS**

Raquel Papandreus Dibi¹, Claudio Galleano Zettler¹, Gustavo Py Gomes da Silveira¹.

¹ Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA),
Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

Enviado para publicação para a Revista European Journal of Obstetrics
and Gynecology and Reproductive Biology.

INTRODUCTION: Polyps are common findings in postmenopausal commonly diagnosed in the fifth decade of life. Its prevalence in the general population ranges from 3 to 25%, with a malignancy around 10.7%. Yet there is consensus in the literature about the pathogenesis and the real effect of tamoxifen in hormone receptor of endometrial polyps in postmenopausal patients.

OBJECTIVE: To evaluate the expression of hormone receptors and markers of proliferation / apoptosis (Ki-67 and Bcl-2) in endometrial polyps of postmenopausal nonusers and users of tamoxifen.

PATIENTS AND METHODS: We included 46 postmenopausal patients, aged between 47 and 86 years. All patients presented with postmenopausal bleeding and underwent hysteroscopic resection of polyps endometrial. Fourteen patients were on tamoxifen, the other without the use of hormonal medications. For immunohistochemical analysis of tumor tissue used was fixed in formalin and embedded in parafine. It was used ADVANCETM HPR kit (DakoCytomation ®) for detection of Ki-67, Bcl2, RE E RP.

RESULTS: In this study we evaluated the glandular component of the polyps and found an expression of 96.9% of progestin receptors in polyps of non-users tamoxifen and 92.3% in users (p0, 499). Regarding estrogen receptors all polyps nonusers of tamoxifen expressed estrogen receptor and 92.3% of tamoxifen users were also evaluated ER positive polyps (p0, 295). We found a 75% expression of ki-67 polyps in tamoxifen users and 82.8% in postmenopausal nonusers. All showed expression of Bcl-2 in endometrial polyps.

CONCLUSIONS: The immunohistochemical analysis of endometrial polyps in this study demonstrated that tamoxifen, despite being considered a risk factor for endometrial polyp, did not alter the expression of hormone receptors significantly compared with nonusers of tamoxifen. There was no difference between groups in the expression of Ki-67 and Bcl-2, both showed inhibition of apoptosis demonstrated by the expression of Bcl-2 in all cases included in the study. This finding reinforces the theory that polyps grow by inhibition of apoptosis and not by cellular proliferation. In postmenopausal apoptosis appears to occur independently of the control mechanisms of estrogen receptors and progesterone receptors.

Keywords: Endometrium, tamoxifen, menopause, immunohistochemistry, ki-67, estrogen receptor, progesterone receptor, Bcl-2.

Introduction

Although endometrial polyps are common in postmenopausal women, their pathogenesis is still not entirely understood ⁽¹⁾. Polyps are most commonly diagnosed in the fifth decade of life ⁽²⁾ and occur in 16 to 54% of women with postmenopausal bleeding ^(3, 4). Late menopause, hormone therapy (HT) and tamoxifen use are considered risk factors for endometrial polyps. Although the etiopathogenesis of these polyps is still unknown, they are considered risk factors for endometrial cancer. Tamoxifen users have a higher incidence of polyps, possibly due to the estrogenic effects of tamoxifen on the endometrial epithelium ⁽⁵⁾.

As there is no consensus in the literature regarding the pathogenesis of postmenopausal endometrial polyps, and the effect of tamoxifen on the hormone receptor profile of these polyps, the present study aimed to investigate these issues. The present study also sought to elucidate the effect of tamoxifen on markers of cell proliferation and apoptosis in postmenopausal polyps, as the literature is not consistent on this point.

1. Patients and Method

a. Patients

A total of 46 postmenopausal women aged between 47 and 86 participated in the study. All patients presented with postmenopausal bleeding and underwent hysteroscopic resection of endometrial polyps.

Fourteen patients had been using tamoxifen for at least one year to treat breast cancer (group 2), while the remaining patients had not used hormone medication for at least six months (group 1). Time since menopause ranged between one and 35 years.

Polyp samples were cut and mounted on a total of 184 slides. However, three slides containing estrogen and progesterone receptors, 13 Ki-67 slides and four Bcl-2 slides were discarded due to difficulties in slide preparation and reading.

The study was approved by the Research Ethics Committee of the institution in which it was conducted.

b. Method

The immunohistochemical analysis was conducted using formalin-fixed and paraffin-embedded tumor tissue. Samples were then sectioned into 3µm-thick slices, deparaffinized and rehydrated prior to analysis. The ADVANCE™ HPR (DakoCytomation®) kit was used for detecting Ki-67, Bcl-2, and estrogen (ER) and progesterone (PR) receptors. Sodium citrate (pH 6.0) was used for Ki-67 antigen retrieval. Antigenic retrieval of Bcl-2, ER and PR was conducted using Tris-EDTA (pH 9.0) incubated at 95-98°C in a water bath for 40 min. Endogenous peroxidase activity was blocked by incubation in 5% hydrogen peroxide (H₂O₂) 30V in methanol

for two ten-minute periods. Nonspecific proteins were blocked using 1% Bovine Serum Albumin (BSA) for 30min. Slides were incubated with primary antibodies overnight at 4°C. Slides were also submitted to incubation with secondary and tertiary antibodies for 40min at room temperature. Samples of lymphoid tissue (tonsil samples) were used as a positive control for Ki-67 and Bcl-2, and mammary tissue was used as a control for the analysis of ER and PR. The same tissues were also incubated with all but the primary antibodies, which were replaced by 1% BSA, as a form of negative control. Antibody-antigen binding was visualized using DAB chromogen (diaminobenzidine). Harris hematoxylin was used for counterstaining and slides were dehydrated and mounted with synthetic resin.

All immunostained slides for each antibody were analyzed and quantified separately by two observers using an optical microscope. Immunopositivity for ER, PR, Ki-67 and Bcl-2 was investigated in at least 10 high power fields, and results were considered based on immunoreactivity in the glandular epithelium.

Cases were considered positive for ER and PR when immunostaining was observed in at least 1% of gland cells in the sample, and were considered negative when immunostaining was not observed, or occurred in less than 1% of the sample.

Analysis for Bcl2 was conducted through cytoplasmic immunostaining of gland cells. Absence of staining in the endometrial gland was indicative of a negative result, and reactions in at least one endometrial gland were considered positive results.

Ki-67 immunoreactivity was semi-quantitatively analyzed through nuclear immunostaining in the glandular component in the samples. Immunostaining in at least 5% of gland cell nuclei was considered indicative of high proliferation. Cases with an absence of immunostaining, or immunoreactivity in less than 5% of cells were suggestive of low proliferation indices.

c. Statistical Analysis

Qualitative variables were described by absolute and relative frequency, and quantitative variables as mean and standard deviation or median and interquartile range.

The comparison between average patient age and menopausal age in relation to the group was through the test T. The Fisher exact test was used to associate the presence / absence of hormone receptors (ER and PR) and markers of proliferation / apoptosis (Ki-67 and Bcl-2) with the groups. The comparison of time since menopause in relation to groups and the presence / absence of RP was through the nonparametric test Mann-Whitney.

Analyses were performed using SPSS version 17.0 software and the level of significance in the analyzes was 5%.

2. Results

Results regarding the expression of ER, PR, and proliferation (Ki-67) and apoptosis (Bcl-2) markers in the endometrial polyps of postmenopausal users (group 2) and non-users of tamoxifen (group 1) are displayed in table 1.

ER and PR were identified in the glandular tissue of endometrial polyps in both groups, and no group differences were found on this variable. The mean age of patients in group 1 was 60,91 years, while the mean age in group 2 was of 63,87 years , with no significant differences between groups ($p = 0.360$).

According table 2, The age of menopause did not differ between users ($M = 49.29$ years) and non-users ($M = 49,90$) of tamoxifen ($p = 0.727$).

In relation to the time of menopause and hormone receptor expression, it is observed that in the absence of expression of the progesterone receptor time of menopause (median 28 years) was significantly higher than in the presence of expression (median 9 years), according table 3 ($p=0,026$).

All patients had initially reported to experiencing postmenopausal bleeding, and after ultrasound findings suggestive of endometrial polyps, underwent a hysteroscopy. Time since menopause at the time of hysteroscopic resection of endometrial polyps was 10.50 years (interquartile range 7,00- 21,75) in users of tamoxifen and 8.00 years (interquartile range 3,76-14,00) in non-users ($p=0,161$). An inverse correlation was identified

between duration of menopause and the expression of progesterone receptors, according table 3 ($p = 0.026$).

After hysteroscopic resection, polyps were classified as hyperplastic or atrophic. Atypical hyperplasia and cancer were not observed in any of the cases examined.

3. Discussion

In the present sample, similarities in mean patient age and age of menopause between groups were indicative of a homogenous and representative sample.

The pathogenesis of endometrial polyps is still not well understood, and there is no consensus regarding the treatment of postmenopausal polyps. Biron-Shental T et. al identified endometrial polyps in 25.9% of a sample of postmenopausal breast cancer patients who used tamoxifen. Polyps become malignant in 3-10.7% of cases ^(6, 7, 8, 9).

The role of estrogen in the development of endometrial polyps can be explored by assessing hormone receptors. Studies show a reduced number of progestogen receptors as compared to estrogen receptors in the stromal, but not in the glandular component of polyps ^(10, 11). In the present sample, glandular expression of PR was found in 92.3% of users of tamoxifen and in 96.9% of non-users, ($p=0.499$). A total of 92.3% of polyps in tamoxifen users were ER positive, while all polyps of non-users displayed ER, ($p = 0.295$).

These results demonstrate that, in the present sample, tamoxifen use did not significantly influence the expression of PR and ER in postmenopausal endometrial polyps.

Endometrial polyps may develop due to increased expression of ER, reduced expression of PR, or both ⁽¹⁰⁾. In the present sample, no significant differences were found between the expression of ER and PR in endometrial polyps.

Taylor et al (2003) found that the increased expression of ER in polyps is limited to the glandular epithelium. Although analyses in the present study were limited to the glandular epithelium, the findings are in agreement with those of Taylor et al (2003) ⁽¹¹⁾.

Studies of the pathogenesis of endometrial polyps suggest that an imbalance of estrogen and progesterone may play a role in polyp growth ^(12, 10, 13, 14, 15, 11, 3). Some studies demonstrate a decrease and others an increase in the expression of hormone receptors in polyps.

Almeida et al (2004) assessed hormone receptors in endometrial polyps and the surrounding endometrium in postmenopausal women, and found a higher expression of ER and PR in the polyps, suggesting that low estrogen levels and endometrial atrophy may contribute to polyp development ⁽³⁾. The study concluded that hormone receptors, especially ER, play an important role in the physiopathology of postmenopausal endometrial polyps.

Studies such as those by Mittal et al (1996) and Belisario et al (2006) suggest that, in the absence of high estrogen levels, the increased expression of ER and PR in gland cells may contribute to polyp

development ^(10, 16). These results suggest that the expression of ER and PR differs between the stromal and glandular endometrium in postmenopausal patients.

Koshiyama et al (1996) studied 33 menopausal patients and found a reduction in the number of ER as age increased ⁽¹¹⁾. In the present sample, reductions in hormone receptors were also proportional to the duration of menopause ($p = 0.026$) ⁽¹²⁾.

The present results found that polyps in 75% of tamoxifen users and in 82.8% of non-users expressed Ki-67. The present results are in agreement with the current literature in that no between-group differences were found on Ki-67 expression ⁽¹⁾.

During the normal menstrual cycle, endometrial apoptosis occurs in the middle and the end of the secretory phase, and during the first two days of menstruation. The balance between mitotic activity and apoptosis regulates endometrial development during the menstrual cycle ⁽¹⁷⁾. The expression of Bcl-2 genes is inversely proportional to the level of apoptosis in the tissue. In the present sample, Bcl-2 was expressed in the endometrial polyps of all patients (users and non-users of tamoxifen).

Morsi et al (2000) identified significant Bcl-2 expression in the glandular component of the endometrium in postmenopausal women, in spite of minimal expression in the endometrial stroma ⁽¹⁷⁾. Some studies suggest that endometrial polyp growth occurs due to a decrease in apoptosis, characterized by an increase in Bcl-2 expression ^(11, 19).

4. Conclusion

Longer time since menopause was associated with decreased expression of hormone receptors in endometrial polyps. Immunohistochemical analyses showed that, although tamoxifen use is generally considered a risk factor for developing endometrial polyps, hormone receptor expression did not differ between users and non-users of tamoxifen. No between-group differences were observed in Ki-67 and Bcl-2 expression, and inhibition of apoptosis by Bcl-2 overexpression was observed in all participants. These findings support the theory that polyp growth occurs due to the inhibition of apoptosis rather than to isolated cell proliferation.

In the functional endometrium, apoptosis is related to hormone receptor expression and varies along the menstrual cycle. In postmenopausal women, apoptosis does not appear to be modulated by ER and PR.

REFERENCES

1. McGurgan P., Taylor L.J., Duffy S.R., O'Donovan P.J. Are endometrial polyps from pré-menopausal women similar to post-menopausal women? An immunohistochemical comparison of endometrial polyps from pre-and post-menopausal women. *Maturitas*; 54(2006)277-284.
2. Van Bogaert LJ. Clinicopathologic findings in endometrial polyps. *Obstet Gynecol*; 1988;71(5):771-3.
3. Almeida ECS, Nogueira AA, Reis FJC, Ramalho LNZ, Zucoloto S. Immunohistochemical expression of estrogen and progesterone receptors in endometrial polyps and adjacent endometrium in postmenopausal women. *Maturitas*; 49(2004)229-233.
4. Saidi MH, Sadler RK, Theis VD, Akright BD, Farhat AS, Villanueva GR. Comparison of sonography, sonohysterography, and hysteroscopy for evaluation of anormal uterine bleeding. *J Ultrasound Med*; 1997;16:587-91.
5. Reslova T, Tosner J, Resl M, Kugler R, Vavrova I. Endometrial polyps. A clinical study of 245 cases. *Arch Gynecol Obstet* 1999;262(3/4):133-9.
6. Biron-Shental T, Tepper R, Fishman A, Shapira J, Cohen I. Recurrent endometrial polyps in postmenopausal breast cancer patients on tamoxifen. *Gynecol Oncol* 2003;90:382-6.
7. Schlesinger C, Kamoi S, Ascher s, et al. Endometrial polyps: a comparison study of patients receiving tamoxifen with two control groups. *Int J Gynecol Pathol* 1998;17:302-11.
8. Ramondetta LM, Sherwood JB, Dunton JD, et al. Endometrial cancer in polyps associated with tamoxifen use. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 180:340-1.
9. Cohen I, Perel E, Flex D, et al. Endometrial pathologies in postmenopausal tamoxifen treatment: comparison between gynaecological symptomatic and gynaecological asymptomatic breast cancer patients. *J Clin Pathol* 1999; 52: 278-82.
10. Mittal K, Schawrtz. Estrogen and progesterone receptor expression on endometrial polyps. *Int J Gynecol Pathol* 1996; 15(4); 345-8)
11. Taylor LJ, Jackson TL. The differential expression of ER, PR, Bcl-2 and Ki67 in endometrial polyps. *BJOG* 2003; 110 (9): 794-8)
12. Koshiyama M, Yoshida M, Takemura M, et al. Immunohistochemical analysis of distribution of estrogen receptors and progesteron receptors in the postmenopausal endometrium. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1996;75:702-6.
13. Maia H, Maltez A, Calmon LC, Oliveira M, Marques D, Coutinho EM. Histopathology and steroid receptors in endometrial polyps of

postmenopausal patients under hormone replacement therapy. *Gynaecol Endoscopy* 1998;5:267–72.

14. Thijs I, Neven P, Van Hooff I, et al. Oestrogen and progesterone receptor expression in postmenopausal endometrial polyps and their surrounding endometrium. *Eur J Cancer* 2000;36:S108–9.

15. Bergeron C. Effect of estrogens and antiestrogens on the endometrium. *Gynecol Obstet Fertil* 2002;30:933–7.

16. Belisário M.S.N, Vassallo J, Andrade L.A.L.A, Alvarenga M, Pinto G.A, Monteiro I.M.U. The expression of the hormone receptors in the endometrium and endometrial polyps in postmenopausal women and its relationship to body mass index. *Maturitas* 2006; 53: 114-118

17. Vinatier D, Dufour P, Subtil D. Apoptosis: a programmed cell death involved in ovarian and uterine physiology. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1996;67:85-102.

18. Morsi HM, Leers MP, Jager W, et al. The patterns of expression of an apoptosis-related CK18 neoepitope, the bcl-2 protooncogene, and the Ki-67 proliferation marker in normal, hyperplastic and malignant endometrium. *Int J Gynecol Pathol* 2000;19:118-26.

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

Appendix

Table 1 Prevalence of hormone receptors (ER and PR) and markers of proliferation / apoptosis (Ki-67 and Bcl-2) according to groups

Positive	Group		P
	1	2	
PR	31 (96.9%)	12 (92.3%)	0.499
ER	31 (100.0%)	12 (92.3%)	0.295
KI-67	24 (82.8%)	9 (75.0%)	0.627
Bcl-2	30 (100.0)	12 (100.0)	-

Table 2 Sample characteristics

	Group		P
	1	2	
Age	60.91 ± 10.08	63.86 ± 9.66	0.360
Age of menopause	49.90 ± 4.02	49.29 ± 5.86	0.727
Time since menopause (years)	8.00 (3.75 – 14.00)	10.50 (7.00 – 21.75)	0.161
media±DP median (P25-P75)			

Table 3 Median and interquartile range of menopause time in relation to the presence / absence of expression of the progesterone receptor

	PR		p
	Positive	Negative	
Time since menopause	9.00 (3.50 – 12.50)	28.00 (12.25 – 34.00)	0.026

