

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

**HERMES DE FREITAS BARBOSA**

**Estudo da apoptose no endométrio adjacente aos pólipos e carcinomas do  
endométrio na pós-menopausa**

**RIBEIRÃO PRETO  
2003**

**HERMES DE FREITAS BARBOSA**

**Estudo da apoptose no endométrio adjacente aos pólipos e carcinomas do  
endométrio na pós-menopausa**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de  
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para  
obtenção do título de Mestre em Medicina.

Área de concentração: Tocoginecologia  
Orientador: Prof. Dr. Francisco José Candido  
dos Reis

**RIBEIRÃO PRETO  
2003**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Barbosa, Hermes de Freitas

Estudo da apoptose no endométrio adjacente aos pólipos e carcinomas do endométrio na pós-menopausa. Ribeirão Preto, 2003.

67p. : il. ; 30cm

Dissertação de mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Tocoginecologia.

Orientador: Reis, Francisco José Candido dos.

1. Carcinoma do endométrio. 2. Pólipo endometrial. 3. Apoptose.  
4. Endométrio adjacente.

“Pode-se viver uma vida magnífica,  
quando se sabe trabalhar e amar,  
trabalhar pelo que se ama e amar  
aquilo em que se trabalha.”

Tolstói

## DEDICATÓRIA

Ao meu pai HERMES, exemplo de dedicação à família e que me ensinou que a vida é uma constante luta.

À minha mãe REGINA, de quem herdei garra, humildade e que me incentivou na realização das mais diferentes atividades.

À minha esposa FABIANI, de quem ouvi as palavras certas nos momentos de desânimo e de quem recebi a tolerância nos momentos de ausência. Sempre notei seus passos ao lado dos meus...

À minha filha Luíza, presente de Deus, que faz de cada palavra *pai* em seus lábios uma comemoração pela vida.

## AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e seu Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, por propiciar minha formação profissional e científica.

Ao Prof. Dr. Francisco José Candido dos Reis, orientador e grande mestre, que me apresentou o mundo do conhecimento científico e me proporcionou as ferramentas para que eu dele fizesse parte.

À Profa. Dra. Leandra Naira Zambelli Ramalho, pela presteza e dedicação, inestimável contribuição para realização desta obra.

Ao Prof. Dr. Jesus Paula Carvalho, que apesar do pequeno contato, já na conclusão do trabalho, deixou sua marca de incentivo e respeito.

Ao Prof. Dr. Antonio Alberto Nogueira, com seu jeito amigável, prestativo, eterno mestre.

Ao Prof. Dr. Jurandyr Moreira de Andrade, pela amizade, confiança e contribuição direta na minha formação acadêmica.

À Profa. Dra. Rosana Maria dos Reis, minha assessora, pelo apoio e incentivo para enfrentar as dificuldades do projeto.

Aos professores do Setor de Mastologia e Oncologia Ginecológica, Prof. Dr. Hélio Humberto Angotti Carrara, Prof. Dr. Paulo Meyer de Paula Philbert, Prof. Dr. Sérgio Bighetti, grandes mestres da especialidade.

À Prof. Dra. Maria Matheus de Sala e ao seu sucessor Prof. Dr. Marcos Felipe Silva de Sá, pela dedicação à pós-graduação.

Ao Prof. Dr. Sérgio Pereira da Cunha, pela amizade e pelo aprendizado com sua incomensurável experiência em nossos debates éticos.

Ao médicos Dr. Júlio César Rosa e Silva, Dr. Omero Poli, Dr. Fábio Zola e Dr. Ricardo Cavalli, pela amizade e apoio nesta jornada.

À Sra. Ilza Resende Mazzocato, sempre eficiente na árdua tarefa de vencer os entraves burocráticos.

À Sra. Auristella Martins, pelo apoio na preparação dos cortes histológicos.

A todos os professores, médicos assistentes e funcionários do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia.

Aos colegas da Pós-graduação, companheiros de mesma luta, pela amizade e incentivo.

Aos médicos residentes do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, pelo agradável convívio diário.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro concedido.

À minha irmã Patrícia, pelo carinho e respeito.

A toda minha família.

## RESUMO

BARBOSA, H. F. **Estudo da apoptose no endométrio adjacente aos pólipos e carcinomas do endométrio na pós-menopausa**. 2003. 67p . Dissertação de mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2003.

A apoptose é um mecanismo fundamental para a homeostase do tecido endometrial. No entanto, seu papel no desenvolvimento das lesões benignas e malignas do endométrio não está totalmente esclarecido. O objetivo deste estudo foi avaliar a ocorrência de apoptose nos carcinomas e nos pólipos endometriais e em seus endométrios adjacentes. Foram incluídas 40 pacientes, 15 com adenocarcinoma de endométrio do tipo endometrióide e 25 com pólipo endometrial. A apoptose foi identificada na lesão neoplásica e em seu endométrio adjacente através da coloração de hematoxilina e eosina (HE) e do método TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin Nick End- Labelling) e os resultados foram expressos como índice de apoptose [(número de células em apoptose/ número total de células) X 100]. A mediana do índice de apoptose (IA) pelo método HE foi 1,2% no carcinoma, 1,06% no endométrio adjacente ao carcinoma, 0,54% no pólipo e 0,1% no endométrio adjacente ao pólipo. Pelo método TUNEL, o IA foi 0,73% no carcinoma, 1,05% no endométrio adjacente ao carcinoma, 0,35% no pólipo e 0,06% no endométrio adjacente ao pólipo. Os métodos HE e TUNEL apresentaram um coeficiente de correlação de Spearman ( $r$ ) > 0,6 em todos os grupos. Concluiu-se que o carcinoma de endométrio apresenta índice de apoptose maior do que o pólipo endometrial, e que o endométrio adjacente ao carcinoma apresenta índice de apoptose maior do que o endométrio adjacente ao pólipo endometrial.

Palavras-chave: carcinoma do endométrio; pólipo endometrial; apoptose; endométrio adjacente.

## ABSTRACT

BARBOSA, H. F. **Evaluation of apoptosis in adjacent endometrium at polyps and carcinomas of the endometrium in postmenopause.** 2003. 67p Master's paper – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2003.

Apoptosis is a fundamental mechanism for homeostasis of endometrial tissue. However, its role in the development of benign and malign endometrial lesions is not completely understood. The aim of the study was to evaluate the occurrence of apoptosis in endometrial carcinomas and polyps as well as in their adjacent endometrium. Forty cases were assessed: 15 endometrial adenocarcinomas and 25 endometrial polyps. We identified the apoptosis in neoplastic and adjacent tissue by the Hematoxylin and Eosin (HE) staining and TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin Nick End-Labeling) assay and quantified it by the apoptotic index [(apoptotic cells/ cells) X 100]. Median of apoptotic index (AI) by the HE method was 1,2% in carcinoma, 1,06% in adjacent endometrium at carcinoma, 0,54% in polyp and 0,1% in adjacent endometrium at polyp. By the TUNEL method, the AI was 0,73% in carcinoma, 1,05% in adjacent endometrium at carcinoma, 0,35% in polyp and 0,06% in adjacent endometrium at polyp. The HE and TUNEL methods showed Spearman correlation coefficient ( $r$ ) >0,6 in every groups. We conclude that carcinoma of the endometrium showed apoptotic index greater than in endometrial polyp, and that adjacent endometrium of carcinoma showed apoptotic index greater than in adjacent endometrium at endometrial polyp.

Key words: carcinoma of the endometrium; endometrial polyp; apoptosis; adjacent endometrium.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características gerais das pacientes com câncer e pólipos endometriais .....	22
Tabela 2 - Distribuição dos casos de câncer de acordo com o estágio e grau histológico.....	23
Tabela 3 - Mediana do índice de apoptose (IA) pelo método HE.....	24
Tabela 4 - Mediana do índice de apoptose (IA) pelo método TUNEL.....	26
Tabela 5 - Correlação entre o índice de apoptose obtido pelo método H-E e o índice de apoptose obtido pelo método TUNEL.....	28

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Caraterísticas morfológicas da célula que evolui para necrose ou para apoptose.....	07
Figura 2. Apoptose nas lesões endometriais e endométrio adjacente segundo critérios do método HE.....	25
Figura 3. Apoptose nas lesões endometriais e endométrio adjacente segundo critérios do método TUNEL. ....	27
Lâmina 1. Fotomicrografias de adenocarcinoma de endométrio (A e B) e endométrio adjacente (C e D) apresentando figuras de apoptose nas técnicas de hematoxilina-eosina e de TUNEL, respectivamente (400X).....	44
Lâmina 2. Fotomicrografias de pólipo endometrial (A e B) e endométrio adjacente (C e D) apresentando figuras de apoptose nas técnicas de hematoxilina-eosina e de TUNEL, respectivamente (400X).....	45

## SUMÁRIO

Resumo

Abstract

Lista de tabelas

Lista de ilustrações

1 INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Fisiologia do endométrio na pós-menopausa.....	01
1.2 Os pólipos e o carcinoma endometrial.....	03
1.3 Aspectos gerais da apoptose.....	04
1.4 Apoptose e carcinogênese.....	09
1.5 Apoptose no tecido endometrial.....	11
1.6 O endométrio adjacente nas lesões malignas e benignas.....	12
1.7 Proposição.....	12
2 OBJETIVOS.....	14
3 CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	15
3.1 Modelo de estudo.....	15
3.2 Casuística.....	15
3.2.1 Critério de inclusão.....	16
3.2.2 Critérios de exclusão.....	16

3.3 Métodos.....	16
3.3.1 Propedêutica e tratamento das doenças do endométrio.....	16
3.3.2 Obtenção das amostras para análise histológica.....	18
3.3.3 Avaliação histológica.....	18
3.3.4 Identificação das células em apoptose segundo critérios morfológicos à microscopia óptica.....	19
3.3.5 Identificação das células em apoptose com a utilização da técnica TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin Nick End-Labeling).....	20
3.3.6 Contagem das células e definição do índice de apoptose. ....	20
3.3.7 Banco de dados e análise estatística.....	21
3.3.8 Critérios para a redação do texto.....	21
4 RESULTADOS.....	22
4.1 Caracterização das pacientes.....	22
4.2 Apoptose nas lesões endometriais e endométrio adjacente segundo critérios do método HE.....	23
4.3 Apoptose nas lesões endometriais e endométrio adjacente segundo critérios do método TUNEL.....	26
4.4 Correlação entre o índice de apoptose pelo método HE e pelo método TUNEL.....	28
5 DISCUSSÃO.....	29
6 CONCLUSÕES.....	38
7 REFERÊNCIAS.....	39
Anexo A - Lâminas 1 e 2.....	44
Anexo B- Classificação da OMS para os tumores malignos do endométrio.....	46
Anexo C - Estadiamento do câncer endometrial.....	47

Anexo D - Processamento e preparo das amostras endometriais.....	48
Anexo E - Preparo da coloração Hematoxilina e Eosina.....	49
Anexo F - Preparo do método TUNEL.....	50
Anexo G - Soluções e tampões utilizados.....	52
Anexo H – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRPUSP.....	53

---

## INTRODUÇÃO

---

---

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Fisiologia do endométrio na pós-menopausa

O endométrio no período pós-menopausa é sede de alterações facilmente diagnosticadas com os recursos propedêuticos disponíveis na atualidade. Com o objetivo de se realizar um diagnóstico precoce da neoplasia maligna do endométrio e até de lesões precursoras desta neoplasia, tem-se atualmente o acesso facilitado à cavidade uterina através da ultrasonografia, endoscopia e ressonância magnética. Entretanto, além do câncer de endométrio diagnosticado precocemente, outras tantas lesões são identificadas, tais como as hiperplasias e os pólipos. Estabelecer uma relação de coexistência ou de progressão destas alterações constitui desafio importante, uma vez que é necessário definir condutas terapêuticas precisas frente a estas alterações, evitando-se tratamentos mutilantes como a histerectomia em casos que poderiam ser tratados conservadoramente.

O endométrio pode ser dividido morfológicamente em duas camadas, a camada funcional e a camada basal. O propósito da camada funcional é preparar o endométrio para a implantação do blastocisto. É o sítio de proliferação, secreção e degeneração. A camada basal tem função de permitir a regeneração do endométrio após a perda menstrual da camada funcional. No período pós menopausa, pela ausência de estímulo hormonal, a camada funcional apresenta-

se atrofica, com glândulas escassas formadas por um epitélio baixo e um estroma denso, e a camada basal é de difícil individualização à microscopia óptica.

No final do período reprodutivo observa-se que o endométrio apresenta variantes do quadro normal. A disposição e densidade das glândulas, seu trajeto, largura da luz, altura e maturidade do epitélio glandular oscilam, sem que necessariamente se manifeste um transtorno funcional. Observa-se uma mucosa endometrial de transição em quase 50% de todas as amostras de endométrio examinadas histologicamente em mulheres na peri-menopausa. Com o esgotamento definitivo da função ovariana, observa-se um endométrio em repouso funcional, que nos próximos anos se converterá em endométrio atrofico (DALLENBACH-HELLWEG, 1985). Segundo esta autora, esta atrofia representa o que se poderia chamar de “imagem cristalizada” do último ciclo antes do começo da menopausa, podendo assumir formas diferentes. Quando o último ciclo é ovulatório e as menstruações são regulares, temos uma atrofia simples, com glândulas estreitas, epitélio baixo, núcleos pequenos e não funcionantes, situados em um estroma denso de células fusiformes e traves fibróticas. As artérias espiraladas estão ausentes e a camada funcional não pode ser discriminada da basal ao microscópio óptico. Se os últimos ciclos são anovulatórios e as proliferações endometriais irregulares, encontraremos na menopausa a mesma imagem desta irregularidade proliferativa, sem oposição da progesterona, onde numerosas glândulas císticas dilatadas são observadas e podem ser tomadas por uma hiperplasia glandular cística. O endométrio assume um aspecto de atrofia cística em um epitélio glandular totalmente baixo, não funcional. Portanto, a principal diferença morfológica entre a atrofia simples e cística é a largura de sua luz glandular. Clinicamente, esta diferença não tem importância e ambos os quadros devem ser considerados formas fisiológicas de regressão (DALLENBACH-HELLWEG, 1985). A atrofia cística no endométrio é observada mais frequentemente, em 70% dos casos; 16,3% são de endométrios hiperplásicos ativos e 7,8% de atrofia simples. As demais imagens da

mucosa que são observadas na menopausa, estão condicionadas a produção não fisiológica ou aporte artificial de estrógenos, portanto consideradas proliferações patológicas (DALLENBACH-HELLWEG, 1985).

## **1.2 Os pólipos e o carcinoma endometrial**

Pólipo é um termo apenas descritivo e não denota por si, qualquer processo patológico específico. Por convenção, o termo designa um crescimento focal e circunscrito da mucosa endometrial, geralmente na porção basal e que protrui para dentro da cavidade uterina. Podem assumir forma sésil ou pediculada, estando ligados por uma fina faixa de tecido. A ocorrência e o desenvolvimento dos pólipos endometriais se dá por um amadurecimento irregular da superfície endometrial; correspondem a hiperplasias circunscritas estimuladas hormonalmente e são crescimento da lâmina basal.

Apesar de estruturas benignas, os pólipos endometriais estão associados ao risco de desenvolvimento de câncer de endométrio (ARMÊNIA,1967; BAKOUR; KHAN; GUPTA, 2000; PASTNER, 1998; PETERSON, 1956). Segundo Peterson (1956), 2,7% dos casos de câncer estão associados a pólipos antes da menopausa e, depois da menopausa, a associação chega a 15%. Estudos implicaram o hiperestrogenismo como o agente causal de lesões precursoras do câncer de endométrio (TSENG; GURPIDE, 1975; WOODRUFF; PICKAR, 1994; ZIEL; FINKLE, 1975). Sabe-se porém, que os pólipos endometriais podem se originar em um endométrio inativo ou atrófico e neste ambiente desenvolver um carcinoma; estes casos geralmente ocorrem em mulheres mais idosas e tem um comportamento biológico mais agressivo (FERENCZY; BERTRAND; GELFAND, 1979; KURMAN; SCULLY, 1976; PASTNER, 1998).

A associação entre a presença de pólipos e o risco de desenvolvimento de câncer de endométrio e o fato de que essas lesões podem se originar de um endométrio atrófico faz com que o interesse no estudo da carcinogênese recaia sobre estas lesões. São necessários novos estudos para a identificação de outros fatores predisponentes ou causadores de lesões precursoras do câncer de endométrio, além do hiperestrogenismo.

### **1.3 Aspectos gerais da apoptose**

O termo “Apoptosis” foi criado por Kerr, Wyllie e Currie em 1972. É usado no idioma grego para descrever a “queda” das folhas das árvores e das pétalas das flores. O fenômeno foi descrito como uma forma de morte celular morfológicamente diferente da necrose e presente em diversos fenômenos fisiológicos. A apoptose é responsável pelo controle do tamanho de populações celulares no desenvolvimento embrionário e na diferenciação celular, na metamorfose e nos processos atróficos mediados por hormônios, como os que ocorrem com o endométrio na pós-menopausa. Dentro deste contexto, a apoptose presta-se a eliminar células senescentes, doentias ou alteradas geneticamente, como uma resposta defensiva inata do organismo para a manutenção da homeostasia tissular (GERSCHENSON; ROTELLO, 1992; GOLDSWORTHY; CONOLLY; FRANSSON-STEEN, 1996 b).

Na apoptose ocorre uma série de alterações morfológicas seqüenciais, caracterizadas por: compactação e fragmentação da cromatina, com formação de massas granulares bem circunscritas, que margeiam a membrana nuclear; condensação citoplasmática com marcada eosinofilia; convolução das membranas citoplasmática e nuclear com posterior cariorrexia em fragmentos envoltos por carioteca; emissão de brotos celulares que se fragmentam, dando origem aos corpos apoptóticos; fagocitose desses corpos por células vizinhas, por macrófagos ou a sua

eliminação no lúmen de estruturas tubulares (DAVES; RYAN, 1998; GERSCHENSON; ROTELLO, 1992; GOLDSWORTHY; FRANSSON-STEEN; MARONPOT, 1996 a; WYLLIE; KERR; CURRIE, 1980).

O processo de apoptose é distinto do processo de necrose tanto do ponto de vista morfológico quanto bioquímico. A necrose, também conhecida como morte acidental, é gerada por um processo patológico, causa um processo inflamatório e ativação de enzimas lisossomais. A apoptose, referendada como morte celular programada caracteriza-se pela ausência de processo inflamatório e a ativação de endonucleases com quebra de DNA endógeno caracterizando processo fisiológico (DUKE; OJEIUS; YOUNG, 1996; UEDA; SUDHIR, 1994). Existem muitas diferenças entre os dois tipos de morte celular e para melhor compreensão, estas diferenças estão resumidas na Quadro 1 e ilustradas na figura 1.

Quadro 1 - Diferenças morfológicas e bioquímicas entre apoptose e necrose

	<b>Apoptose</b>	<b>Necrose</b>
<b>Distribuição no tecido</b>	Células isoladas	Grupo de células
<b>Reação tissular</b>	Fagocitose	Exsudato celular
<b>Alterações morfológicas</b>	Redução do volume celular	Edema celular
	Organelas intactas	Organelas danificadas
	Cromatina condensada	Cromatina fragmentada
	Citoplasma condensado	Citoplasma fragmentado
	Membrana intacta	Membrana danificada
<b>Alterações bioquímicas</b>	Ativação de endonucleases	Destruição por bombeamento iônico
	Quebra do DNA	Ativação de enzimas lisossômicas
<b>Liberação de enzimas lisossômicas</b>	Não	Sim
<b>Estrutura celular</b>	Fragmentos envoltos por membrana	Ruptura celular
<b>Processo inflamatório</b>	Ausente	Presente

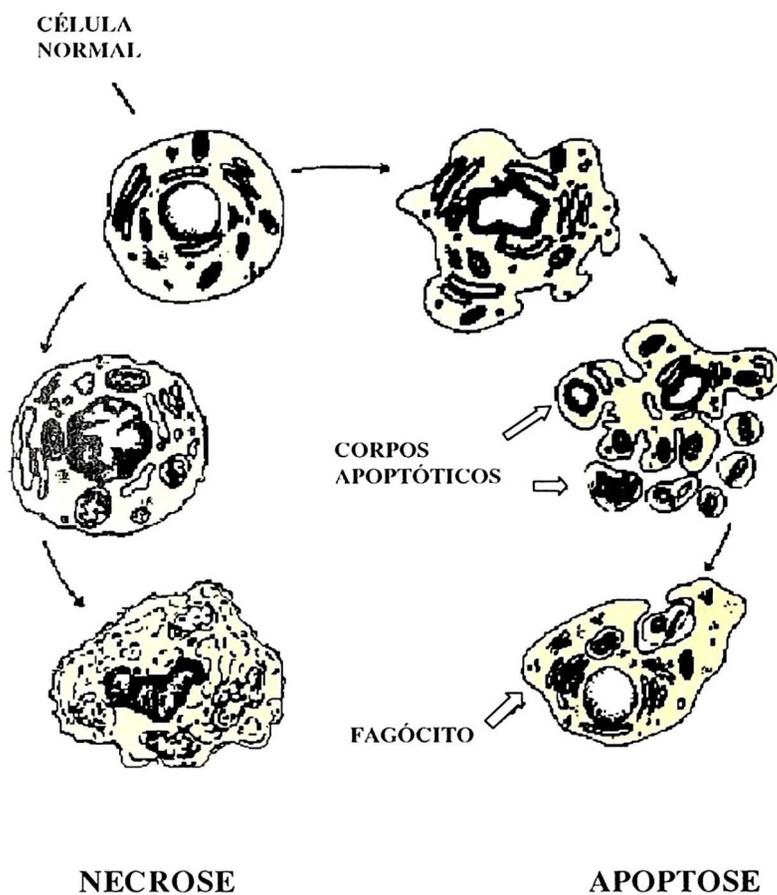


Figura 1. Características morfológicas da célula que evolui para necrose ou para apoptose (UEDA; SUDHIR, 1994)

Há três diferentes mecanismos que podem dar início ao processo apoptótico. A via intrínseca, ou mitocondrial, é iniciada dentro da célula, na membrana externa da mitocôndria, através da liberação de citocromo *c* e Apaf-1, que irão ativar a caspase 9 que por sua vez ativará toda a cascata de caspases iniciadoras. A via extrínseca é iniciada com a ligação de ativadores de

morte celular em proteínas de superfície (JÄÄTTELÄ, 1999). Em um terceiro mecanismo a célula possui uma via de auto-destruição, parecida com as vias descritas anteriormente, mas não utilizam as caspases; esta via se inicia com a liberação do fator de indução da apoptose (AIF), proteína produzida nos espaço intermembranoso da mitocôndria, que se liga ao DNA e inicia sua destruição e morte celular (JOZA et al., 2001).

Tanto a via intrínseca como a via extrínseca convergem para uma via final comum que é a ativação de uma família de proteases, as caspases. Elas têm esse nome porque clivam as proteínas em resíduos de ácido aspártico (aspartic acid – Asp). Segundo Huppertz et al. (1999), a cascata do processo apoptótico pode ser dividida em 3 estágios: iniciação, execução e morte celular. A iniciação começa com a indução da cascata através da interação entre receptor (receptor de morte celular) e indutores da apoptose. A ativação destes receptores forma um sinal complexo que ativa as caspases. As caspases provocam eventos proteolíticos, como a clivagem do citoesqueleto e a degradação de uma variedade de proteínas, entre elas a vimentina e a fodrina. Na seqüência, as caspases iniciadoras levam à clivagem ou modificação espacial da fosfatidilserina, que promove a atração de macrófagos, indução da cascata da coagulação e da fusão sincicial. As caspases iniciadoras também ativam as caspases executoras, iniciando o segundo passo, a execução, que são reguladas através da proteína Bcl-2. Sabe-se que, uma vez iniciado, o processo é irreversível. Logo após, ocorre a ativação de proteases levando ao processo de degradação de uma variedade de proteínas, resultando em danos irreversíveis para a célula, inclusive com degradação de proteínas do envelope nuclear (HUPPERTZ et al., 1999). Na seqüência, as caspases ativam endonucleases e o ácido dextrorribonucleico (DNA) é fragmentado. O tempo deste processo pode demorar de minutos a horas, dependendo do tipo de tecido e do estado funcional da célula. A morte celular apoptótica é o resultado da complexa cascata que resulta no colapso nuclear e citoplasmático, em que o material foi degradado na ausência de processo inflamatório, gerando os

corpos apoptóticos. Para Amarante-Mendes e Green (1999) haveria um quarto estágio, o enterro, no qual observa-se a organização e eliminação de células apoptóticas sem qualquer dano secundário ao microambiente extracelular.

Como visto, a resposta apoptótica é uma cascata complexa, altamente organizada, de eventos moleculares que culminam na clivagem internucleossômica do DNA em fragmentos com várias unidades de pares de base, resultando na desorganização dos componentes estruturais da célula.

#### **1.4 Apoptose e carcinogênese**

Na proliferação e diferenciação, a morte celular programada é um importante processo no desenvolvimento tecidual, responsável pela eliminação de células com alterações no DNA. No tecido adulto o processo de apoptose é fenômeno fisiológico e ativo, mantém a homeostase, elimina as células mutadas, possui um papel importante na regressão de lesões hiperplásicas induzidas por estímulos proliferativos e seu bloqueio é crítico no processo da carcinogênese (KORSMEYER et al., 1992).

Células tumorais expressam várias proteínas que lhes permitem resistir ao processo de apoptose. Bcl-2 é a proteína anti-apoptótica mais estudada e foi originalmente descoberta em linfomas nos quais o gene bcl-2 é translocado para um locus de uma imunoglobulina de cadeia pesada, resultando em super-expressão em células B (TSUJIMOTO et al., 1985). O potencial oncogênico do bcl-2 foi verificado em vários modelos transgênicos. Ao contrário de outros oncogenes conhecidos até o momento, o bcl-2 não é capaz de estimular crescimento, mas aumenta a sobrevivência da célula em condições sub-ótimas por inibir a apoptose (VAUX, 1988). Este achado identificou a inibição da apoptose como um importante mecanismo de iniciação do

câncer e revolucionou o estudo da tumorigênese. Estima-se que níveis aumentados da proteína Bcl-2 podem ser detectadas em aproximadamente 50% dos tipos de câncer humano, o que enfatiza a importância da inibição da apoptose como um passo fundamental na carcinogênese humana (REED, 1997). A super-expressão de bcl-2 não é limitado a linfomas de células B com a translocação cromossômica t(14;18), sendo um achado comum em vários tipos de câncer humano, incluindo outras neoplasias hematológicas, carcinomas de mama, próstata, ovário, cólon e pulmão.

Acredita-se que o bcl-2 contribua para o desenvolvimento neoplásico por permitir o acúmulo de mutações genéticas (TASKIN et al., 1997; YAMAUCHI et al., 1996). Surpreendentemente este é o caso de apenas um grupo de neoplasias malignas incluindo certos tipos de leucemia, linfoma e câncer de próstata, enquanto a expressão de bcl-2 em adenocarcinoma é mais freqüentemente um marcador de aumento da sobrevivência e, em alguns casos, de uma melhor resposta à terapia. Isto ocorre porque sua atuação é fortemente regulada pela interação com outras proteínas relacionadas, que fazem parte da família de proteínas Bcl-2, dividida em proteínas anti-apoptóticas fortemente relacionadas à Bcl-2 (Bcl-x, Bcl-2, Mcl-1, Al, e Boo) e proteínas pró-apoptóticas mais fracamente relacionadas (Bax, Bak, Bok, Bik, Blk, Hrk, BNIP3, Bim, Bad, Bid e Diva). Dados experimentais sugerem que a razão entre membros anti-apoptóticos e pró-apoptóticos da família Bcl-2 é melhor determinante de sensibilidade celular à apoptose que níveis de expressão de membros individuais. A falta da correlação esperada entre a expressão de Bcl-2 e pior prognóstico em muitos tipos de câncer pode ser devida a baixos níveis de expressão de outros membros da família.

### 1.5 Apoptose no tecido endometrial

No endométrio humano, a apoptose ocorre predominantemente nas fases secretória e menstrual, e está relacionada a alterações na expressão de bcl-2 e Bax (MORSI et al., 2000; VASKIVUO et al., 2000). A expressão de bcl-2 parece ser ciclo-dependente, sendo aumentada no endométrio proliferativo, diminuída na fase secretória e muito baixa ou ausente na fase secretória tardia e menstrual. No período pós menopausa a ocorrência de apoptose e seu significado no endométrio atrófico ainda não está bem definido, devido aos poucos estudos disponíveis na literatura. Mourits et al. (2002), ao estudar pacientes na pós-menopausa em uso de tamoxifeno e comparar com pacientes sem tratamento, verificou maior ocorrência de apoptose no endométrio atrófico de pacientes do primeiro grupo.

O estudo da apoptose, sua regulação na hiperplasia endometrial e sua correlação com a progressão para carcinoma de endométrio têm despertado interesse nos últimos anos. Morsi et al. (2000) concluiu que a progressão de hiperplasia endometrial para carcinoma de endométrio envolve um aumento da apoptose e diminuição da expressão de bcl-2. No carcinoma de endométrio a expressão de bcl-2 é inversamente proporcional ao grau de diferenciação (MORSI et al., 2000; TASKIN et al., 1997; YAMAUCHI et al., 1996). Alguns autores encontraram que a super-expressão de bcl-2 é rara na hiperplasia endometrial e no carcinoma de endométrio, sendo menos intensa que no endométrio proliferativo normal (NIEMANN et al., 1996); além disso a expressão de bcl-2 está relacionada inversamente com fatores prognósticos reconhecidos universalmente, tais como profundidade de invasão, grau histológico e estadiamento da Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO) (GEISLER et al., 1998). A transformação do endométrio proliferativo em endométrio hiperplásico e posteriormente em carcinoma de endométrio envolve uma diminuição de Bcl-2 e um aumento da apoptose.

## **1.6 O endométrio adjacente nas lesões malignas e benignas**

O endométrio adjacente às lesões malignas e benignas do endométrio tem despertado o interesse dos pesquisadores na última década. O endométrio adjacente ao pólipo se mostrou uma fonte intrigante de questionamentos quando se percebeu que, na pós menopausa, enquanto os pólipos apresentavam freqüentemente hiperplasia, o endométrio adjacente apresentava um padrão atrófico (MAIA Jr. et al., 1997). Este fato levou à hipótese de que esta hiperplasia não estaria associada a altos níveis de estrogênio e novos estudos envolvendo o endométrio adjacente seriam necessários para estabelecer o mecanismo celular envolvido no desenvolvimento do pólipo. Em estudo conduzido por Peiro et al. (2001), o endométrio adjacente ao carcinoma de endométrio se apresentou atrófico em 43% dos casos, com hiperplasia simples sem atipias em 18% dos casos e com hiperplasia complexa, com ou sem atipias, em 39% dos casos, o que mostra uma grande variação no espectro de alterações histopatológicas. Da mesma forma que nos pólipos, novos estudos envolvendo o endométrio adjacente ao carcinoma são necessários para avaliar os mecanismos envolvidos na gênese e progressão das lesões do endométrio.

## **1.7 Proposição**

Os achados de aumento da apoptose e diminuição da expressão de bcl-2 nas lesões carcinomatosas podem parecer paradoxais quando se estuda a carcinogênese neste tecido. Entretanto, conforme discutido anteriormente, este achado pode ser devido a altos níveis de expressão de outros membros (pró-apoptóticos) da família bcl-2. Além disso, trata-se de um tecido anárquico, em que os rígidos controles da homeostasia tissular não estão presentes e o

processo de carcinogênese já está bem estabelecido. Por conta disso, a análise do processo de apoptose em tecidos que ainda não sofreram com a perda da homeostasia tissular, pode dar contribuições ao estudo da carcinogênese no endométrio.

Desta forma, propôs-se o estudo da apoptose em amostras de carcinoma endometrial e de seu endométrio adjacente e em amostras de pólipos endometriais e seu endométrio adjacente, uma vez que os fatores que levam um endométrio atrófico a se proliferar e desenvolver uma hiperplasia, um pólipo ou um carcinoma ainda não são totalmente conhecidos.

---

## OBJETIVOS

---

---

## **2 OBJETIVOS**

- Avaliar a ocorrência de apoptose no endométrio adjacente aos pólipos e carcinomas do endométrio.
  
- Avaliar a ocorrência de apoptose nos pólipos e nos carcinomas do endométrio.

---

## **CASUÍSTICA E MÉTODOS**

---

---

### **3 CASUÍSTICA E MÉTODOS**

#### **3.1 Modelo de estudo**

Foi realizado um estudo observacional do tipo transversal.

#### **3.2 Casuística**

Foram incluídas 40 pacientes, sendo 25 com diagnóstico de pólipos endometriais e 15 pacientes com diagnóstico de carcinoma de endométrio do tipo endometrióide. Estas pacientes foram submetidas a tratamento cirúrgico, no período de janeiro de 1999 a novembro de 2002.

O estudo foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRPUSP), processo nº 9610/2003 (Anexo H).

### **3.2.1 Critérios de inclusão**

Foram incluídas no estudo: pacientes que tinham diagnóstico de pólipo ou carcinoma endometriais e que estavam na pós-menopausa, definida como um ano após a cessação da menstruação, segundo critério de Lima e Baracat (1995); pacientes que não faziam uso de terapia de reposição hormonal há pelo menos três meses, a fim de se descartar sua influência no processo de apoptose; e pacientes em que foi possível obter endométrio adjacente para análise.

### **3.2.2 Critérios de exclusão**

Foram excluídas do estudo: pacientes cujas lâminas após o preparo não apresentaram amostragem de glândulas satisfatória para análise do endométrio adjacente; pacientes com tumor não endometrióide; e pacientes com tumor indiferenciado ( grau III).

## **3.3 Métodos**

### **3.3.1 Propedêutica e tratamento das doenças do endométrio**

Todas as pacientes, assintomáticas ou com sangramento na pós-menopausa, que tinham alterações endometriais à ultra-sonografia, foram submetidas a histeroscopia diagnóstica. As lesões polipóides foram biopsiadas com pinça de histeroscopia e as lesões suspeitas de malignidade foram biopsiadas com pinça de histeroscopia ou com cureta de Novak

As pacientes com diagnóstico de pólipo endometrial foram submetidas à histeroscopia cirúrgica, sob raquianestesia, para exérese do pólipo e biópsia do endométrio adjacente com o ressectoscópio.

As pacientes com diagnóstico de carcinoma endometrial foram submetidas a intervenção cirúrgica por via laparoscópica, sob anestesia geral. Esta intervenção seguiu os seguintes passos: obtenção de amostras de líquido ascítico ou lavado peritoneal com solução fisiológica para citologia; avaliação de toda a cavidade abdominal, com inspeção cuidadosa de toda a superfície peritoneal e remoção ou biópsia dos implantes suspeitos, se encontrados; realização de histerectomia total e salpingooforectomia bilateral; após a retirada da peça, realização de avaliação macroscópica fora do campo operatório para determinar se havia área de invasão observável; nos casos em que havia invasão profunda do miométrio ou do canal endocervical, realização de linfadenectomia pélvica.

O estadiamento foi feito segundo critérios da Federação Internacional de Ginecologia e Obstetria (FIGO) (SHEPHERD, 1989) (Anexo C).

As histeroscopias diagnósticas e cirúrgicas foram realizadas com equipamento Storz® com sistema óptico de 5 mm de diâmetro e visão de 30 °. Para as histeroscopias diagnósticas utilizou-se o CO<sub>2</sub> como meio de distensão da cavidade uterina. Para as histeroscopias cirúrgicas utilizou-se, como meio de distensão e irrigação intra uterina, o manitol a 3%, cujo controle de pressão e fluxo intra uterino fora realizado pela bomba de infusão Endomat ®; o sistema óptico de 5 mm foi acoplado em um elemento de trabalho acoplado a alça diatérmica para ressecção (ressectoscópio) que perfaz um diâmetro total de 10 mm. As laparoscopias foram realizadas com equipamento Storz® com sistema óptico de 10mm de diâmetro e visão de 90°, utilizando o CO<sub>2</sub> como meio de distensão da cavidade abdominal.

### 3.3.2 Obtenção das amostras para análise histológica

As amostras de pólipo endometrial e de seu endométrio adjacente foram obtidas através de histeroscopia cirúrgica, utilizando-se o ressectoscópio. As amostras de carcinoma de endométrio e de seu endométrio adjacente foram obtidas imediatamente após a retirada da peça cirúrgica durante a laparoscopia. O material foi enviado ao Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, onde foi incluído em parafina (Anexo D).

### 3.3.3 Avaliação histológica

A partir dos blocos de parafina correspondentes aos fragmentos mais representativos de cada lesão foram feitos cortes histológicos de 4 $\mu$ m (micrótomo Spencer, modelo 820, série nº 17.797) que foram colocados em lâminas de vidro (Anexo F). Realizou-se a coloração Hematoxilina e Eosina (HE) (Anexo E) para confirmação diagnóstica. Os casos de carcinoma de endométrio foram classificados segundo critérios histológicos da OMS (ODICINO, 2001) e o grau histológico determinado segundo critérios da FIGO (ZAINO et al., 1995). Os critérios utilizados para diagnóstico de pólipo endometrial foram a presença de um crescimento focal e circunscrito da mucosa endometrial contendo vasos sanguíneos de parede espessa e estroma fibroso (HENDRICKSON, 1980). A identificação da apoptose foi realizada pela coloração HE nos 40 casos incluídos. Utilizou-se também a coloração pelo método TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin Nick End-Labeling) (Anexo F) em 13 casos de câncer e 15 casos de pólipo. Verificou-se então a ocorrência de apoptose no pólipo endometrial e no endométrio adjacente, e

no carcinoma de endométrio e no endométrio adjacente. Todos os casos foram avaliados por dois pesquisadores.

### **3.3.4 Identificação das células em apoptose segundo critérios morfológicos à microscopia óptica**

A identificação das células em apoptose foi realizada em lâminas coradas pela hematoxilina-eosina. Esta metodologia está em consonância com as de outros autores que têm se apoiado na coloração HE para a identificação de células em apoptose. Os critérios morfológicos adotados para a identificação e quantificação da apoptose foram (MOURITS et al., 2002; STAUNTON & GAFFNEY, 1995; WYLLIE et al., 1980):

- corpúsculo arredondado simples com citoplasma condensado, fortemente eosinofílico, com um agrupamento simples de material fortemente basofílico representando a condensação da cromatina;
- fragmentação da cromatina com citoplasma ao redor formando os corpos apoptóticos intracelulares;
- os corpos apoptóticos espalhados no lúmen glandular não foram contados porque eles podem persistir no lúmen por tempo indefinido; também não foram contados em áreas necróticas ou na presença de reação inflamatória ao redor;
- as células em apoptose foram cuidadosamente diferenciadas de linfócitos picnóticos, fragmentos de leucócitos polimorfonucleares e células em mitose.

### **3.3.5 Identificação das células em apoptose com a utilização da técnica TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin Nick End-Labeling)**

O “DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System”, da Promega, marca os terminais fragmentados do DNA de células apoptóticas usando um ensaio TUNEL modificado. Um nucleotídeo biotilado (biotina) é incorporado ao terminal 3'-OH do DNA usando a enzima Terminal deoxinucleotídeo Transferase (TdT). A estreptavidina é então ligada ao nucleotídeo biotilado, formando o complexo estreptavidina-biotina. Este complexo é revelado por um cromógeno estável, a diaminobenzidina (DAB). Com este processo, os núcleos apoptóticos são marcados com uma coloração marrom escura.

### **3.3.6 Contagem das células e definição do índice de apoptose**

A contagem das células foi realizada utilizando-se um microscópio óptico Zeiss®, com uma objetiva de 40X e ocular integradora de 1mm<sup>2</sup> de 10X (aumento total de 400X). Para cada caso, foram contadas todas as células epiteliais nos 10 campos mais representativos do tecido glandular não necrótico e identificadas as células em apoptose; o índice apoptótico foi definido com sendo a razão entre o número de células apoptóticas e o número total de células contadas (com um mínimo de 1000 células contadas), expresso em porcentagem (MOURITS et al., 2002).

### **3.3.7 Banco de dados e análise estatística**

Os dados foram armazenados em um banco de dados criado com auxílio do software Microsoft Access 2002® e as diversas correlações foram estabelecidas por consultas a este banco de dados. Os cálculos foram efetuados em planilhas construídas com o auxílio do software Microsoft Excel 2002® e as análises estatísticas dos resultados foram realizadas com auxílio do software GraphPad Prism 3.00®. Foram utilizados o teste de Mann Whitney, para análise de variáveis numéricas não paramétricas, o teste exato de Fisher, para análise de variáveis qualitativas, e o teste de correlação de Spearman para avaliar a correlação entre os índices de apoptose obtidos nos métodos HE e TUNEL. Estabeleceu-se 0,05 como nível de significância.

### **3.3.8 Normas para a redação do texto**

A redação deste texto foi realizada segundo as diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP (UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 2003).

---

## **RESULTADOS**

---

---

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Caracterização das pacientes

As pacientes com diagnóstico de câncer de endométrio apresentaram a idade com mediana de 67 anos (53-90) e as pacientes com pólipos endometriais mediana de 60 anos (49-75) ( $P=0,006$ ; teste de *Mann-Whitney*). O tempo de menopausa nas pacientes com câncer teve mediana de 20 anos (1-45) e nas pacientes com pólipos, mediana de 10 anos (2-37) ( $P=0,02$ ; teste de *Mann-Whitney*). Quanto ao número de gestações prévias, as pacientes com câncer apresentaram mediana de 3 (0-14) e as pacientes com pólipos, mediana de 4 (0-14) ( $P=0,95$ ; teste de *Mann-Whitney*). A presença de sangramento pós-menopausa como queixa principal foi observada em 12 (80%) pacientes com câncer e em 7 (28%) pacientes com pólipos [*Odds Ratio*=10,3 (IC 95%: 2,4 – 51,4)  $P=0,001$ ; teste exato de *Fisher*] (Tabela 1).

Tabela 1 - Características gerais das pacientes com câncer e pólipos endometriais

	Câncer (n=15)	Pólipo (n=25)	P
Idade (anos)	67 (53-90)	60 (49-75)	0,006
Número de gestações	3 (0-14)	4 (0-14)	ns
Tempo de menopausa (anos)	20 (1-45)	9 (2-37)	0,02
Sangramento	12 (80%)	7 (28%)	0,001

Nenhum dos 25 casos de pólipo endometrial incluídos apresentavam atipias celulares, 21(84%) apresentavam endométrio adjacente atrófico e 4 endométrio adjacente proliferativo.

Todos os 15 casos de câncer incluídos foram do tipo adenocarcinoma endometrióide. Após o estadiamento cirúrgico, 3 casos estavam no estágio IA, 8 casos IB, 1 caso IC, 1 caso IIA, 1 caso IIB, 1 caso IIIC. Quanto ao grau de diferenciação, 12 casos foram classificados como grau I e 3 casos como grau II (Tabela 2). Quanto à classificação do endométrio adjacente, 10 apresentavam endométrio atrófico, 1 hiperplasia simples sem atipias, 1 hiperplasia complexa sem atipias, 1 hiperplasia simples com atipias, 2 hiperplasia complexa com atipia.

Tabela 2 - Distribuição dos casos de câncer de acordo com o estágio e grau histológico

Estádio	IA	IB	IC	IIA	IIB	IIIC
Grau histológico 1	2	7	2	1	0	0
Grau histológico 2	1	0	0	0	1	1

#### 4.2 Apoptose nas lesões endometriais e endométrio adjacente segundo critérios do método HE

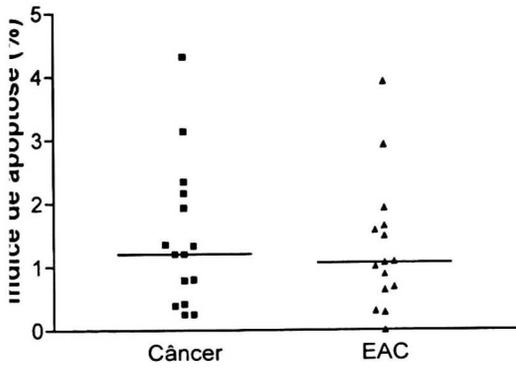
O índice de apoptose no câncer de endométrio teve mediana de 1,2% (0,25 – 4,3) e no endométrio adjacente 1,06% (0 – 3,9) ( $P=0,71$ ; Mann-Whitney). O índice de apoptose no pólipo endometrial teve mediana de 0,54% (0 – 1,3) e no endométrio adjacente 0,1% (0 – 0,9) ( $P=0,0002$ ; Mann-Whitney) (Tabela 3, Figuras 2A e 2B, Lâminas 1A, 1C, 2A e 2C do anexo A).

Tabela 3 - Mediana do índice de apoptose (IA) pelo método HE

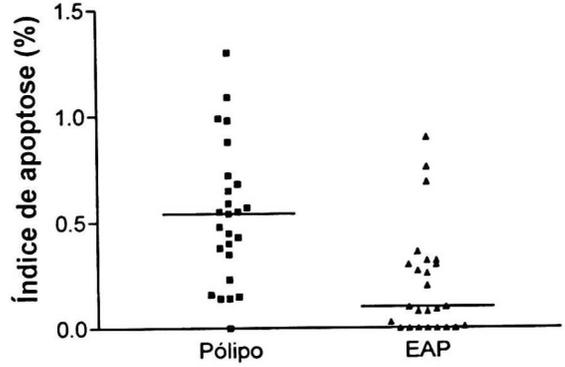
Pacientes	Lesão IA(%)	Endométrio adjacente IA(%)	<i>P</i>
Câncer (n=15)	1,2 (0,25 – 4,3)	1,06 (0 – 3,9)	ns
Pólipo (n=25)	0,54 (0 – 1,3)	0,1 (0 – 0,9)	0,0002

Ao comparar o índice de apoptose encontrado no câncer e o encontrado no pólipo endometrial obteve-se uma diferença estatisticamente significativa ( $P=0,004$ ; Mann-Whitney) (Figura 2C).

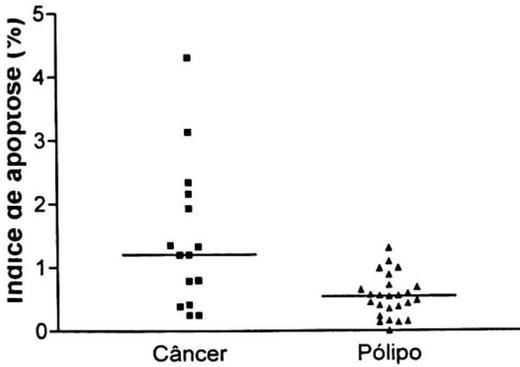
Por fim, a comparação entre o índice de apoptose no endométrio adjacente ao câncer e no endométrio adjacente ao pólipo também mostrou uma diferença estatisticamente significativa ( $P<0,0001$ ) (Figura 2D).



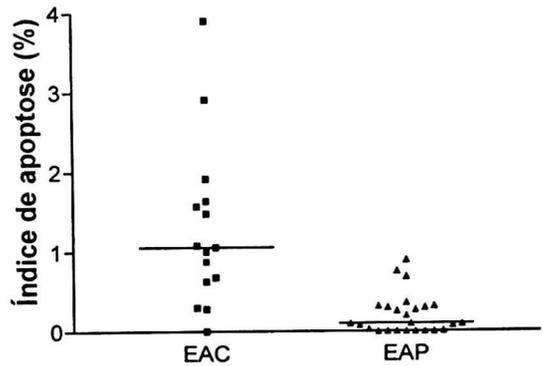
A Mann-Whitney,  $P = 0,71$



B Mann-Whitney,  $P = 0,0002$



C Mann-Whitney,  $P = 0,004$



D Mann-Whitney,  $P < 0,0001$

Figura 2. Apoptose nas lesões endometriais e endométrio adjacente segundo critérios do método HE  
EAC: endométrio adjacente ao câncer. EAP: endométrio adjacente ao pólipo

### 4.3 Apoptose nas lesões endometriais e endométrio adjacente segundo critérios do método TUNEL

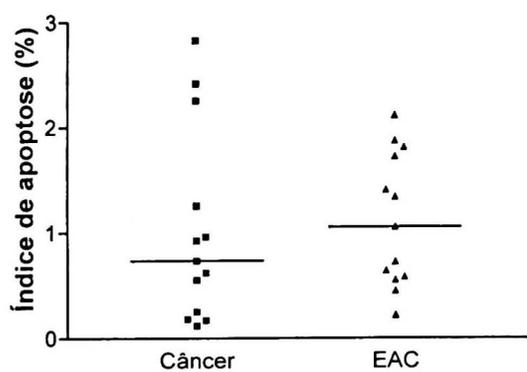
O índice de apoptose no carcinoma de endométrio teve mediana de 0,73% (0,12 – 2,81) e no endométrio adjacente 1,05% (0,22 – 2,1) ( $P=0,52$ ; Mann-Whitney). O índice de apoptose no pólipo endometrial teve mediana de 0,35% (0 – 1,3) e no endométrio adjacente 0,06% (0 – 0,82) ( $P=0,03$ ; Mann-Whitney) (Tabela 4, Figuras 3A e 3B, Lâminas 1B, 1D, 2B e 2D do anexo A).

Tabela 4 - Mediana do índice de apoptose (IA) pelo método TUNEL

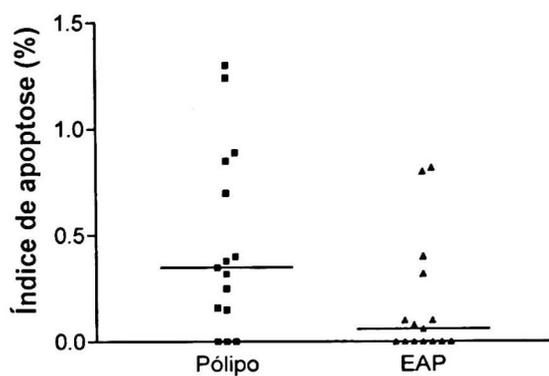
Pacientes	Lesão IA(%)	Endométrio adjacente IA(%)	<i>P</i>
Câncer (n=15)	0,73 (0,12 – 2,81)	1,05 (0,22 – 2,1)	ns
Pólipo (n=25)	0,35 (0 – 1,3)	0,06 (0 – 0,82)	0,03

Ao comparar o índice de apoptose encontrado no câncer e o encontrado no pólipo endometrial obteve-se uma diferença estatisticamente significativa ( $P=0,04$ ; Mann-Whitney) (Figura 3C).

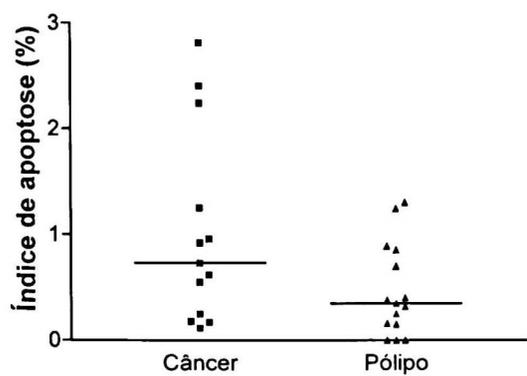
Por fim, a comparação entre o índice de apoptose no endométrio adjacente ao câncer e no endométrio adjacente ao pólipo também mostrou uma diferença estatisticamente significativa ( $P<0,0001$ ) (Figura 3D).



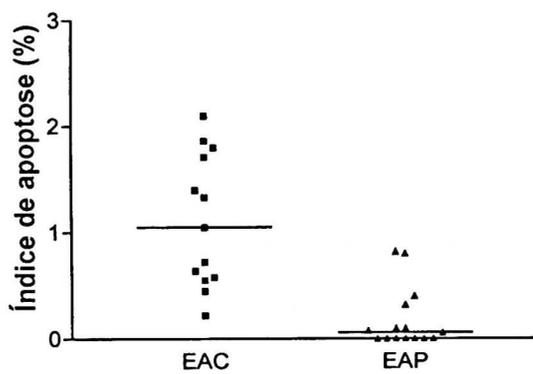
A Mann-Whitney,  $P = 0,52$



B Mann-Whitney,  $P = 0,03$



C Mann-Whitney,  $P = 0,04$



D Mann-Whitney,  $P < 0,0001$

Figura 3. Apoptose nas lesões endometriais e endométrio adjacente segundo critérios do método TUNEL. EAC: endométrio adjacente ao câncer, EAP: endométrio adjacente ao pólipo

#### 4.4 Correlação entre o índice de apoptose pelo método HE e pelo método TUNEL

Dos 15 casos de câncer incluídos, 13 casos foram estudados tanto pelo método HE, quanto pelo método TUNEL. Dos 25 casos de pólipos endometriais incluídos, 15 foram estudados pelos dois métodos. Para a comparação, utilizou-se de análise estatística para se estabelecer o coeficiente de correlação de Spearman ( $r$ ) entre o índice de apoptose (IA) obtido com o HE e o índice obtido com o método TUNEL. Os resultados obtidos para o câncer tiveram  $r=0,88$  (IC 95%: 0,64 – 0,97;  $P<0,0001$ ); para o endométrio adjacente (EA) ao câncer  $r=0,64$  (IC 95%: 0,11 – 0,88;  $P=0,02$ ); para o pólipo  $r=0,61$  (IC 95%: 0,11 – 0,84;  $P=0,045$ ); para o endométrio adjacente (EA) ao pólipo  $r=0,62$  (IC 95%: 0,14 – 0,86;  $P=0,01$ ) (Tabela 5).

Tabela 5 – Correlação entre o índice de apoptose obtido pelo método H-E e o índice de apoptose obtido pelo método TUNEL,  $r$  = coeficiente de correlação de Spearman

	$r$	$P$
Câncer	0,88	<0,0001
EA – câncer	0,64	0,02
Pólipo	0,61	0,045
EA – pólipo	0,62	0,01

---

## **DISCUSSÃO**

---

---

---

## 5 DISCUSSÃO

A apoptose é um dos mecanismos responsáveis pelo controle do tamanho de populações celulares no desenvolvimento embrionário e na diferenciação celular, na metamorfose e nos processos atróficos mediados por hormônios, como os que ocorrem com o endométrio na pós-menopausa. Além do papel desempenhado na manutenção da homeostasia tissular em tecidos normais, a apoptose ocorre também em tecidos neoplásicos e seu significado biológico nestes tecidos tem sido objeto de estudo.

A primeira dificuldade encontrada no estudo da apoptose é a escolha do método para sua identificação. A apoptose foi inicialmente identificada por microscopia eletrônica e microscopia ótica por Kerr, Willie e Currie (1972) e desde então novos métodos vêm sendo descritos. A partir do conhecimento dos eventos moleculares envolvidos no processo de apoptose, surgiram técnicas de imuno-histoquímica para sua identificação, sendo a técnica do TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin Nick End- Labelling) a mais difundida. Em nosso estudo, a identificação de células em apoptose através da coloração de hematoxilina e eosina (HE) se mostrou tão eficiente quanto à identificação com o método TUNEL, conforme ratificado nas análises de correlação e na semelhança dos resultados. Ao comparar os resultados obtidos para o câncer, o endométrio adjacente ao câncer, o pólipso e o endométrio adjacente ao pólipso, obteve-se respectivamente um coeficiente de correlação de Spearman ( $r$ ) de 0,88 ( $P<0,0001$ ), 0,64

( $P=0,02$ ),  $0,61$  ( $P=0,045$ ) e  $0,62$  ( $0,01$ ). Esta concordância já parecia evidente quando da análise dos cortes; a maior parte das células apoptóticas coradas com o método TUNEL já apresentavam alterações morfológicas passíveis de serem identificadas com a coloração HE. Drachenberg, Ioffe e Papadimitriou (1997), ao estudarem apoptose em 16 cortes histológicos de adenocarcinoma de próstata de pacientes não tratados previamente observaram que os resultados obtidos com o método HE tinham o mesmo alcance do método TUNEL. Esta opinião é compartilhada por outros autores, que utilizaram a coloração HE para a identificação de células apoptóticas em endométrio (STAUNTON; GAFFNEY, 1995; MOURITS et al., 2002). Alguns autores descrevem que eventualmente são vistas figuras típicas de apoptose no HE que não são coradas pelo método TUNEL ou, ao contrário, células coradas sem alterações morfológicas, motivos pelos quais as duas técnicas deveriam ser usadas em estudos de identificação de apoptose segundo estes autores (STAUNTON; GAFFNEY, 1995; POTTEN, 1996; STEWART et al., 1999). Nossos resultados demonstram que o a coloração HE pode ser utilizado para a identificação de apoptose no endométrio, sem necessidade de método complementar.

Apesar de estarem bem estabelecidos os critérios morfológicos para reconhecimento dos corpos apoptóticos na coloração HE, o método para sua contagem encontra diferenças na literatura. Em nosso estudo, utilizou-se um aumento de 400X e analisou-se 10 campos com maior população glandular, com um mínimo de 1000 células epiteliais contadas. Stewart et al. (1999), ao estudar apoptose em endométrio de pacientes com sangramento uterino anormal, utilizou um aumento de 250X e analisou 100 glândulas com aspecto circular (cortadas transversalmente) e estroma ao redor, para

minimizar os efeitos de variação no calibre glandular; este método foi desenvolvido por Lee (1993) ao estudar apoptose em intestino grosso. O método empregado em nosso trabalho para contagem da apoptose foi utilizada por Ioffe, Papadimitriou e Drachemberg (1998) ao estudarem índice de proliferação e apoptose em 64 casos compreendendo endométrio proliferativo, hiperplásico e com patologia maligna; também foi utilizada por Mourits et al. (2002) ao estudar apoptose em endométrio de pacientes na pós-menopausa em uso de tamoxifeno. A escolha do método empregado em nosso trabalho levou em consideração que encontrar 100 glândulas endometriais exige amostragem bastante representativa de endométrio adjacente, o que é inviável quando o endométrio em questão é atrófico; além disso estaria inviabilizada a apresentação dos resultados em forma de índice, dificultando a discussão à luz da literatura, pelo menos no que diz respeito a valores absolutos, uma vez que a maioria dos trabalhos apresenta seus resultados como índice de apoptose, em porcentagem.

O estudo da apoptose em tumores pode ser útil na avaliação de sua cinética celular e do seu comportamento biológico. Até a descrição da apoptose, em 1972, o estudo da cinética tumoral era baseada somente na proliferação celular, avaliada principalmente pelo índice mitótico. Este método consiste em identificar as figuras de mitose em cortes histológicos corados com HE. A razão entre o número de figuras mitóticas e o número de células contadas constitui o índice mitótico (IM), podendo ser expresso em porcentagem. Um outro método atualmente disponível é a marcação imuno-histoquímica para a proteína K-67, um marcador de proliferação celular. O primeiro grande estudo a avaliar apoptose em tumores foi realizado por Staunton e Gaffney em 1995. Foram avaliados 10 tipos de tumores diferentes, com 10 casos cada

tipo, com a coloração HE, sendo encontrado um índice de apoptose (IA) elevado em tumores de crescimento rápido, sabidamente bons respondedores à quimioterapia (carcinoma de pequenas células, sarcoma de EWING, linfoma de Burkitt) e IA baixo em neoplasias mais indolentes (carcinoma folicular de tireóide e linfoma folicular). Entretanto, dois casos de carcinoma de pequenas células metastático, que tem crescimento rápido, apresentaram IA baixo. Além disso, a alta ocorrência de apoptose nem sempre se correlaciona com quimiossensibilidade, uma vez que leucemias tiveram baixo IA. Neste estudo, o índice mitótico (IM) também foi avaliado e na maioria dos tumores o IA foi maior que o IM. Uma das explicações possíveis é que a mitose é completada mais rapidamente que a apoptose. Estima-se que os corpos apoptóticos permanecem no espaço extracelular por 1 a 8 horas antes de serem digeridos por macrófagos (Willie; Kerr; Currie, 1980). Staunton e Gaffney concluíram que diferentes tipos de tumores apresentam diferentes comportamentos no que diz respeito à apoptose, refletindo provavelmente uma susceptibilidade inata da célula tumoral a sofrer apoptose.

Estabelecer os mecanismos envolvidos na gênese e progressão das lesões endometriais tem sido uma tarefa desafiadora. Ioffe, Papadimitriou e Drachenberg (1998) estudaram 64 casos, sendo 10 casos de endométrio proliferativo benigno, 18 casos de hiperplasia endometrial simples, 18 casos de hiperplasia complexa e 18 casos de carcinoma de endométrio, e avaliou, entre outros pontos, o índice de apoptose (IA) pela coloração HE. O autor encontrou que a progressão de um tecido endometrial proliferativo para hiperplasia endometrial e daí para carcinoma de endométrio envolve um aumento da apoptose. Morsi et al. (1999) estudou 54 casos, 26 de carcinoma de endométrio, 16 casos de tecido “normal” (incluindo endométrio secretor, proliferativo e

pós-menopausa) e 12 casos de hiperplasias simples e complexas, e analisou a ocorrência de apoptose com imuno-histoquímica para caspases. Também neste trabalho, o autor encontrou uma maior ocorrência de apoptose em tecidos hiperplásicos e neoplásicos. Nosso estudo mostrou um índice de apoptose (IA) elevado no carcinoma endometrial, 1,26%, quando comparado ao pólipo endometrial, 0,54% ( $P=0,0005$ ) pelo método HE, diferença esta confirmada pelo método TUNEL. Estes resultados são inferiores aos encontrados por Ioffe, Papadimitriou e Drachenberg (1998) que obtiveram 3,31% no carcinoma endometrial, 2,57% na hiperplasia endometrial complexa, 2,2% na hiperplasia endometrial simples e 1,17% no endométrio proliferativo benigno, utilizando o método HE. Entretanto, ambos os resultados demonstram o aumento do IA nas neoplasias. Outros autores chegaram a resultados semelhantes utilizando-se de outros métodos para o estudo da apoptose, como a citometria de fluxo (MORSI et al., 1999), imuno-histoquímica para caspases (PEIRO et al, 2001) e o método TUNEL (MORA et al, 1999).

O aumento da apoptose no carcinoma de endométrio em relação ao endométrio normal ou hiperplásico pode parecer paradoxal em uma primeira análise, uma vez que a apoptose possui um papel importante na regressão de lesões hiperplásicas ou neoplásicas induzidas por estímulos proliferativos. Entretanto, a apoptose no tumor pode refletir mecanismos auto-regulatórios normais ou alterações nos mesmos, induzidas por vários fatores como isquemia (GOBÉ; AXELSEN; SEARLE, 1990), linfócitos citotóxicos (CURSON; WEEDON, 1979), ruptura de interações entre as células epiteliais e matriz (FRISCH; FRANCIS, 1994), radioterapia (STEPHENS et al., 1991), drogas citotóxicas e a expressão de oncogenes (WILLIE et al., 1987). É importante enfatizar que o índice

de apoptose (IA) medido em um determinado tumor não dá indicação dos mecanismos envolvidos na sua indução, podendo apenas refletir alterações já estabelecidas.

O estudo da apoptose em um tecido que pode ainda não ter sofrido alterações celulares e da homeostasia tissular pode dar contribuições ao estudo da tumorigênese no endométrio. Stewart et al. (1999) encontrou um aumento da apoptose no endométrio proliferativo de 26 pacientes com sangramento uterino disfuncional, ao comparar com a apoptose no endométrio de 24 pacientes controle, sugerindo que, mesmo em um endométrio histologicamente normal, o aumento da apoptose pode representar um marcador morfológico de desenvolvimento endometrial anormal. Em nosso trabalho, o estudo da apoptose no endométrio adjacente às lesões neoplásicas teve papel importante, por se tratar de tecido histologicamente normal ou pouco alterado.

O índice de apoptose no carcinoma não apresentou diferença em relação ao seu endométrio adjacente pelos dois métodos. Pelo método HE, o IA no carcinoma foi 1,2 % e no endométrio adjacente 1,06% ( $P=0,71$ ), e pelo método TUNEL 0,73% e 1,05% respectivamente ( $P=0,52$ ). Na literatura não há estudos disponíveis utilizando o método HE, ou mesmo o método TUNEL para comparação. Peiro et al. (2001), ao analisar 56 amostras de endométrio adjacente ao carcinoma, utilizando imuno-histoquímica para caspases, encontrou uma maior atividade apoptótica no carcinoma, mas não encontrou diferença ao analisar a expressão de bcl-2. No que diz respeito à apoptose, o endométrio adjacente parece já carregar alterações celulares que lhe conferem uma semelhança com o carcinoma.

O aumento da apoptose na hiperplasia endometrial em relação ao endométrio normal é fato conhecido (IOFFE; PAPANIMITRIU; DRACHENBERG, 1998).

Entretanto quando se trata de apoptose em pólipos na pós-menopausa, não haviam ainda relatos na literatura sobre o assunto. Até mesmo para pólipos em mulheres no menacme a literatura é omissa quando se fala em apoptose, talvez pela bem estabelecida relação entre hiperestrogenismo e o aparecimento de hiperplasia e pólipos. Em nosso estudo o IA pelo método HE no pólipo foi 0,54%, maior que no endométrio adjacente que foi 0,1% ( $P=0,0002$ ); pelo método TUNEL, o IA no pólipo foi 0,35% e no endométrio adjacente, 0,06% ( $P=0,03$ ). Este resultado sugere que o endométrio adjacente, além de ser histologicamente diferente (84% dos casos eram atróficos), ainda não sofreu alterações celulares que pudessem culminar com a apoptose e fossem detectadas pelo método HE ou TUNEL. Até o presente momento não se dispõe de dados na literatura acerca da apoptose no endométrio adjacente ao pólipo.

O endométrio adjacente ao câncer (EAC) e o endométrio adjacente ao pólipo (EAP) têm comportamentos distintos no que diz respeito à apoptose. O índice de apoptose no EAC e no EAP foram respectivamente 1,06% e 0,1% ( $P<0,0001$ ) pelo método HE, e 1,05% e 0,06% ( $P<0,0001$ ) pelo método TUNEL. Um dos objetivos de se comparar apoptose do endométrio adjacente ao carcinoma com a apoptose do endométrio adjacente ao pólipo, foi analisar tecidos que ainda não tivessem sofrido todas as mudanças citológicas e arquiteturais do carcinoma de endométrio ou do pólipo. Esta significativa diferença aconteceu a despeito do fato de que a maioria das amostras era de endométrio atrófico, normal para a idade. Nossos resultados sugerem que, mesmo antes do aparecimento da lesão carcinomatosa, o endométrio já pode apresentar alterações no que diz respeito à apoptose.

O estudo da proliferação celular associado ao estudo da apoptose no endométrio adjacente às neoplasias faz-se necessário para uma melhor compreensão da cinética celular nestes tecidos. Em nosso estudo, não foi possível determinar o índice mitótico porque, ao analisar o endométrio adjacente a lesões endometriais, deparou-se na maioria das vezes com um endométrio atrófico, com um número reduzido de glândulas e baixa proliferação celular, tornando raras as figuras de mitose. Uma alternativa seria utilizar imuno-histoquímica para Ki-67, que marca a célula em proliferação, mesmo que a figura de mitose não seja típica, o que pode tornar possível o estudo no endométrio atrófico.

O estudo do endométrio adjacente às lesões neoplásicas pode dar contribuições no entendimento do processo de carcinogênese no endométrio. Da mesma forma que nos casos de sangramento uterino disfuncional estudados por Staunton e Gaffney (1995), o aumento da apoptose encontrado nas amostras de endométrio adjacente ao carcinoma, mesmo histologicamente normais, pode representar um marcador morfológico de desenvolvimento anormal, não encontrado no endométrio adjacente ao pólipó endometrial. Este achado pode ter implicações práticas. Atualmente, a orientação dos protocolos assistenciais de se fazer a exérese dos pólipos endometriais, nas pacientes na pós-menopausa, baseia-se no risco de progressão para um carcinoma de endométrio. Os resultados obtidos em nosso trabalho mostram que o carcinoma de endométrio tem origem em um endométrio diferente daquele que origina o pólipó, no que diz respeito à apoptose. Seguindo esta lógica, uma biópsia do endométrio adjacente ao pólipó poderia determinar o risco de desenvolvimento de câncer, evitando assim uma cirurgia para exérese do pólipó. Entretanto, novos estudos são necessários para ratificar e ampliar

esses conceitos, antes que implicações práticas possam ser sugeridas, avaliadas através de “trials” e aceitas nos protocolos clínicos. Além da apoptose e proliferação celular, estudos envolvendo genes da família *bcl-2*, *p53*, *c-myc* e *HER-2/neu* no endométrio adjacente a lesões neoplásicas constituem um campo promissor para a pesquisa do desenvolvimento de neoplasias no endométrio.

---

## **CONCLUSÕES**

---

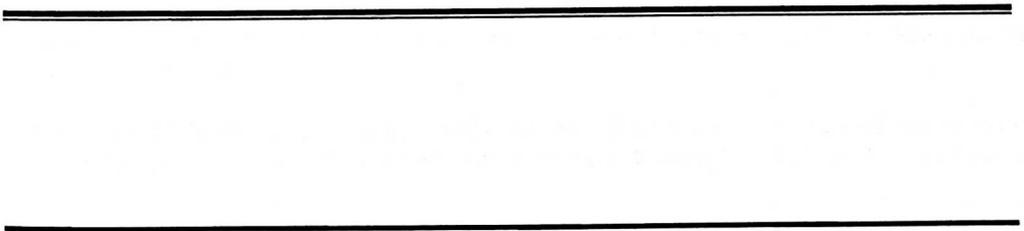
---

---

## 6 CONCLUSÕES

- O carcinoma de endométrio apresenta índice de apoptose maior do que o pólipo endometrial.
  
- O endométrio adjacente ao carcinoma apresenta índice de apoptose maior do que o endométrio adjacente ao pólipo endometrial.

## REFERÊNCIAS



## 7 REFERÊNCIAS\*

- AMARANTES-MENDES, G.P.; GREEN, D.R. The regulation of apoptotic cell death. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v.32, n.9, p.1053-61, 1999.
- ARMÊNIA, C. S. Sequential relationship between endometrial polyps and carcinoma of endometrium. **Obstet. Gynecol.**, v.30, p.524-29, 1967.
- BAKOUR, S. H.; KHAN, K. S.; GUPTA, J. K. The risk of premalignant pathology in endometrial polyps. **Acta Obstet. Gynecol. Scand.**, v.79, p.317-20, 2000.
- CURSON, C.; WEEDON, D. Spontaneous regression in basal cell carcinomas. **J. Cutan. Pathol.**, v. 6, p. 432-437, 1979.
- DALLENBACH-HELLWEG, G. **Endometrio – histologia patologica en diagnostico e investigacion**. Barcelona, Salvat Editores, p.73-116, 1985.
- DAVIS, M. A.; RYAN, D. H. Apoptosis in the kidney. **Toxicol. Pathol.** v.26, p.810-25, 1998.
- DRACHENBERG, C. B.; IOFFE, O. B.; PAPADIMITRIOU, J. C.; Progressive increase of apoptosis in prostatic intraepithelial neoplasia and carcinoma: comparison between in situ end-labeling of fragmented DNA and detection by routine hematoxylin-eosin staining. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v. 121, p. 54-58, 1997.
- DUKE, C.R.; OJEIUS, D.M.; YOUNG, J.D. Cell Suicide in Health and Disease. **Science**, New York, v.275, p.48-55, 1996.
- FERENCZY, A.; BERTRAND, G.; GELFAND, M. M. Proliferation kinetics of the human endometrium during normal menstrual cycle. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v.133, n. 8, p.859-867, 1979.
- FRISCH, S. M.; FRANCIS, H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. **J. Cell. Biol.**, v. 124, p. 619-626, 1994
- GEISLER, J. P.; GEISLER, H. E.; WIEMANN, M. C.; ZHOU, Z.; MILLER, G. A.; CRABTREE, W. Lack of bcl-2 persistence: an independent prognostic indicator of poor

prognosis in endometrial carcinoma. **Gynecol. Oncol.**, v. 71, n. 2, p. 305-307, 1998.

GERSCHEINSON, L. E.; ROTELLO, R. P. Apoptosis: a different type of the cell death. **FASEB J.**, v.6, p.2450-55, 1992.

GOBÉ, G. C.; AXELSEN, R. A.; SEARLE, J. W. Cellular events in experimental unilateral ischemic renal atrophy and in regeneration after contralateral nephrectomy. **Lab. Invest.**, v. 62, p. 770-779, 1990.

GOLDSWORTHY, T., L.; FRANSSON-STEEN, R.; MARONPOT, R. R. Importance and approaches to quantification of hepatocyte apoptosis. **Toxicol. Pathol.** v.24, p.24-35, 1996 a.

GOLDSWORTHY, T. L.; CONOLLY, R. B.; FRANSSON-STEEN, R. Apoptosis and cancer risk assessment. **Mutation Res.** v.365, p.71-90, 1996 b.

HENDRICKSON, M. Surgical pathology of the uterine corpus. In: BENNINGTON, J. (ed.) **Major problems in pathology**, Philadelphia, Saunders, v. 12, 1980.

HOPWOOD, D.; LEVISON, D. A.; Atrophy and apoptosis in the cyclical human endometrium. **J. Pathol.**, v. 119, p. 159-166, 1976.

HUPPERTZ, B.; FRANK, H.G.; REISTER, F.; KINGDOM, J.; KORR, H.; KAUFMANN, P. Apoptosis cascade progress during turnover of human trophoblast: analysis of villous cytotrophoblast and syncytial fragments in vitro. **Lab. Invest.**, New York, v.79, n.12, p.1687-702, 1999.

IOFFE, O. B.; PAPADIMITRIOU, J. C.; DRACHENBERG, C. B.; 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.**, v. 29, n. 10, p. 1150-1159, 1998.

JÄÄTTELÄ, M. Escaping cell death: survival proteins in cancer. **Experimental Cell Research**, v.248, p.30-43, 1999.

JOZA, N. et al. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. **Nature**, v. 410, p.549-554, 2001.

KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Int. J. Cancer.**, v.26, p.239-57, 1972.

KOKAWA, K.; SHIKONE, T.; NAKANO, R. Apoptosis in the human uterine endometrium during the menstrual cycle. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 81; p. 4144-4147, 1996.

KORSMEYER, S. J. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. **Blood.**, v.80, p.879-86, 1992.

KURMAN, R. J.; SCULLY, R. E. Clear cell carcinoma of endometrium – an analysis of 21 cases. **Cancer**, v. 37, n. 2, p. 872-82, 1976.

LEE, F. D.; Importance of apoptosis in the histopathology of drug related lesions in the large intestine. **J. Clin. Pathol.**, v. 46, p. 118-122, 1993.

LIMA, G. R.; BARACAT, E. C. Síndrome do Climatério. In : **Ginecologia Endócrina** Ed. Atheneu, p. 253, 1995.

MAIA Jr, H. et al Polypectomy and endometrial resection in postmenopausal patients **J. Amm. Assoc. Ginecol. Laparosc.**, v. 4, p. 577-582, 1997.

MORA, L. B.; DIAZ, J. L.; CANTOR, A. B.; NICOSIA, S. V.; Differential diagnosis of endometrial hyperplasia and carcinoma by computerized image cytometry of cell proliferation, apoptosis and Bcl-2 expression. **Ann. Clin. Lab. Sci.**, v. 29, n. 4, p. 308-315, 1999.

MORSI, H. M.; LEERS, M. P.; RADESPIEL-TROGER, M.; BJORKLUND, V.; KABARITY, H. E.; NAP, M.; JAGER, W. Apoptosis, bcl-2 expression, and proliferation in benign and malignant endometrial epithelium: an approach using multiparameter flow cytometry. **Gynecol. Oncol.**, v.77, p.11-7, 2000.

MOURITS, M. J. E.; HOLLEMA, H.; DE VRIES, E. G.; TEN HOOR, K. A.; WILLEMSE, P. H.; VAN DER ZEE, A. G. Apoptosis and apoptosis-associated parameters in relation to tamoxifen exposure in postmenopausal endometrium. **Hum. Pathol.**, v. 33, n. 3, p. 341-346, 2002.

NIEMANN, T. H.; TRGOVAC, T. L.; McGAUGHY, V. R., VACARELLO, L. bcl-2 expression in endometrial hyperplasia and carcinoma. **Gynecol. Oncol.**, v. 63, n. 3, 318-322,1996.

ODICINO, F. Staging of gynecologic malignancies. **Surg Clin North Am**, v.81, n.4, p.753-70, 2001.

PATSNER, B. Late recurrence of a uterine clear cell adenocarcinoma confined to an endometrial polyp: case report. **Eur. J. Gynaecol. Oncol.**, v. 19, n. 6, p.522-523, 1998.

PETERSON, W. N. Endometrial polyps. **Obst. Gynec.**, v.8, p.40-49, 1956.

PEIRO, G.; DIEBOLD, J.; BARETTON, G. B.; KIMMIG, R.; LOHRS, U. Cellular apoptosis susceptibility gene expression in endometrial carcinoma: correlation with Bcl-2, Bax, and caspase-3 expression and outcome. **Int. J. Gynecol. Pathol.**, v. 20, n. 4, p. 359-367, 2001.

POTTEN, C. S. What is an apoptotic index measuring? A commentary note. **British Journal of Cancer**. v. 74, p.1743-48, 1996.

REED, J. C. Bcl-2 family proteins: regulators of apoptosis and chemoresistance in hematologic malignancies. **Semin. Hematol.** , v. 34, n. 4, p. 9-19, 1997.

SHEPHERD, J.H Revised FIGO staging for gynaecological cancer. **Br. J. Obstet. Gynaecol.**, V. 96, P.889892, 1989.

STAUNTON, M. J.; GAFFNEY, E. F. Tumor type is a determinant of susceptibility to apoptosis. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 103, n. 3, p. 300-307, 1995.

STEWART, C.J.; CAMPBELL-BROWN, M.; CRITCHLEY, H. O.; FARGUHARSON, M.A. Endometrial apoptosis in patients with dysfunctional uterine bleeding. **Histopathology**, v. 34, n° 2, p. 99-105, 1999.

STEPHENS, L. C.; ANG, K. K.; SCHULTHEISS, T. E.; MILAS, L.; MEYN, R. E. Apoptosis in irradiated murine tumours. **Radiat. Res.**, v. 127, p. 308-316, 1991.

TASKIN, M.; LALLAS, T. A.; BARBER, H. R. K.; SHEVCHUK, M. M.; bcl-2 and p53 in endometrial carcinoma. **Mod. Pathol.**, v.10, p. 728-34, 1997.

TSENG, L.; GURPIDE, E. Effects of progestins on estradiol receptor levels in human endometrium. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 41, n. 2, p.402-404, 1975.

TSUJIMOTO, Y.; COSSMAN, J.; JAFFE, E; CROCE, C. Involvement of bcl-2 gene in human follicular lymphoma. **Science**, v.228, p.1440-3, 1985.

UEDA, N.; SUDHIR, V.S. Apoptosis. **J. Lab. Clin. Med.**, St Louis, v.124, n.2, p.169-77, 1994.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. **Diretrizes para a apresentação de dissertações e teses da USP**: documentos eletrônicos ou impressos. São Paulo: SIBi-USP, 2003, 98p.

VASKIVUO, T. E.; STENBACK, F.; KARHUMAA, P.; RISTELI, J.; DUNKEL, L.; TAPANAINEN, J. S.; Apoptosis and apoptosis-related proteins in human endometrium. **Mol Cell Endocrinol**, v. 165, p. 75-83, 2000.

VAUX, D. L.; CORY, S.; ADAMS. J. M.. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. **Nature**, v.335, p.440-2, 1988.

WYLLIE, A. H.; KERR, J. F. R.; CURRIE, A. R. Cell death: the significance of apoptosis. **Int. Rev. Cytol.**, v.68, p.251-306, 1980.

WYLLIE, A. H.; ROSE, K. A., MORRIS, R. G.; STEEL, C. M.; FOSTER, E.; SPANDIDOS, D. A. Rodent fibroblast tumours expressing human myc and ras genes: growth, metastasis and endogenous oncogene expression. **Br. J. Cancer**, v. 56, p. 251-259, 1987.

WOODRUFF, J. D.; PICKAR, J. H. Incidence of endometrial hyperplasia in postmenopausal women taking conjugated estrogens (Premarin) with medroxyprogesterone acetate or conjugated estrogens alone. The Menopause Study Group. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v.170, n. 5, p.1213-1223, 1994.

YAMAUCHY, N.; SAKAMOTO, A. UOSAKI, H.; IIHARA, K.; MACHINAMI R.; Immunohistochemical analysis of endometrial adenocarcinoma for bcl-2 and p-53 in relation to expression of sex steroid receptor and proliferative activity. **Int. J. Gynecol. Pathol.**, v.15, p.202-08, 1996.

ZAINO, R. J.; KURMAN, R. J.; DIANA, K. L.; MORROW, C. P.; The utility of the revised International Federation of Gynecology and Obstetrics histologic grading of endometrial adenocarcinoma using a defined nuclear grading system. **Cancer**, v. 75, p. 81-86, 1995.

ZIEL, H. K.; FINKLE, W. D. Increased risk of endometrial carcinoma among users of conjugates estrogens. **N. Engl. J. Med.**, v.293, 1167-70, 1975.

---

\*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

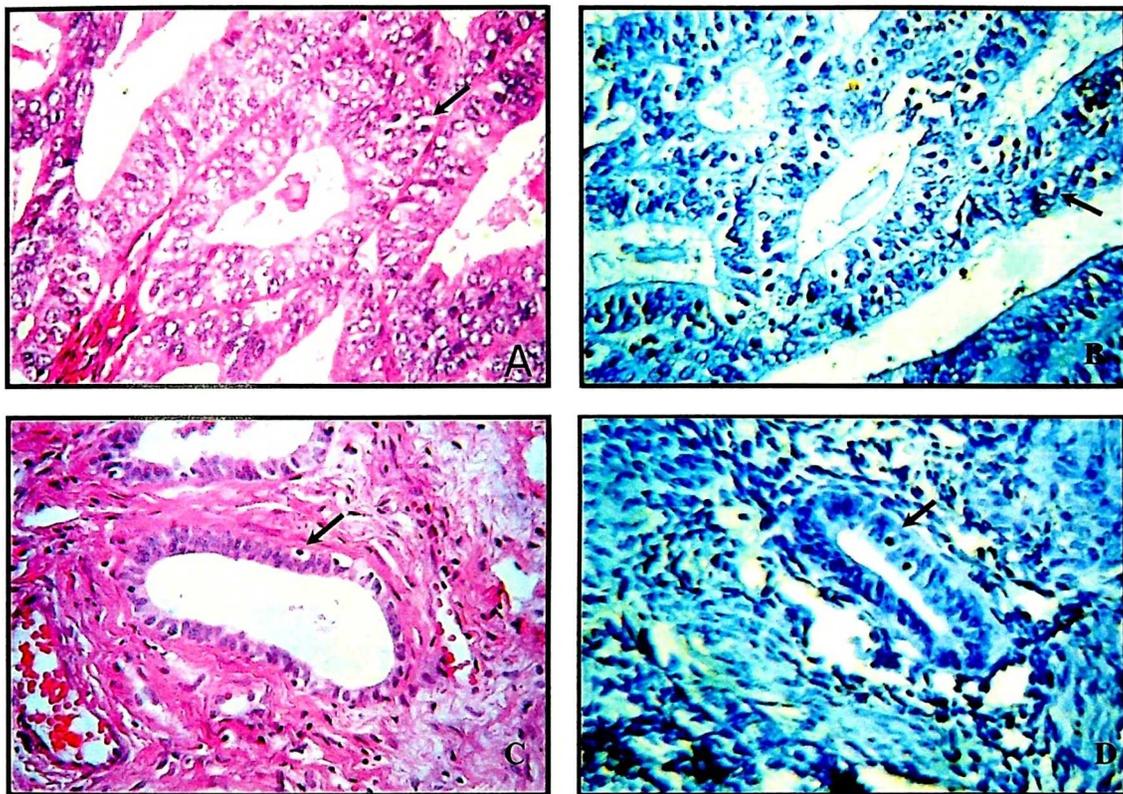
---

**ANEXOS**

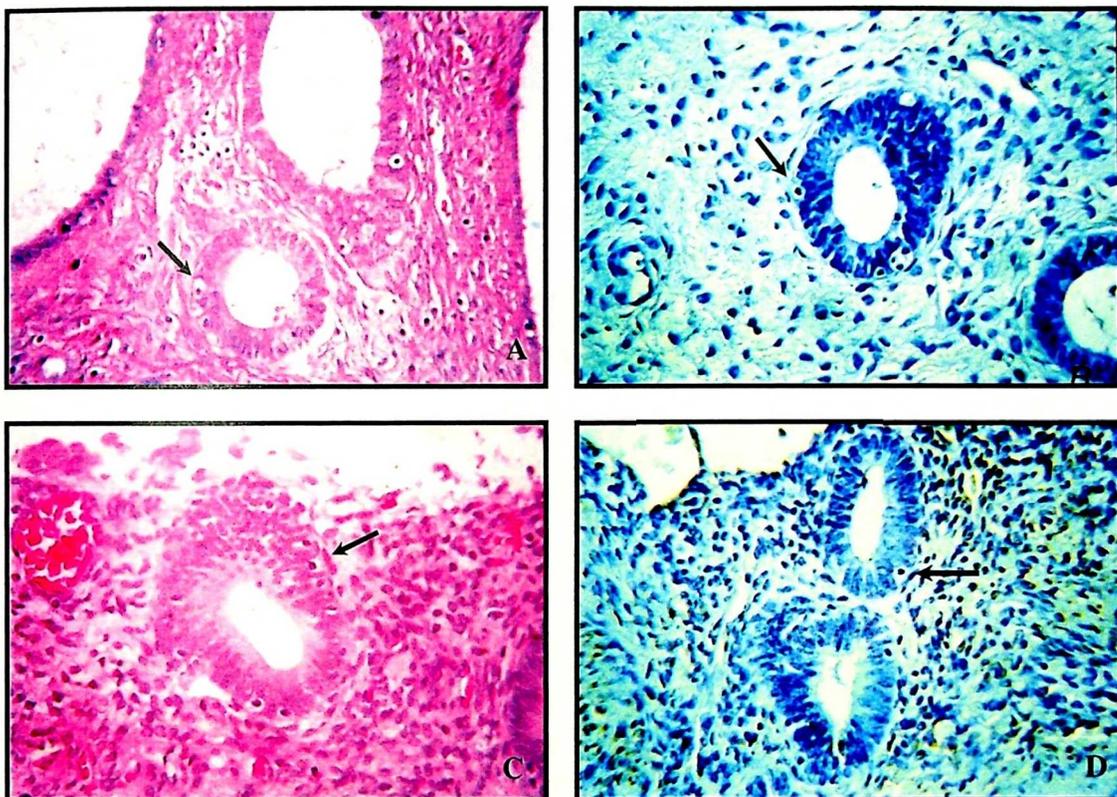
---

---

## ANEXO A



Lâmina 1. Fotomicrografias de adenocarcinoma de endométrio (A e B) e endométrio adjacente (C e D) apresentando figuras de apoptose nas técnicas de hematoxilina-eosina e de TUNEL, respectivamente (400X)



Lâmina 2. Fotomicrografias de pólipo endometrial (A e B) e endométrio adjacente (C e D) apresentando figuras de apoptose nas técnicas de hematoxilina-eosina e de TUNEL, respectivamente (400X)

## ANEXO B

Quadro 2 - Classificação da OMS para os tumores malignos do endométrio (Odicino, 2001)

---

Carcinoma endometrióide, subtipos:

Adenocarcinoma

Adenoacantoma (adenocarcinoma com metaplasia escamosa)

Adenoescamoso (associação de adenocarcinoma com carcinoma de células escamosas)

Adenocarcinoma mucinoso

Adenocarcinoma seroso papilífero

Adenocarcinoma de células claras

Carcinoma adenoescamoso

Carcinoma indiferenciado

Carcinoma misto

---

## ANEXO C

Quadro 3 - Estadiamento do câncer endometrial (FIGO, 1998)

Estadio IA	Tumor limitado ao endométrio
Estadio IB	Invasão menor que metade do miométrio
Estadio IC	Invasão igual ou maior à metade do miométrio
Estadio IIA	Envolvimento das glândulas endocervicais
Estadio IIB	Invasão do estroma cervical
Estadio IIIA	Tumor invade serosa ou anexos uterinos ou lavado peritoneal positivo
Estadio IIIB	Metástase vaginal
Estadio IIIC	Metástase para linfonodos pélvicos ou para-aórticos
Estadio IVA	Invasão de mucosa vesical ou intestinal
Estadio IVB	Metástases a distância

Quadro 4 - Grau de diferenciação dos adenocarcinomas endometriais

Grau 1: 5% de padrão sólido não morular ou não escamoso

Grau 2: 6 a 50 % de padrão sólido não morular ou não escamoso

Grau 3: mais de 50% de padrão sólido não morular ou não escamoso

## ANEXO D

### Quadro 5 - Processamento e preparo das amostras endometriais

---

Desidratação: exposição do material em cassete plástico a uma série de álcool crescente (álcool 70%, 80%, 95%, 100%I durante 1 hora em cada e álcool 100%II, 100%III, 100%IV durante 2 horas em cada)

Diafanização: exposição ao xilol 1 e 2 por 1 hora em cada e xilol 3 por 30 minutos

Parafinização: parafina 1 e 2 por 2 horas em cada

Inclusão: imersão do fragmento de tecido em parafina líquida e após em temperatura ambiente formando bloco de tecido

Microtomia: cortes longitudinais do material com espessura de 4 $\mu$ m com uso do micrótomo Spencer, modelo 820, série nº 17.797, de navalha descartável

Preparo da lâminas: lavagem das lâminas com Dextran ( Extran MA Neutro) e passagem das mesmas no silane (silanização)

Montagem I: inclusão do material histológico em água destilada a 48° C e pescagem em lâmina de vidro previamente preparada

Montagem final: colocação da lâmina com material histológico em uma estufa a 58° C para retirada do excesso de parafina sendo após armazenada

---

## ANEXO E

### Quadro 6 - Preparo da coloração Hematoxilina e Eosina

---

Imersão das lâminas previamente preparadas em xilol I e II por 15 minutos cada

Imersão em banhos decrescentes de etanol (95%, 70%, 50%) por 3 minutos cada

Coloração com Hematoxilina de Harris por 5 minutos

Imersão em solução de Scoth por 30 segundos

Coloração com Eosina por 30 segundos

Imersão em banhos crescentes de etanol

Imersão rápida em xilol, quatro vezes

Montagem das lâminas dom entelan

---

## ANEXO F

### Quadro 7 - Preparo do método TUNEL

---

Imersão das lâminas previamente preparadas xilol I,II e III em temperatura ambiente por

5 minutos cada

Lavagem por imersão das lâminas em etanol 100% por 5 minutos em temperatura ambiente

Rehidratação por imersão seqüencial das lâminas em banhos de etanol (95%, 70% e 50%) por 3 minutos cada à temperatura ambiente

Lavagem por imersão das lâminas em PBS por 5 minutos em temperatura ambiente

Remoção do excesso de líquido

Adição da solução de tripsina 0,25% em cada lâmina até cobrir todo o corte por 10 minutos em temperatura ambiente

Lavagem por imersão das lâminas em PBS por 5 minutos em temperatura ambiente

Remoção do excesso de líquido; adição do tampão de equilíbrio fornecido pelo fabricante por 5 minutos em temperatura ambiente

Preparo da mistura para reação TdT: para o preparo de 100µl de solução, suficientes para uma lâmina, utilizou-se 98µl de tampão de equilíbrio, 1µl de nucleotídeos biotinilados e 1µl de enzima TdT, todos fornecidos pelo fabricante

Remoção do excesso de líquido e secagem ao redor do corte com papel toalha; adição de 100µl da mistura para reação TdT e cobertura dos tecidos com plástico fornecido pelo fabricante

Incubação das lâminas por 60 minutos em câmara úmida

**continua**

#### Quadro 7 - Preparo do método TUNEL

---

Diluição do reagente 20X SSC em água deionizada 1:10; remoção das coberturas plásticas e imersão das lâminas nesta solução por 15 minutos em temperatura ambiente

Lavagem por imersão das lâminas em PBS por 5 minutos em temperatura ambiente, por duas vezes

Diluição da solução Streptavidin HRP em PBS 1:500; adição de 100µl em cada lâmina e incubado por 30 minutos em temperatura ambiente

Lavagem por imersão das lâminas em PBS por 5 minutos em temperatura ambiente, por duas vezes

Preparo da solução DAB: para o preparo de 1ml, adicionou-se 50 µl de DAB Substrate 20X Buffer em 950µl de água deionizada; adicionado então 50µl de DAB 20X Chromogen e 50 µl de Hydrogen Peroxide 20X

Adição de 100µl da solução DAB em cada lâmina e observação até o aparecimento de uma coloração amarronzada ao fundo (geralmente 10 minutos)

Lavagem por várias vezes com água deionizada e montagem em Permount®

---

**conclusão**

**ANEXO G**

Quadro 8 - Soluções e tampões utilizados

---

Solução PBS 0,1M pH 7,4 e NaCl 0,15M	
NaCl	16,34g
Fosfato de sódio monobásico	0,72g
Fosfato de sódio dibásico	2,1g
H <sub>2</sub> O destilada	2.000ml
Acertado o pH com hidróxido de sódio.	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3% (peróxido de hidrogênio)	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30 volumes)	10ml
PBS 0,1M pH 7,4	90ml
Conservado em geladeira.	

---

## ANEXO H



CEP. 14048-900  
RIBEIRÃO PRETO - S.P.  
BRASIL

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA  
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

CAMPUS UNIVERSITÁRIO - MONTE ALEGRE  
FONE: 802-1000 - FAX (016) 833-1144

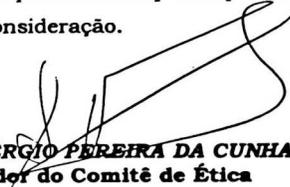
Ribeirão Preto, 01 de outubro de 2003

Ofício nº 2916/2003  
CEP/SPC

**Prezado Senhor:**

O trabalho intitulado **"ESTUDO DA APOPTOSE NO ENDOMÉTRIO ADJACENTE AOS PÓLIPOS E CARCINOMAS ENDOMETRIAIS NA PÓS-MENOPAUSA"**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 164ª Reunião Ordinária realizada em 29/09/2003, e enquadrado na categoria: **APROVADO**, de acordo com o Processo HCRP nº 9610/2003.

Aproveito a oportunidade para apresentar a Vossa Senhoria protestos de estima e consideração.

  
**PROF. DR. SÉRGIO PEREIRA DA CUNHA**  
Coordenador do Comitê de Ética  
em Pesquisa do HCFMRP-USP e da FMRP-USP

Ilustríssimo Senhor  
**HERMES DE FREITAS BARBOSA**  
**PROF. DR. FRANCISCO JOSÉ CÂNDIDO DOS REIS (Orientador)**  
Depto. de Ginecologia e Obstetria .  
Em mãos

Este trabalho foi elaborado segundo as diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP (UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 2003).

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. **Diretrizes para a apresentação de dissertações e teses da USP**: documentos eletrônicos ou impressos. São Paulo: SIBi-USP, 2003, 98p.