

ROGÉRIO DE BARROS FERREIRA LEÃO

**RECEPTORES DE ESTRÓGENO E PROGESTERONA EM
PÓLIPOS ENDOMETRIAIS DE USUÁRIAS E NÃO USUÁRIAS
DE TAMOXIFENO E NO ENDOMÉTRIO ATRÓFICO**

Dissertação de Mestrado

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. LÚCIA HELENA SIMÕES DA COSTA PAIVA

**Unicamp
2012**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

RECEPTORES DE ESTRÓGENO E PROGESTERONA EM PÓLIPOS ENDOMETRIAIS DE USUÁRIAS E NÃO USUÁRIAS DE TAMOXIFENO E NO ENDOMÉTRIO ATRÓFICO

ROGÉRIO DE BARROS FERREIRA LEÃO

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Tocoginecologia da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de
Campinas – UNICAMP para obtenção do
Título de Mestre em Tocoginecologia, área
concentração em Fisiopatologia Ginecológica,
sob orientação da Prof^a. Dr^a. Lúcia Helena
Simões da Costa Paiva

Campinas, 2012

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

L476r Leão, Rogério de Barros Ferreira, 1977 -
 Receptores de estrógeno e progesterona em pólipos
 endometriais de usuárias e não usuárias de tamoxifeno e
 no endométrio atrófico. / Rogério de Barros Ferreira Leão. -
 - Campinas, SP : [s.n.], 2012.

Orientador : Lúcia Helena Simões da Costa Paiva
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Pós-Menopausa. 2. Hormônios Esteróides Gonadais.
3. Moduladores Seletivos de Receptor Estrogênico. I. Paiva,
Lúcia Helena Simões da Costa. II. Universidade Estadual
de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Estrogen and progesterone receptors in endometrial polyps of women exposed and not exposed to tamoxifen and in atrophic endometrium

Palavra-chave em inglês:

Postmenopause
Gonadal Steroid Hormones
Selective Estrogen Receptor Modulators

Área de Concentração: Fisiopatologia Ginecológica

Titulação: Mestre em Tocoginecologia

Banca examinadora:

Lucia Helena Simões da Costa Paiva [Orientador]
Jorge Nahas Neto
Luís Otávio Zanatta Sarian

Data da defesa: 17-02-2012

Programa de Pós-Graduação: Tocoginecologia

Diagramação e arte final: Assessoria Técnica do CAISM (ASTEC)

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno: ROGERIO DE BARROS FERREIRA LEÃO

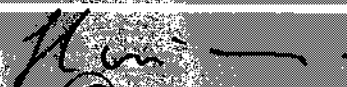
Orientadora: Prof^a. Dr^a. LUCIA HELENA SIMÕES DA COSTA PAIVA

Membros:

1.



2.



3.



**Curso de Pós-Graduação em Tocoginecologia da Faculdade
de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas**

Data: 17/02/2012

Dedico este trabalho...

*...a minha mãe, que em toda a minha vida
me incentivou e me apoiou,
dando sempre seu carinho e torcendo por mim
e a meu pai (in memoriam) por ter
sempre acreditado em mim ...*

Agradecimentos

À Profa. Dr^a. Lucia Helena Simões da Costa Paiva, por todos ensinamentos nas aulas da pós-graduação e excelente orientação deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Aarão Mendes Pinto Neto, pelo apoio e comentários que muito contribuíram para este trabalho.

Ao Prof. Dr. José Roberto Gabiatti pelo incentivo e confiança em mim.

À Profa. Dr^a. Lillian A. Lucci de Ângelo Andrade pela sua importante participação na etapa experimental deste trabalho.

Aos Professores: Dra. Glauce Aparecida Pinto e Dr. José Vassallo, pela contribuição na etapa de elaboração e análise da imuno-histoquímica.

Ao pessoal do Departamento de Anatomia Patológica (HC-Unicamp) e do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer A. C. Camargo, pela ajuda na execução da parte experimental do trabalho.

Aos funcionários do SAME-CAISM-Unicamp, em especial à Rogéria, pela colaboração, facilitando nosso trabalho na coleta de dados dos prontuários médicos.

À Sirlei, estatística do Departamento de Tocoginecologia da Unicamp, por toda ajuda na análise estatística deste trabalho.

Aos amigos Armando Antunes e Anderson Pinheiro que participaram ativamente em várias etapas deste trabalho.

A minha irmã Flávia, que sempre me ajudou quando precisei, e meu irmão Rafael, que sempre confiou na minha capacidade e me incentivou.

Sumário

Símbolos, Siglas e Abreviaturas	viii
Resumo	x
Summary	xii
1. Introdução	14
1.1. Modulador Seletivo do Receptor Estrogênico (SERM): Mecanismo de ação	15
1.2. O Efeito do Tamoxifeno no Endométrio	22
1.3. Os Pólipos Endometriais	24
2. Objetivos	28
2.1. Objetivo geral	28
2.2. Objetivos específicos.....	28
3. Publicação.....	29
4. Conclusões.....	52
5. Referências Bibliográficas.....	53
6. Anexos	61
6.1. Anexo 1 – Submissão do Trabalho para Publicação	61
6.2. Anexo 2 – Aprovação do Comissão de Pesquisa	62
6.3. Anexo 3 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	63
6.4. Anexo 4 – Ficha de Coleta de Dados.....	65

Símbolos, Siglas e Abreviaturas

AF-1 – Função de ativação 1

AF-2 – Função de ativação 2

AIB 1 – Amplificado do câncer de mama 1 (*Amplified in breast cancer 1*)

AP-1 – Proteína ativadora 1 (*activator protein 1*)

CAISM – Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher

CBP – Proteína ligante de CREB (*CREB binding protein*)

DM – *Diabetes Mellitus*

DNA – Ácido desorribonucleico

DP – Desvio padrão

ERE – Elemento de Resposta Estrogênica

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

FCM – Faculdade de Ciências Médicas

HAS – Hipertensão Arterial Sistêmica

H & E – Hematoxilina e Eosina

IC – Intervalo de Confiança

IGF-1 – Fator de crescimento insulina-símile 1 (*insulin growth factor 1*)

- IMC** – Índice de Massa Corpórea
- IRS** – Substrato do receptor de insulina (*insulin receptor substrate*)
- n** – Número de casos
- NCoR** – Co-repressor de Receptor Nuclear (*nuclear receptor-corepressor*)
- PCAF** – Fator associado a P300/CBP (*P300/CBP-associated factor*)
- PGDF** – Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas (*Platelet-derived growth factor*)
- p-valor** – Probabilidade de Significância Estatística
- RE** – Receptor de estrógeno
- RNA** – Ácido ribonucleico
- RP** – Receptor de progesterona
- SERM** – Modulador Seletivo do Receptor Estrogênico (*Selective Estrogen receptor Modulator*)
- SMRT** – Mediador Silenciador de Receptores de Retinóides e Hormônio Tireoidiano (*Silencing mediator for RAR et TR*)
- SNC** – Sistema Nervoso Central
- SRC-1** – Coativador de receptor de esteróides 1 (*Steroid receptor coactivator 1*)
- TGF α** – Fator de Transformação de Crescimento α (*Transforming Growth Factor α*)
- TMA** – Microarranjo de tecidos (*tissue microarray*)
- UNICAMP** – Universidade Estadual de Campinas
- USF** – *Upstream Stimulating Factor*
- VEGF** – Fator de Crescimento Endotelial Vascular (*vascular endothelial growth factor*)

Resumo

Introdução: O tamoxifeno é utilizado no tratamento do câncer de mama receptor de estrogênio positivo. Seu mecanismo de ação está na inibição do crescimento das células malignas por antagonismo competitivo com estrógenos pelos receptores estrogênicos. A ação do tamoxifeno nestes receptores é variável e, dependendo do tecido, pode ter ação antagonista ou agonista. Em mulheres menopausadas usuárias de tamoxifeno, observa-se uma maior incidência de patologias endometriais, sendo o pólipó endometrial a alteração mais frequente. Sua patogênese não está bem estabelecida, mas parece estar relacionada a fatores hormonais. **Objetivos:** Comparar a expressão de receptor de estrogênio (RE) e de receptor de progesterona (RP) em pólipos endometriais de usuárias de tamoxifeno com pólipos endometriais e endométrio atrófico de não usuárias na pós-menopausa. **Material e métodos:** Entre mulheres submetidas à histeroscopia cirúrgica no Hospital da Mulher Prof. Dr. Aristodemo Pinotti – CAISM/UNICAMP de janeiro de 1998 a dezembro de 2008, foram selecionadas 84 mulheres na pós-menopausa usuárias de tamoxifeno, com pólipó endometrial benigno. Esse grupo foi comparado a 84 amostras de endométrio atrófico e 252 pólipos benignos de mulheres na pós-menopausa

não usuárias de tamoxifeno e sem antecedente de terapia hormonal. As expressões de RE e RP foram avaliadas através de imuno-histoquímica segundo a porcentagem de células coradas, intensidade da coloração nuclear e escore final. A expressão de RE e RP no epitélio glandular e no estroma dos pólipos de usuárias de tamoxifeno foi comparada com o endométrio atrófico e os pólipos de não usuárias separadamente, utilizando o Teste de Mann-Whitney, corrigido pelo método de Bonferroni, teste exato de Fisher ou Qui-quadrado. **Resultados:** os pólipos de usuárias de tamoxifeno apresentaram maior expressão de RE e RP no epitélio glandular e estroma, em relação ao endométrio atrófico ($p < 0,0001$). Em relação aos pólipos de não usuárias, as usuárias apresentaram maior expressão de RP no epitélio glandular ($p = 0,0014$) e estroma ($p = 0,0056$), não apresentando diferença significativa em relação ao RE. A maioria dos pólipos das usuárias e não usuárias de tamoxifeno apresentavam RE/RP positivos enquanto a maioria dos endométrios atróficos era RE/RP negativos. **Conclusões:** Os pólipos apresentam aumento frequente de RE, independentemente do uso do tamoxifeno. Por outro lado, os altos níveis de RP parecem consistentes com os efeitos agonistas da droga.

Palavras-chave: Pós-menopausa, Hormônios Esteróides Gonadais, Moduladores Seletivos de Receptor Estrogênico.

Summary

Introduction: Tamoxifen has been used for the treatment of estrogen receptor-positive breast cancer. The effect of tamoxifen in breast cancer is the inhibition of cancer cell growth by competitive antagonism with estrogen for estrogen receptor (ER). The mechanism of action of tamoxifen in this receptor varies among different tissues, with antagonist effect (e.g. in breast) or agonist (e.g. in endometrium). Thus, in menopausal women who use tamoxifen, a higher incidence of endometrial alterations is observed and endometrial polyps are the most common. The pathophysiology of endometrial polyp is still not definitely established but it seems to be related to hormone influence. **Objectives:** To compare the expression of estrogen receptors (ER) and progesterone receptors (PR) in endometrial polyps of tamoxifen users to atrophic endometrium and endometrial polyps of postmenopausal nonusers of tamoxifen. **Material and methods:** Among women undergoing surgical hysteroscopy in Hospital da Mulher Prof. Dr. Aristodemo Pinotti – CAISM/UNICAMP, from January 1998 to December 2008, 84 tamoxifen users with benign endometrial polyp were selected. This group was compared to 84 samples of atrophic endometrium and 252 benign polyps of postmenopausal women who were non-users of tamoxifen.

and no previous history of hormone therapy use. ER/PR expression was assessed by immunohistochemistry study according to the percentage of stained cells, intensity of nuclear color and final score. The expression ER and PR in the glandular epithelium and stroma of polyp tissue from tamoxifen users was compared to atrophic endometrium and polyps from non-users separately, using the Mann-Whitney test corrected by the Bonferroni method, Fisher's exact test or Chi-square test. **Results:** Polyps of tamoxifen users had a higher expression of ER and PR in the glandular epithelium and stroma, in relation to the atrophic endometrium ($p < 0.0001$). Regarding polyps of women not treated with tamoxifen, users had a higher PR expression in the epithelium ($p = 0.0014$) and stroma ($p = 0.0056$), without any difference in ER expression. Most of polyps expressed ER/PR positives while atrophic endometrium were ER/PR negatives. **Conclusions:** Polyps frequently exhibit increase in ER expression, independent of the use of tamoxifen. High levels of PR seem to be consistent with agonist effects of the drug.

Keywords: Postmenopause, Gonadal Steroid Hormones, Selective Estrogen Receptor Modulators.

1. Introdução

O tamoxifeno é um trifeniletileno não-esteroidal que foi sintetizado no Reino Unido em 1960 como contraceptivo. Em 1977, foi aprovado pela US Food and Drug Administration para uso no tratamento do câncer de mama metastático em pacientes menopausadas (1). Com o tempo, demonstrou eficácia em todos os casos de câncer de mama receptores de estrogênios positivos. Seu uso por cinco anos mostrou aumento na sobrevida em 10 anos, redução na recorrência, maior intervalo livre de doença, menor incidência de câncer de mama contralateral e menor mortalidade (2).

Atualmente é o tratamento endócrino de escolha em qualquer estágio do câncer de mama na pré e pós-menopausa, com mais de 10 milhões de mulheres com câncer de mama em uso a cada ano (3).

1.1. Modulador Seletivo do Receptor Estrogênico (SERM): Mecanismo de ação

O tamoxifeno é um exemplo de SERM, isto é, uma substância capaz de se unir ao receptor de estrógeno (RE), exercendo nestes receptores uma ação variável, antagonista ou agonista, dependendo do tecido-alvo (4).

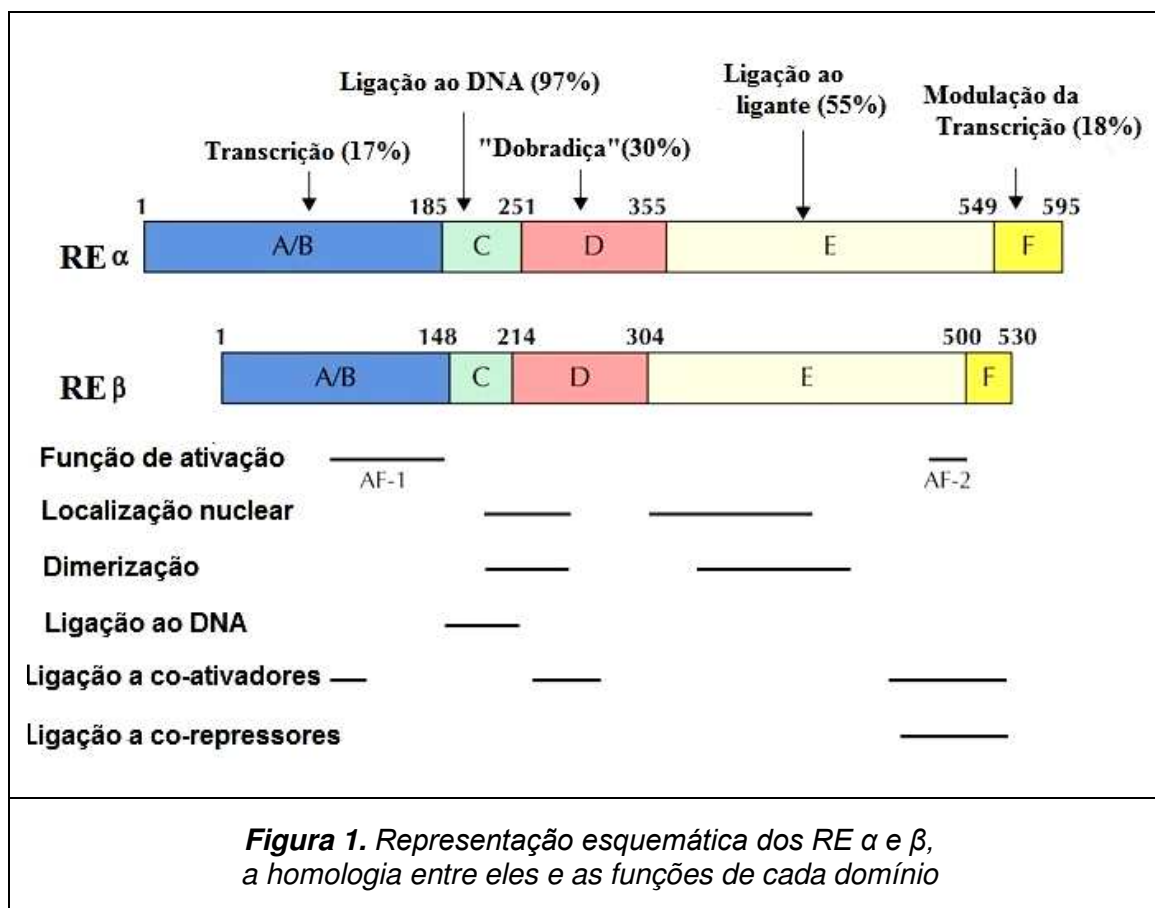
Assim, o mecanismo de ação do tamoxifeno no câncer de mama está na inibição do crescimento das células malignas por antagonismo competitivo com estrógenos pelos receptores estrogênicos (5).

O estrogênio é um hormônio esteróide lipofílico que atravessa livremente a membrana da célula e se une ao receptor de estrógeno (RE) que está em seu núcleo, controlando a expressão de vários genes, incluindo aqueles que codificam receptores de progesterona (RP) e fatores de crescimento (6,7).

Alguns desses fatores, quando secretados por células tumorais, podem unir-se a receptores de células vizinhas, estimulando seu crescimento, assim como o do estroma adjacente. Estas células, por sua vez, podem produzir outros fatores de crescimento, sendo uma reação em cascata de estímulo ao crescimento tumoral (1). O tamoxifeno, competindo pelo RE da célula neoplásica, inibe essa cadeia, bloqueando o crescimento tumoral, uma vez que mantém essas células em G0/G1 do ciclo celular (8). Entretanto, sendo um SERM, tem ações variáveis nos diferentes tecidos. Uma das explicações para isso pode ser atribuída à existência de 2 isoformas de RE: alfa e beta. Enquanto o RE α

apresenta 595 aminoácidos e é codificado por gene localizado no cromossomo 6, o RE β , tem 530 aminoácidos e seu gene está no cromossomo 14 (9).

Os REs apresentam uma estrutura com vários domínios (A, B, C, D, E, F). O domínio AB, localizado na porção amino-terminal da molécula, está envolvido nas interações com cofatores e proteínas relacionadas com o processo de transcrição (10,11). Há menos de 18% de homologia entre RE α and RE β no domínio AB, sugerindo que esses dois receptores devem interagir diferentemente com as proteínas. O domínio C é responsável pela ligação do receptor ao DNA e responsável pela sua dimerização. É a região com maior homologia entre os dois subtipos (97%). O domínio D contém o sinal da localização nuclear e é onde a molécula se dobra, sendo responsável pela flexibilidade tridimensional da molécula, importante para suas interações. O domínio E é o sítio que se une aos ligantes, com 60% de homologia entre RE α and RE β , tendo propriedades de ligação distintas em relação aos diferentes SERMs (1,10). Este domínio está também envolvido na associação a proteínas do choque térmico (*heat-shock protein*), dimerização do receptor, localização nuclear e interação com cofatores. E o domínio F, na terminação carboxila da molécula, é extremamente variável (18% de homologia) e parece contribuir para a modulação da atividade transcricional (10,12). Desde a descoberta do RE β , essas considerações estruturais já sugeriam que RE α and RE β se unem a regiões similares do DNA e potencialmente ativam os mesmos genes-alvo, mas podem ser ativados por ligantes distintos e interagir com proteínas correguladoras diferentes e, assim, obtendo efeitos diferentes na transcrição dos genes (10) (Figura 1).

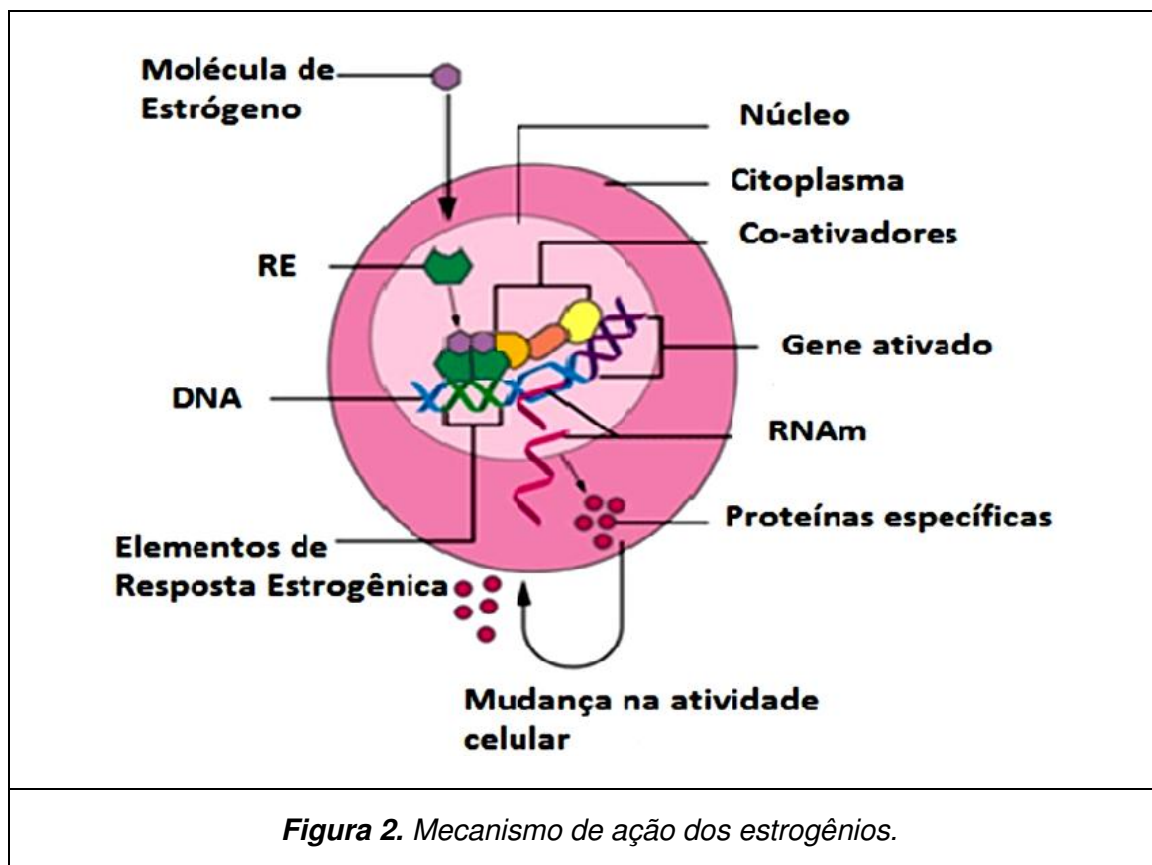


Além das diferenças estruturais e de afinidade, os RE α e β apresentam concentrações variáveis em diferentes tecidos. O RE α é expresso predominantemente no aparelho reprodutivo (ovários, mamas e útero), sistema nervoso central (SNC) e fígado, enquanto que o RE β é expresso em tecidos como ossos, endotélio, pulmões, SNC, próstata, ovários, e tecido urogenital (13,14).

Além da existência de dois subtipos de RE, sabe-se, ainda, que há vários polimorfismos nos genes que codificam esses receptores, que podem alterar

suas funções. Por exemplo, para o gene do RE α , há descritos pelo menos 3 polimorfismos (XbaI, PvuII e repetições GT), que podem interferir no risco e evolução do câncer de mama (15,16).

As diferenças de ação entre SERMs e estrógeno, em diferentes tecidos também podem ser explicadas pela teoria de Katzenellenbogen et al. (1996) (17), que sugeriram que a ação dos hormônios esteróides é determinada por um sistema tripartite de interação ligante, receptor e efetor. A interação hormônio-receptor acarreta uma alteração conformacional do RE que leva à dissociação das proteínas de choque térmico (hsp 90), resultando na ativação do receptor (13). No modelo clássico de estimulação estrogênica, uma vez que o RE foi ativado, ele passa a ter uma afinidade maior pela molécula de DNA e há a formação de dímeros que interagem com sequências específicas do DNA, sequências essas chamadas de elemento de resposta ao estrogênio (ERE), localizados na região promotora dos genes alvo de estrogênio (13,18). Na ausência de estrogênio, estes RE são inativos e não apresentam influência no DNA. Quando uma molécula de estrogênio entra na célula e passa para o centro do núcleo, ela se liga ao receptor, causando alteração na sua forma. Após estar acoplado aos ERE, os dímeros do complexo estrogênio-receptor ligam-se a proteínas correguladoras, que modulam a transcrição dos genes. A partir daí são produzidas moléculas de RNA mensageiro, levando à síntese de proteínas específicas, as quais irão influenciar o comportamento celular dependendo do tipo de célula envolvida (17,18,19,20,21). (Figura 2).



As proteínas co-ativadoras (AIB 1, CBP/p300, PCAFSRC-1) ligam-se ao RE, quando estes encontram-se ativados, sendo transcritos os genes de TGF α , VEGF, PDGF, IGF-1 e IRS, que são fatores de crescimento polipeptídicos mitogênicos, responsáveis pelo crescimento celular induzido pelo estrogênio (9, 18, 20). Por outro lado, na ausência do ligante, as proteínas corressoras, tais como NcoR e SMRT, ocupam o domínio de ligação ao DNA dos RE, impedindo que compostos ativadores se liguem ao receptor, interferindo, dessa forma, no processo de transcrição dos genes em questão (22).

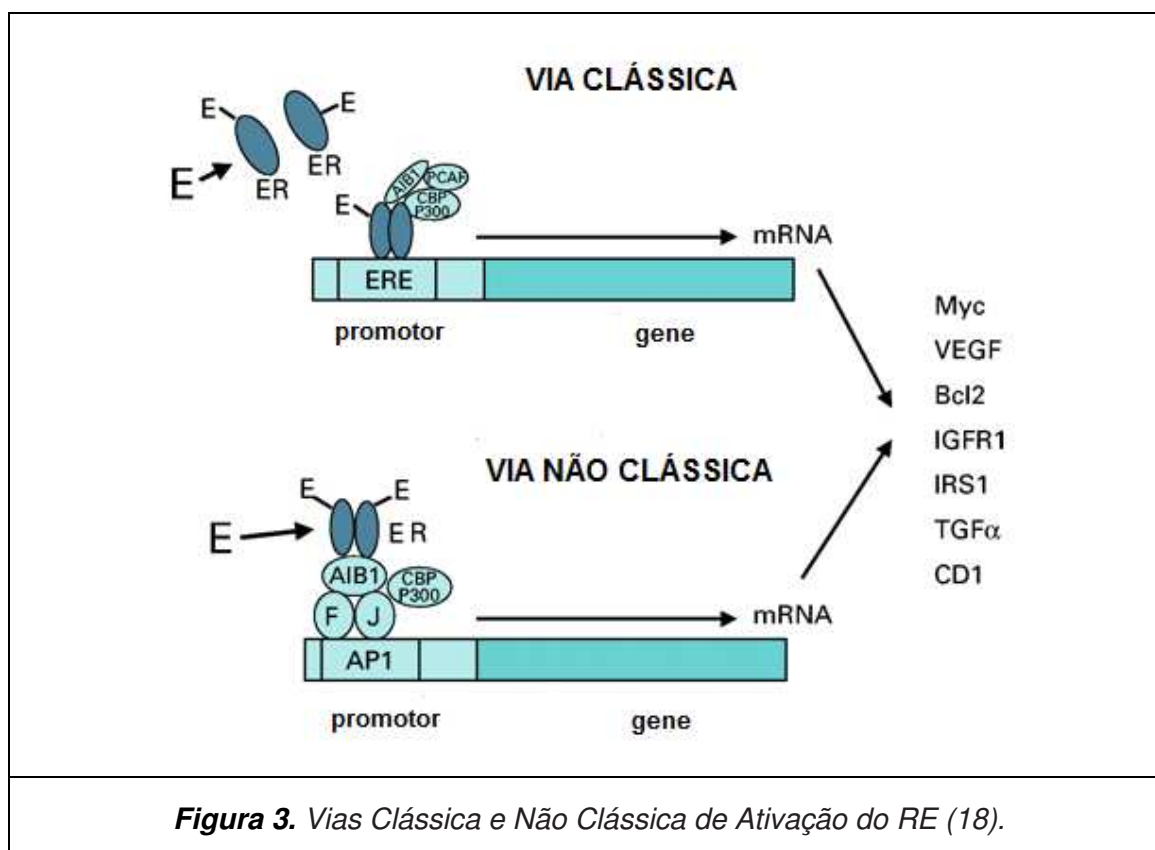
A atividade antiestrogênica do tamoxifeno, assim como dos SERM em geral, pode ser atribuída, em parte, à inibição de alterações conformacionais do

RE α , importantes para a ligação de moléculas ativadoras (9,19). Normalmente, quando se liga ao estrogênio, ocorre o reposicionamento da hélice 12, que engloba o ligante em bolso hidrofóbico do domínio de ligação ao hormônio, permitindo, dessa forma, que proteínas coativadoras sejam recrutadas. O mesmo não ocorre quando há interação do tamoxifeno com o RE. Neste, a cadeia lateral alquilaminoetóxi interage com um resíduo de asparagina (aminoácido 351), impedindo a rotação da hélice 12 do RE, que, por esse motivo, não fecha o local hidrofóbico do receptor, fazendo com que não haja exposição de aminoácidos importantes para a ligação de moléculas coativadoras, o que leva ao bloqueio da transcrição gênica (9,11,19,23).

Entretanto, além desta via clássica, ativada pelo chamado sítio de ativação AF-2 (função de ativação 2), localizado no domínio E do RE, o estrógeno, assim como o tamoxifeno e outros SERMs, podem estimular um outro sítio de ativação do RE, chamado AF-1 (função de ativação 1), localizado no domínio A/B (9).

No processo de transcrição gênica pela via não clássica (AF-1), o estrogênio também pode interagir com sítios alternativos presentes na molécula de DNA, como AP-1, SP1 ou USF, sendo que, neste caso, os dímeros formados pela ativação do RE não irão ligar-se aos ERE. Esses dímeros irão acoplar-se aos fatores de transcrição c-jun (J) e c-fos (F) que se ligam à molécula de DNA e a proteínas coativadoras. Através desse mecanismo de ativação da transcrição podem ser estimulados vários genes, como os que codificam o receptor de IGF-1, ciclina D1 (que controla positivamente o ciclo celular), c-myc, bcl-2 (fator antiapoptose) e catepsina D (18) (Figura 3). O complexo RE-tamoxifeno também

pode unir-se ao AP-1; assim, este sítio AF-1 parece ter contribuição para o efeito agonista do tamoxifeno em alguns órgãos (9,19).



Além de poder ativar as vias clássica e não clássica através da interação com RE, o tamoxifeno ainda pode interagir com outras proteínas celulares como a proteína C quinase, calmodulina e proteínas de membrana, aumentando ainda mais a complexidade de sua ação (24,25).

1.2. O Efeito do Tamoxifeno no Endométrio

No endométrio, o tamoxifeno tem uma ação agonista parcial; assim seu efeito varia de acordo com o nível de estrógeno (9). Na pré-menopausa, com alta concentração de estrógeno, ele mostra efeito antagonista, enquanto na pós-menopausa, com baixa concentração de estrógenos, tem efeito agonista (1,26).

Cheng et al. (1997) (27) demonstraram não haver diferença na linha endometrial, aumento uterino ou achados histopatológicos em mulheres na pré-menopausa usuárias de tamoxifeno em comparação a não usuárias. Buij et al. (2009), (28), inclusive, demonstraram que cerca de 40% das pacientes usuárias de tamoxifeno apresentaram amenorreia, sem confirmação de menopausa, demonstrando uma ação antiestrogênica da droga em ambiente rico em estrógeno.

Em contrapartida, em mulheres menopausadas usuárias de tamoxifeno, observa-se maior incidência de patologias endometriais como pólipos, hiperplasia, carcinoma e sarcoma (29). Muitos estudos já demonstraram um aumento no risco de neoplasia maligna endometrial em pacientes usuárias de tamoxifeno, sendo a droga considerada um fator de risco para a doença (30,31,32,33). A frequência de carcinoma de endométrio aumenta com a duração do uso do tamoxifeno, sendo maior após 5 anos (6,4%) (34). Existe também um efeito dose-dependente com maiores taxas de carcinoma com doses diárias de 40mg (0,5%) *versus* 20mg (0,1%) (35). Entretanto, o pólio endometrial é a alteração mais frequente do endométrio nas usuárias de tamoxifeno (29,36.37). Deligdisch et al. (2000) (29), avaliando achados histológicos de 700 mulheres usuárias de

tamoxifeno, com sangramento anormal ou alteração ultrassonográfica, encontraram 40% de patologias endometriais, com 4,71% de prevalência de câncer. A alteração mais frequente foi o pólipó endometrial (23,14%). Esses dados são semelhantes ao publicado por Dibi et al. (2009) (36), que encontraram 30% de pólipos e 10% de câncer em grupo similar de pacientes. Esses estudos avaliaram somente as usuárias de tamoxifeno que apresentavam alteração ao ultrassom ou sangramento uterino anormal (29,36,37).

Maugeri et al. (2001) (37) acompanharam, por 60 meses, 124 usuárias de tamoxifeno, encontrando a incidência de 13,6% de pólipó endometrial, enquanto em 104 pacientes com antecedente de câncer de mama, mas sem uso de tamoxifeno, não houve alteração histeroscópica durante o mesmo período de acompanhamento. Incidência semelhante foi encontrada por Marttunen et al. (2001) (38), que descreveram que 16,6% das usuárias da droga apresentaram pólipó endometrial após 3 anos de seguimento.

Entretanto, o achado histológico mais encontrado em usuárias de tamoxifeno é a atrofia (1,29,37,38,39). Existe uma discrepância entre os achados ultrassonográfico e histeroscópico nestas pacientes (39). Mulheres na pós-menopausa que fazem uso da medicação apresentam uma linha endometrial mais espessa ao ultrassom transvaginal, geralmente associada à ecogenicidade irregular, sendo que entre 45% e 90% dos casos este achado ultrassonográfico não foi confirmado pela histeroscopia ou biópsia endometrial (1). Isso se deve ao fato de o tamoxifeno levar a uma atrofia cística, ou seja, há uma dilatação das glândulas com

condensação do estroma periglandular, enquanto o endométrio mantém-se atrófico, podendo estar associada ou não aos pólipos endometriais (39).

1.3. Os Pólipos Endometriais

Os pólipos endometriais constituem projeções localizadas do tecido endometrial, sésseis ou pediculadas, únicas ou múltiplas, onde se observa uma distribuição irregular das glândulas, estroma hiper celular e vasos sanguíneos com paredes espessadas, recobertas por epitélio pseudoestratificado ativo ou, na pós-menopausa, por epitélio plano e inativo (40). Nas pacientes usuárias de tamoxifeno, eles são mais translúcidos e edematosos. Microscopicamente, são mais fibróticos, com menos celularidade estromal e podem apresentar alterações glandulares secretoras e decidualização do estroma (29,41,42).

Clinicamente, os pólipos endometriais estão associados a sangramento na pós-menopausa, menorrágia, sangramento intermenstrual e infertilidade. Em pacientes com esses sintomas, a prevalência de pólipo varia de 6% a 32%, dependendo da população estudada e do método diagnóstico utilizado. Sua prevalência aumenta com a idade, sendo muito mais frequente na menopausa (43).

Apesar de estar associados aos sintomas citados, são frequentemente assintomáticos, sendo detectados devido ao aumento da linha endometrial ao ultrassom, como demonstrado por Dreisler et al. (2009) (43), que encontraram 82% de pólipos em pacientes assintomáticas, e por Lieng et al. (2007) (44), com 31,4% de pacientes assintomáticas.

Até o momento, a avaliação histológica dos pólipos endometriais consiste na única maneira de excluir com segurança a existência de malignidade, sendo a polipectomia histeroscópica o método de escolha (44,45).

A histeroscopia diagnóstica desempenha alta acurácia no diagnóstico dos pólipos endometriais, mas não consegue estimar adequadamente a presença de lesões hiperplásicas e pré-malignas nos mesmos. Portanto, ao diagnóstico de pólipo, a polipectomia histeroscópica tornou-se rotina, com ressecção de toda a estrutura encontrada, para assim obter-se uma avaliação histológica fidedigna (44,46).

Isso ocorre pois, apesar dos pólipos serem geralmente considerados benignos, eles podem estar associados à presença de alterações pré-malignas e malignas, com uma prevalência na literatura que varia de 0,2% a 23,8% em lesões pré-malignas e de 0 a 12,9% em alterações malignas (44-48).

Idade, menopausa e sangramento aumentam esse risco de malignidade (45,46,47,48,49,50). Em uma revisão sistemática, Lee et al. (2010) (49), encontraram prevalência de pólipos pré-maligno e maligno de 5,42% na pós-menopausa e somente 1,7% na menacme (risco relativo de 3,86). E entre as menopausadas, pacientes sintomáticas tiveram 4,47% de malignidade enquanto as assintomáticas 1,51% (risco relativo de 3,36).

Em pólipos de usuárias de tamoxifeno, Antunes et al. (2007) (46) não encontraram associação com maior risco de malignidade. Entretanto, outros estudos sugerem essa associação, como observado por Cohen et al. (1999)

(51), que encontraram 3% de malignidade nos pólipos de usuárias de tamoxifeno, contra 0,48% de não usuárias. A taxa de malignidade relatada em pólipos endometriais de mulheres usuárias de tamoxifeno varia de 2% a 10,7% nos estudos (29,46,51,52,53).

O estímulo para o crescimento focal do endométrio permanece incerto, porém acredita-se que existe intensa influência hormonal, uma vez que os pólipos não aparecem antes da menarca e apresentam, como fatores de risco, a obesidade, menopausa tardia, os estados de exposição prolongada do endométrio à ação estrogênica sem oposição de progesterona e uso de tamoxifeno (54, 55, 56). Além disso, obesidade, hipertensão e *diabetes mellitus* são fatores de risco para malignização dos pólipos (45,57,58).

Corroborando com a teoria da influência hormonal na patogênese dos pólipos, estudos mostram uma maior expressão de RE no epitélio glandular e estroma de pólipos endometriais de pacientes menopausadas, se comparados ao endométrio atrófico adjacente (59,60,61). Lopes et al (62) fizeram esta mesma comparação, mas incluindo pacientes na pré-menopausa, e também encontraram aumento de RE no epitélio dos pólipos, mas não no seu estroma (62). Em relação ao RP, estudos mostram, em geral, uma maior expressão dos pólipos somente no epitélio, mas não no estroma, quando comparados ao endométrio atrófico adjacente (59, 60, 61, 62).

Isso sugere que os pólipos endometriais apresentam grande sensibilidade à ação de estrógeno e progesterona, e podem desenvolver-se mesmo em situações em que ocorre baixa concentração hormonal sérica (61).

Em relação à influência hormonal via RE, estudos comparando os pólipos de usuárias de tamoxifeno aos de não usuárias mostram uma menor expressão nos pólipos de usuárias de tamoxifeno, somente no estroma (63), somente no epitélio glandular (55), ou em ambos (64). Em relação ao RP, alguns estudos não encontraram diferenças entre usuárias e não usuárias de tamoxifeno (63,64), enquanto outros demonstraram uma maior expressão de RP no estroma de pólipos de usuárias em relação aos de não usuárias (55,65).

O aumento de RP com diminuição de RE demonstra realmente a ação agonista do tamoxifeno no endométrio, mas outros mecanismos de ação devem estar envolvidos na formação dos pólipos induzidos por esta droga (55). Ainda existem poucos estudos sobre receptores hormonais nos pólipos endometriais de usuárias de tamoxifeno, a maioria com casuísticas pequenas e resultados divergentes, o que tem dificultado a compreensão do desenvolvimento e evolução dos pólipos (55, 63,64,65).

Assim, a fisiopatologia do pólipo endometrial e seu poder de malignidade ainda não estão bem estabelecidos, bem como os reais mecanismos envolvidos na etiologia e carcinogênese das alterações endometriais induzidas pelo tamoxifeno.

Este estudo pretende avaliar a expressão de receptores hormonais (estrogênio e progesterona) e em pólipos endometriais em usuárias de tamoxifeno.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Comparar a expressão de receptores de estrógeno e progesterona em pólipos endometriais de usuárias de tamoxifeno com pólipos endometriais e endométrio atrófico de não usuárias na pós-menopausa.

2.2. Objetivos específicos

- Comparar a expressão de receptores de estrógeno e progesterona em pólipos endometriais de usuárias de tamoxifeno com endométrio atrófico de não usuárias na pós-menopausa.
- Comparar a expressão de receptores de estrógeno e progesterona em pólipos endometriais de usuárias de tamoxifeno com pólipos endometriais de não usuárias na pós-menopausa.
- Avaliar a combinação da expressão RE/RP nos três grupos estudados.

3. Publicação

Differences in estrogen and progesterone receptor expression in endometrial polyps and atrophic endometrium of postmenopausal women exposed and not exposed to tamoxifen

Leão R MD^a, Andrade L PhD^b, Vassalo J PhD^b, Antunes JR A PhD^a, Pinto-Neto A PhD^a, Costa-Paiva L PhD^a.

^a MD, Department of Obstetrics and Gynecology, State University of Campinas-UNICAMP School of Medicine, Campinas, São Paulo, Brazil.

^b MD, PhD, Department of Anatomical Pathology, State University of Campinas-UNICAMP School of Medicine, Campinas, São Paulo, Brazil.

Author for correspondence:

Lúcia Costa-Paiva

Address for correspondence:

Department of Obstetrics and Gynecology

School of Medicine, PO Box 6111

Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

Phone and FAX: 55-19-3521 9306

Email: paivaepaiva@uol.com.br

Funding/support: This research study was financed by a public research foundation (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo- FAPESP).

ABSTRACT

Postmenopausal women who are tamoxifen users have an increased incidence of endometrial alterations, such as polyps and hyperplasia, in addition to a higher risk of malignant endometrial neoplasm. Among these endometrial changes, polyps are the most common and their pathogenesis seems to be related to hormone influence. **Objectives:** To compare the expression of estrogen receptors (ER) and progesterone receptors (PR) in endometrial polyps of tamoxifen users to atrophic endometrium and endometrial polyps of postmenopausal nonusers of tamoxifen. **Material and methods:** Among women undergoing surgical hysteroscopy, 84 tamoxifen users with benign endometrial polyp were selected. This group was compared to 84 samples of atrophic endometrium and 252 benign polyps of postmenopausal women who were non-users of tamoxifen. ER/PR expression was assessed by immunohistochemistry study according to the percentage of stained cells, intensity of nuclear color and final score. **Results:** Polyps of tamoxifen users had a higher expression of ER and PR in the glandular epithelium and stroma, in relation to the atrophic endometrium ($p<0.0001$). Regarding polyps of women not treated with tamoxifen, users had a higher PR expression in the epithelium ($p=0.0014$) and stroma ($p=0.0056$), without any difference in ER expression. **Conclusions:** Polyps frequently exhibit increase in ER expression, independent of tamoxifen. High levels of PR appear to be consistent with agonist effects of the drug.

Keywords: endometrial polyp, tamoxifen, estrogen receptor, progesterone receptor

INTRODUCTION

Tamoxifen is an antineoplastic drug used in the treatment of estrogen-positive receptor breast cancer (1). The mechanism of action of tamoxifen in breast cancer is to inhibit cancer cell growth by competitive antagonism of estrogen at the estrogen receptor (ER)(2). In the classic model of estrogen stimulation, estrogen binds to the ER, which is inactive in the nucleus, inducing conformational changes in the receptor, facilitating its binding to specific DNA sites, termed estrogen response elements (ERE), and to coactivator proteins (AIB 1, CBP/P300, SRC-1), which activate the genes that encode progesterone receptors (PR), as well as those that encode mitogenic growth factors, such as TGF α , VEGF, PDGF, IGF-1 and IRS (2-5). In breast cells, the tamoxifen-receptor complex recruits the corepressors NCoR and SMRT, thereby repressing the transcription of these genes (6).

Nevertheless, despite its antagonist effect on breast tissue, tamoxifen behaves as a partial agonist in the endometrium (7). In the premenopausal period, when there are high estrogen concentrations, tamoxifen exerts an antagonist effect, while in the postmenopausal period, when estrogen concentrations are low, it has an agonist effect (8).

Thus, in menopausal women who use tamoxifen, a higher incidence of endometrial alterations is observed, e.g. polyps, hyperplasia, carcinoma and sarcoma, in addition to an increased risk of endometrial malignant neoplasm (9-14).

Among the endometrial alterations in tamoxifen users, polyps are the most common, with a prevalence of 13 to 30% (10,12,15,16). In patients treated with tamoxifen, polyps observed under a microscope are more translucent, edematous and more fibrotic, with less stromal cellularity (10).

The stimulating factor for focal growth of the endometrium is still uncertain. However, it is believed that considerable hormonal influence exists. Studies have shown a higher ER expression in the epithelium and stroma of endometrial polyps in menopausal patients, in comparison to the adjacent atrophic endometrium (17-19). Concerning the PR, in general studies have shown a higher expression only in the epithelium but not in the stroma of the polyp, when compared to the adjacent atrophic endometrium (17-20). This suggests that endometrial polyps have a higher sensitivity to estrogen and progesterone action. It is likely that polyps can develop even in the presence of low serum hormone concentration (19).

Comparing polyps of tamoxifen users to those of non-users, in general the studies showed a lower ER expression and increased PR expression in tamoxifen users, demonstrating an agonist action of tamoxifen on the endometrium. However, few studies were carried out, with small case studies and variable results (21-24).

Therefore, the pathophysiology of endometrial polyp and its malignant potential are still not definitely established, neither is the actual mechanism involved in endometrial alterations induced by tamoxifen.

The aim of this study was to assess ER/PR expression in endometrial polyps of menopausal tamoxifen users, compared to atrophic endometrium and to polyps from menopausal women who were nonusers of the drug.

METHODS

Data collection

This study was conducted in the Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti Women's Hospital–CAISM/UNICAMP, approved by the Research Ethics Committee of the

Universidade Estadual de Campinas (protocol number 004/2010). According to information retrieved from the computerized database of this institution, 1.050 women underwent surgical hysteroscopy for endometrial polypectomy from January 1998 to December 2008. Of the total number of women, all postmenopausal tamoxifen users histologically diagnosed with benign endometrial polyp were selected, remaining 84 women. This group was compared to 2 other groups of women: a second group of 84 samples of atrophic endometrium from postmenopausal women without use of hormone therapy (HT), and a third group of benign polyps from postmenopausal non-users of tamoxifen and no previous history of HT use. To form this group, 3 controls were randomly selected for each polyp of tamoxifen users by simple random sampling. Sample units were uniformly distributed (the same subject had the same probability of being chosen), using SAS software version 9.2, totaling 252 benign polyps from postmenopausal who were not treated with tamoxifen.

Clinical, histopathological and hysteroscopic data was collected from patient records. The clinical characteristics observed were age, postmenopausal bleeding, arterial hypertension, obesity and diabetes mellitus.

Surgical hysteroscopy was performed by a gynecologist, with the patient under spinal anesthesia. A 10-mm monopolar gynecologic resectoscope with a loop electrode was used for the procedure (Karl Storz ®). A 1.5% glycine solution was the agent used for distension of the uterine cavity. The endocervical canal and uterine cavity were assessed. Hysteroscopic resection was performed using monopolar energy.

Pathologists of the Department of Pathological Anatomy of the UNICAMP School of Medicine analyzed the endometrial samples, using hematoxylin-eosin (H&E) for staining.

Construction of TMA (Tissue Microarray)

Initially, a pathologist from the Department of Pathological Anatomy at the UNICAMP School of Medicine studied the section slides representative of endometrial polyps stained with H&E. Two regions that best represented the stroma and glandular epithelium were selected for the construction of tissue microarray (TMA) and a technique validated for the endometrium was adopted (25). The selected regions were then identified in the archival paraffin blocks (donor block). These marked donor blocks were sent to the Laboratory of Immunohistochemistry in the Department of Pathological Anatomy of the A. C. Camargo Cancer Hospital – São Paulo for construction of recipient blocks by using a TMA technique. A Tissue Microarrayer (Beecher Instruments, Silver Springs, USA) available in the Department of Pathological Anatomy of the AC Camargo Cancer Hospital-São Paulo was used. Cylinder cones measuring 1.0 mm from the region of interest obtained by the equipment were transferred to a new block with a two-dimensional layout and intercore spacing of 0.2 mm, determined and recorded by the equipment. From this new block, termed recipient block, histologic sections were obtained with a manual microtome and transferred in adhesive tape to special adhesive-coated slides (Instrumentics Inc., Hackensack, NJ, USA). The adhesive tape was removed under exposure

to ultraviolet light and the slides were stored, paraffin-embedded, vacuum-packed and frozen in a freezer at -20°C.

Immunohistochemistry

Estrogen and progesterone receptor expression was performed in the Laboratory of Immunohistochemistry of the Department of Pathology at the AC Camargo Cancer Hospital-São Paulo. TMA sections were 5µm thick. Deparaffinization was performed for 24 hours in an incubator at 60°C. Subsequently, the slides were rinsed in xylene at 60°C for 20 minutes/xylene at room temperature for 20 minutes/100% ethanol for 30 seconds/ 85% ethanol for 30 seconds/70% ethanol for 30 seconds. The slides were then washed in distilled tap water.

Citrate buffer solution 10 mM (pH 6.0) was heated to a boil in a pressure cooker (Eterna®, Nigro) without sealing the lid, immersing the slides into boiling retrieval buffer. The cooker was sealed with the safety valve in the open position. After release of the saturated vapor, the safety valve was lowered until total pressurization. Timing of the duration of antigen retrieval was started (about 4 minutes). The cooker remained closed under tap water until total depressurization. The lid of the cooker containing the slides was removed and the slides were washed in distilled tap water.

Endogeneous peroxidase block was performed with 3% H₂O₂ (hydrogen peroxide-10 vol) with 3 changes of 10 minutes each. The slides were washed in

distilled tap water and with PBS (phosphate buffered saline)-10mM (pH 7.4) for 5 minutes.

The slides with primary antibody diluted in a predefined titer were incubated in PBS buffer containing 1% bovine albumin (BSA) (Sigma, A9647, USA) and 0.1% sodium azide (NaN_3) for 18 hours in a humidity chamber at 4°C. Primary monoclonal antibodies for ER (Dako® code M7047, clone 1D5, dilution 1:250) and PR (Dako® code M3569, clone PgR 636, dilution 1:500) were used in the procedure.

The slides were washed in PBS buffer with 3 changes of 3 minutes each; incubated for 30 min at 37° C with Advance™ HRP Link (Dako cod# K4068, Carpinteria, CA, USA); washed with PBS buffer with 3 changes of 3 min each. The slides were then incubated with Advance™ HRP-Enzyme for 30 min at 37° C; and washed in PBS buffer with 3 changes of 3 minutes each. The slides were incubated in substrate solution: 100mg of 3,3' Diaminobenzidine-Tetrahydrochloride (DAB; code D-5637, Sigma, St Louis, MO, USA); 1mL of Dimethyl sulphoxide (DMSO); 1 mL of 6% H_2O_2 (hydrogen peroxide-20 vol); 100 mL PBS; for 5 minutes at 37°C and protected from light. The slides were washed in distilled tap water for 3 minutes and counterstained with Harris' Hematoxylin for 1 minute. The slides were then thoroughly washed in distilled tap water and immersed twice in ammonium water (0.5% ammonium hydroxide solution), followed by washing in distilled tap water. The slides were dehydrated in: 80% Ethanol, 30 seconds/95% Ethanol, 30 seconds/ 100% Ethanol twice, 30 seconds each/ Xylene 4 times, 30 seconds each. The slides were then mounted in Entellan-neu (code 1.07961, Merck, Darmstadt, Germany). On microscopy,

we observed a golden brown precipitate as a final reaction product that varied according to the type of receptor.

Immunohistochemistry Reading

A single pathologist read the TMA slides manually under conventional light microscopy. ER/PR expression was assessed in the stroma and glandular epithelium of polyp tissues (Figure 1). This receptor expression was evaluated by a semiquantitative method of nuclear reaction through analysis of the percentage of stained cells, intensity of nuclear staining and final score (26). The percentage of stained cells was visually estimated and categorized in the following manner: grade 0: none stained; grade 1: < 1% of stained cells; grade 2: from 1 to 10% stained cells; grade 3: from 11 to 33% stained cells; grade 4: from 34 to 66% stained cells; grade 5: > 66% stained cells. Regarding the intensity of nuclear staining, grading was as follows: grade 0: negative; grade 1: weak reaction; grade 2: moderate reaction and grade 3: intense reaction (26). The sum of positivity and intensity resulted in a final score, ranging from 0 to 8 (excluding value 1). Appropriate positive and negative controls were used.

Statistical analysis

The clinical characteristics between the 3 groups (benign polyps and tamoxifen users; atrophic endometrium and benign polyps and non-users of tamoxifen) were compared using the chi-square test and Fisher's exact test, corrected by the Bonferroni method (27, 28).

The mean final scores of ER and PR in the glandular epithelium and stroma of polyp tissue from tamoxifen users was compared to the mean scores of atrophic endometrium and polyps from non-users separately, using the Mann-Whitney test corrected by the Bonferroni method (27, 28). The SAS software version 9.2 was used. The level of significance was set at <0.05 .

RESULTS

The mean age of women with benign polyps using tamoxifen was 62.8 years ($SD\pm 9.5$), 63.1 years ($SD\pm 8.6$) in those with atrophic endometrium and 64.4 years ($SD\pm 10.4$) in those with benign polyps who did not use tamoxifen. There was no statistical difference between the 3 groups ($p=0.1737$). The mean length of tamoxifen use was 31.7 months ($SD\pm 18.8$) (data not shown). Postmenopausal bleeding and obesity were more common in the polyp group who did not use tamoxifen (Table 1).

Comparing the mean final score for ER and PR, polyp tissue from tamoxifen users had a higher ER/PR expression both in the glandular epithelium and stroma than in the atrophic endometrium, with a statistically significant difference ($p<0.0001$). Regarding polyps in non-users, tamoxifen users had a higher PR expression in the epithelium and stroma, with a significant difference. Despite the lower ER expression both in the glandular epithelium and stroma of tamoxifen users, there was no statistically significant difference (Table 2).

Evaluating the combination of ER and PR expression, we observed that in the atrophic endometrium, the majority of cases were RE-/RP- both in the epithelium and stroma. There were no cases of ER+/PR+. Both in the group of

polyps from tamoxifen users and the group of polyps from non-users of tamoxifen, there was a high percentage of cases with some positive hormone receptors and the majority was ER+/PR+ (Table 3).

DISCUSSION

This study was conducted to evaluate the effect of tamoxifen on ER/PR expression in endometrial polyps from postmenopausal women. The results have shown that polyps from tamoxifen users had a higher ER/PR expression compared to the atrophic endometrium and a higher PR expression than polyps from non-users of tamoxifen.

To the best of our knowledge, this study on immunohistochemical expression of hormone receptors in polyps of tamoxifen users is the largest case study in the literature that compared these three types of endometrial histology.

In the present study, we observed that the final score of ER/PR expression both in the glandular epithelium and stroma was much higher in polyps from tamoxifen users than in the atrophic endometrium. We failed to find other studies in the literature that specifically evaluated polyps in tamoxifen users in relation to atrophic endometrium, for comparison of results. A study by Elkas et al. (2000) evaluating benign endometrial samples of 20 tamoxifen users and 7 samples of atrophic endometrium from non-users of tamoxifen, showed overexpression of ER and PR in endometrial specimens of tamoxifen users, compared to controls. However, patients in the latter sample were HT users, which may have influenced receptor expression (29).

In a study by Scharztz et al. (1997), the authors only observed a higher PR expression in the glandular epithelium and lower ER expression in the stroma of normal endometrium from women treated with tamoxifen when compared to atrophic controls, but also failed to assess polyps (24).

Dibi et al. (2009) evaluating polyps and atrophic endometrium, both in tamoxifen users, observed a high progesterone expression in both polyp tissue and the atrophic endometrium, and a higher ER expression in polyps (15).

Despite a diversity of studies, all reported that the endometrium has a higher PR expression under tamoxifen action, in agreement with our study.

Regarding polyps removed from tamoxifen users, our study found a higher PR expression both in the glandular epithelium and stroma when compared to polyps from non-users. The ER, despite a lower expression in tamoxifen users, did not show any statistical significance. There are few similar studies in the literature and the results are variable. Cohen et al. (1997) found a lower ER expression in the epithelium and stroma of polyps from tamoxifen users (21), while Macgurgan et al. (2006) reported this finding only in the epithelium (22) and Scharztz et al. (1997) only in the stroma (24). Concerning PR, MacGurgan et al. (2006) demonstrated a higher expression in the stroma of polyps from tamoxifen users (22), while other studies did not find any difference (21, 24).

Our study did not find a higher ER expression in the group that did not use tamoxifen, as described in some studies. The reason for this may be because our nonuser group had a higher body mass index (BMI). A previous study by Belisário et al. (2006) demonstrated that polyps removed from patients with a higher BMI had a lower ER expression (17). Another factor that may have

contributed to this result was the short period of tamoxifen use in our study, which was a mean duration of 31 months. In a study by Schwartz, the mean duration of tamoxifen use was 49 months and in a study by Cohen, mean tamoxifen use was 42 months (21, 24).

Despite heterogeneity of the studies and results, when we assessed our results in conjunction with the literature, it seems feasible to accept that polyps have a higher ER expression, independent of tamoxifen use. These findings are consistent with those of other studies showing a higher ER expression in polyps from nonusers of tamoxifen, in comparison with ER expression in the adjacent atrophic endometrium (15, 23).

Tamoxifen appears to have little effect on ER expression. However, it is important to highlight that the drug may act by increasing PR in endometrial polyps. This result is consistent with histologic findings in polyps from tamoxifen users, which may present glandular secretory alterations and decidualization of the stroma, demonstrating a progestin effect (30, 31).

ERs are nuclear receptors that bind to a ligand and act as potent transcription factors, controlling the expression of various genes, including those that encode the PR (32, 33). Thus, PR expression is not related to progestational status, but is a consequence of estrogen stimulation (34). Therefore, tamoxifen demonstrates estrogen agonist action, increasing PR in the endometrium.

ER expression seems to be linked to a process of self-regulation, dependent on hormonal factors, but this is still unclear (21). It is a fact that its increased expression in polyps demonstrates a higher sensitivity of this tissue to estrogen influence.

CONCLUSION

Ours results suggest that polyps frequently have increased ER levels that are not necessarily dependent on tamoxifen effect. On the other hand, the high levels of PR appear to be consistent with the estrogenic effects of tamoxifen.

Although there seems to be considerable hormonal influence, the pathogenesis of a polyp is still not fully understood, neither is the precise action of tamoxifen in the development of this endometrial alteration. Other mechanisms of action must be involved.

REFERENCES

1. Goldstein SR. Controversy about uterine effects and safety of SERMs: the saga continues. *Menopause*. 2002 Sep-Oct;9(5):381-4.
2. Mourits MJ, De Vries EG, Willemse PH, Ten Hoor KA, Hollema H, Van der Zee AG. Tamoxifen treatment and gynecologic side effects: a review. *Obstet Gynecol*. 2001 May; 97(5 Pt 2):855-66.
3. Katzenellenbogen JA, O'Malley BW, Katzenellenbogen BS. Tripartite steroid hormone receptor pharmacology: Interaction with multiple effector sites as a basis for the cell- and promotor-specific action of these hormones. *Mol Endocrinol*. 1996;10:119 –31.
4. Osborne CK, Schiff R. Estrogen-receptor biology: continuing progress and therapeutic implications. *Journal of Clinical Oncology*. 2005 Mar; 23, (8),1616-1622.

5. Shang Y, Brown M. Molecular determinants for the tissue specificity of SERMs. *Science*. 2002 Mar 29; 295(5564):2465-8.
6. Gielen SC, Kuhne LC, Ewing PC, Blok LJ, Burger CW. Tamoxifen treatment for breast cancer enforces a distinct gene-expression profile on the human endometrium: an exploratory study. *Endocr Relat Cancer*. 2005 Dec;12(4):1037-49.
7. de Cremoux P. Hormonothérapie des cancers du sein. *Bull Cancer*. 2011 Nov 1; 98(11):1311-9.
8. Gielen SC, Santegoets LA, Hanifi-Moghaddam P, Burger CW, Blok LJ. Signaling by estrogens and tamoxifen in the human endometrium. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2008 Apr;109(3-5):219-23.
9. Curtis RE, Boice JD, Shriner DA, Hankey BF, Fraumeni JF. Second cancers after adjuvant therapy for breast cancer [brief communication]. *J Natl Cancer Inst*. 1996; 88:332– 4
10. Deligdisch L, Kalir T, Cohen CJ, de Latour M, Le Bouedec G, Penault-Llorca F. Endometrial histopathology in 700 patients treated with tamoxifen for breast cancer. *Gynecol Oncol*. 2000 Aug; 78(2):181-6.
11. Fisher B, Constantino JP, Redmond CK, Fisher ER, Wickerham DL, Cronin WM. 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.

12. Maugeri G, Nardo LG, Campione C, Nardo F. Endometrial lesions after tamoxifen therapy in breast cancer women. *Breast J.* 2001 Jul-Aug; 7(4):240-4.
13. Mignotte H, Lasset C, Bonadona V, et al. Iatrogenic risk of endometrial carcinoma after treatment for breast cancer in a large French case-control study. Federation Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer (FNCLCC). *Int J Cancer.* 1998; 76:325–30.
14. Van Leeuwen FE, Benraadt J, Coebergh JWW, et al. Risk of endometrial cancer following breast cancer treatment with tamoxifen. *Lancet.* 1994;343:448–52.
15. Dibi RP, Zettler CG, Pessini SA, Ayub AV, de Almeida SB, da Silveira GP. Tamoxifen use and endometrial lesions: hysteroscopic, histological, and immunohistochemical findings in postmenopausal women with breast cancer. *Menopause.* 2009 Mar-Apr;16(2):293-300
16. Marttunen MB, Cacciatore B, Hietanen P, et al.. Prospective study on gynaecological effects of two antioestrogens tamoxifen and toremifene in postmenopausal women. *Br J Cancer.* 2001 Apr 6;84(7):897-902.
17. Belisário MS, Vassallo J, Andrade LA, Alvarenga M, Pinto GA, Monteiro IM. The expression of the hormone receptors in the endometrium and endometrial polyps in postmenopausal women and its relationship to body mass index. *Maturitas.* 2006 Jan 10;53(1):114-8.

18. Inceboz US, Nese N, Uyar Y, et al. Hormone receptor expressions and proliferation markers in postmenopausal endometrial polyps. *Gynecol Obstet Invest.* 2006; 61(1):24-8.
19. Sant'Ana de Almeida EC, Nogueira AA, Candido dos Reis FJ, Zambelli Ramalho LN, Zucoloto S. Immunohistochemical expression of estrogen and progesterone receptors in endometrial polyps and adjacent endometrium in postmenopausal women. *Maturitas.* 2004; 49(3):229-33.
20. Lopes RG, Baracat EC, de Albuquerque Neto LC, et al. Analysis of estrogen- and progesterone-receptor expression in endometrial polyps. *J Minim Invasive Gynecol.* 2007 May-Jun;14(3):300-3.
21. Cohen I, Beyth Y, Altaras MM, et al. Estrogen and progesterone receptor expression in postmenopausal tamoxifen-exposed endometrial pathologies. *Gynecol Oncol.* 1997 Oct;67(1):8-15.
22. McGurgan P, Taylor LJ, Duffy SR, O'Donovan PJ. Does tamoxifen therapy affect the hormone receptor expression and cell proliferation indices of endometrial polyps? An immunohistochemical comparison of endometrial polyps from postmenopausal women exposed and not exposed to tamoxifen. *Maturitas.* 2006 Jun 20;54(3):252-9.
23. Mourits MJ, Ten Hoor KA, van der Zee AG, Willemse PH, de Vries EG, Hollema H. The effects of tamoxifen on proliferation and steroid receptor expression in postmenopausal endometrium. *J Clin Pathol.* 2002 Jul; 55(7):514-9.

24. Schwartz LB, Krey L, Demopoulos R, Goldstein SR, Nachtigall LE, Mittal K. Alterations in steroid hormone receptors in the tamoxifen-treated endometrium. *Am J Obstet Gynecol.* 1997 Jan;176(1 Pt 1):129-37.
25. Fons G, Hasibuan SM, van der Velden J, ten Kate FJ. Validation of tissue microarray technology in endometrioid cancer of the endometrium. *J Clin Pathol.* 2007; 60(5):500-3
26. Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, Allred DC. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol.* 1999; 17:1474-81.
27. Holm, S. A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scandinavian Journal of Statistics.* 1979; 6:65–70.
28. Shaffer, JP. Multiple Hypothesis Testing. *Annual Review of Psychology.* 1995; 46:561–584.
29. Elkas J, Armstrong A, Pohl J, Cuttitta F, Martínez A, Gray K. Modulation of endometrial steroid receptors and growth regulatory genes by tamoxifen. *Obstet Gynecol.* 2000 May;95(5):697-703.
30. Corley D, Rowe J, Curtis MT, Hogan WM, Noumoff JS, Livolsi VA. Postmenopausal bleeding from unusual endometrial polyps in women on chronic tamoxifen therapy. *Obstet Gynecol.* 1992 Jan;79(1):111-6.
31. Kennedy MM, Baigrie CF, Manek S. Tamoxifen and the endometrium: review of 102 cases and comparison with HRT-related and non-HRT-related endometrial pathology. *Int J Gynecol Pathol.* 1999 Apr; 18(2):130-7.

32. Green S, Chambon P. Nuclear receptors enhance our understanding of transcription regulation. *Trends Genet.* 1988;4:309 –14.
33. Parker MG, Fawell SE, Lees JA, White R, Emmans CE, Danielian P. Function of estrogen receptor as a transcription factor: A target for antiestrogens. In: Brugge J, Curran E, McCormick F, eds. *Origins of human cancer: A comprehensive review.* Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1991:667–74.
34. Brys M, Szylo K, Romanowicz-Makowska H, Dobrowolski Z, Maslowska I, Krajewska W. Expression of estrogen and progesterone receptor genes in endometrium, myometrium and vagina of postmenopausal women treated with estriol. *São Paulo Med J.* 2009; 127(3):128-33.

Table 1 – Clinical characteristics of postmenopausal women with benign polyps and use of tamoxifen, with benign polyps and without use of tamoxifen and atrophic endometrium (n=422)

	Atrophic Endometrium (n=84)		p value ^a	Polyps from tamoxifen users(n=84)		p value ^b	Polyps from non-users of tamoxifen (n=252)	
	n	%		n	%		n	%
Age			1.0000			1.0000*		
<40	0	0		0	0		1	0.4
40-59	33	39.8		33	41.3		115	45.8
≥ 60	50	60.2		47	58.8		135	53.2
Postmenopausal bleeding			1.0000			<0.0001		
Yes	7	9.6		7	8.5		103	41.9
No	66	90.4		75	91.5		143	48.1
Hypertension			0,3717			0.4362		
Yes	35	47.9		50	60.2		173	68.9
No	38	52.1		33	39.8		78	31.1
DM			0.6336			0.0531		
Yes	8	11.0		15	18.1		79	31.6
No	65	89.0		68	81.9		171	68.4
BMI			1.0000			<0.0001		
<30	48	66.7		57	67.9		105	42.3
≥30	24	33.3		27	32.1		143	57.7

Chi-square test/ *Fisher's exact test

^aatrophic endometrium X polyp with tamoxifen

^bpolyp with tamoxifen X polyp without tamoxifen

Table 2 – Final score of RE and RP in the glandular epithelium and stroma of benign polyps with the use of tamoxifen, benign polyps without the use of tamoxifen and atrophic endometrium (n=422)

Final score	Atrophic Endometrium				Polyp in Tamoxifen user				Polyp in non-user of Tamoxifen		
	n	mean	SD	*p value ^a	n	mean	SD	*p value ^b	n	mean	SD
ER gland	77	0.1	0.7	<0.0001	82	5.3	0.7	1.0000	247	5.9	3.2
ER stroma	77	0.1	0.6	<0.0001	83	4.8	0.6	1.0000	249	5.4	3.2
PR gland	82	0.7	2.3	<0.0001	82	7.5	2.3	0.0014	243	6.6	1.1
PR stroma	83	0.6	2.0	<0.0001	83	6.3	2.0	0.0056	245	5.3	1.6

*Mann-Whitney test: ^aatrophic endometrium X polyp with tamoxifen
^bpolyp with tamoxifen X polyp without tamoxifen

obs: p-value corrected by Bonferroni method (independent tests)

Table 3 – Comparison of the combination of final RE and RP scores in the glandular epithelium and stroma of benign polyps with the use of tamoxifen, benign polyps without the use of tamoxifen and the atrophic endometrium (n=422)

Final score ER /PR	Atrophic endometrium		p-value ^a	Polyp in tamoxifen User		p-value ^b	Polyp in non-user of tamoxifen	
	n	%		n	%		n	%
Gland Epithelium								
ER+/PR+	0	0.0		60	74.1		197	82.4
ER+/RP-	3	4.0		1	1.2		9	3.8
RE-/PR+	8	10.7		20	24.7		25	10.5
Total positive	11	14.7	< 0.0001	81	100	1.0000*	231	97.6
ER-/PR-	64	85.3		0	0		8	3.3
Stroma								
ER+/PR+	0	0		58	70.7		187	77.3
ER+/PR-	2	2.6		1	1.2		16	6.6
ER-/PR+	7	9.2		22	26.8		28	11.6
Total positive	9	11.8	< 0.0001	81	98.8	1.0000*	231	95.5
ER-/PR-	67	88.2		1	1.2		11	4.5

Chi-square test/ *Fisher's exact test

^aatrophic endometrium X polyp with tamoxifen

^bpolyp with tamoxifen X polyp without tamoxifen

obs: p-value corrected by Bonferroni method (independent test)

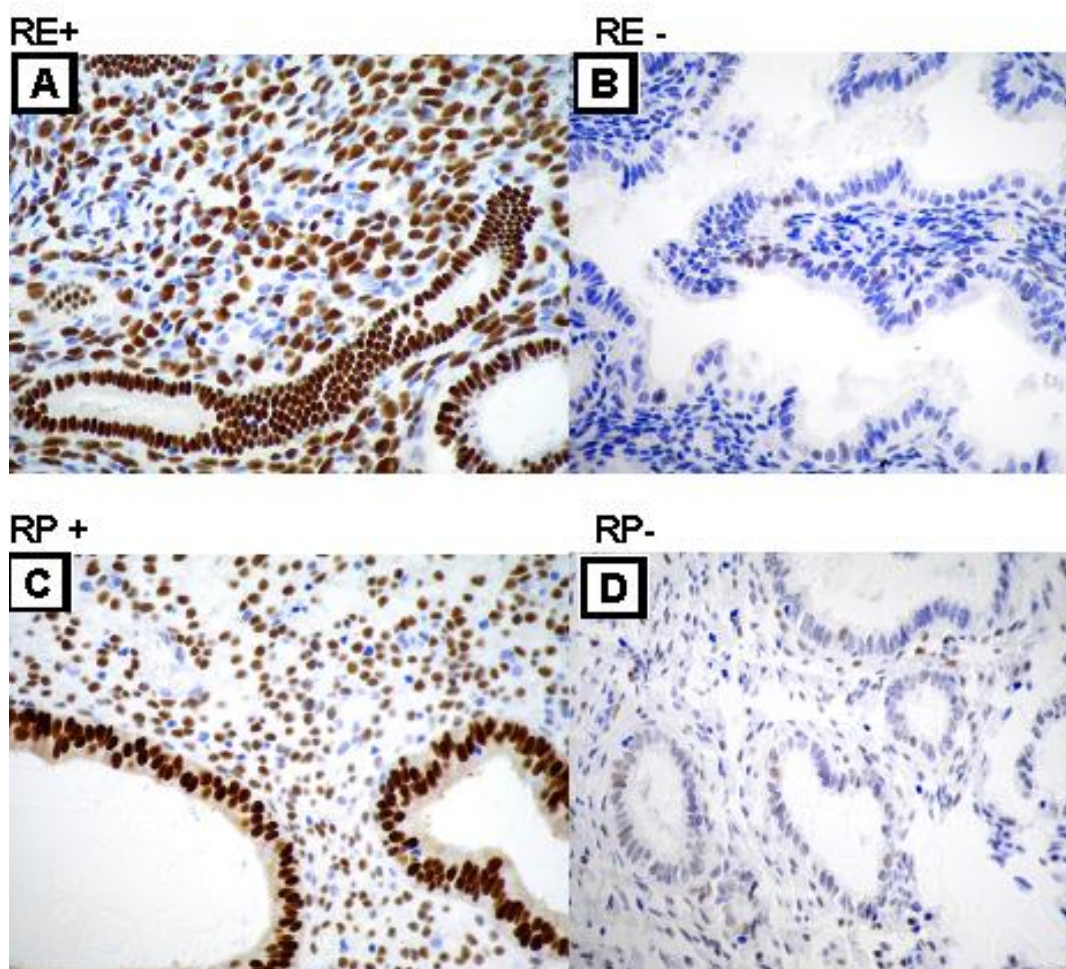


Figure 1. Endometrium with immunohistochemical reaction for ER (A, B) and PR (C, D).

4. Conclusões

- As expressões de RE e RP no epitélio glandular e no estroma nos pólipos endometriais de usuárias de tamoxifeno foram maiores do que no endométrio atrófico de não usuárias na pós-menopausa.
- Não houve diferença na expressão de RE no epitélio glandular e no estroma entre pólipos endometriais de usuárias e não-usuárias de tamoxifeno. A expressão de RP no epitélio glandular e no estroma dos pólipos endometriais de usuárias de tamoxifeno foi maior do que nos pólipos de não-usuárias na pós-menopausa.
- A expressão de RE+/RP+ foi alta nos pólipos endometriais de usuárias e não usuárias de tamoxifeno. A maioria das mulheres na pós-menopausa com endométrio atrófico apresentou expressão de RE-/RP-.

5. Referências Bibliográficas

1. Mourits MJ, De Vries EG, Willemse PH, Ten Hoor KA, Hollema H, Van der Zee AG. Tamoxifen treatment and gynecologic side effects: a review. *Obstet Gynecol.* 2001;97(5 Pt 2):855-66.
2. Clarke MJ Withdrawn: Tamoxifen for early breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008; 8 (4):CD000486.
3. Goldstein SR. Controversy about uterine effects and safety of SERMs: the saga continues. *Menopause.* 2002; 9(5):381-4.
4. Riggs BL, Hartmann LC. Selective estrogen-receptor modulators -mechanisms of action and application to clinical practice. *N Engl J Med.* 2003; 348(7):618-29.
5. Ring A, Dowsett M. Mechanisms of tamoxifen resistance. *Endocrine-related. Cancer.* 2004; 11 643–58.
6. Green S, Chambon P. Nuclear receptors enhance our understanding of transcription regulation. *Trends Genet.* 1988;4:309-14.
7. Parker MG, Fawell SE, Lees JA, White R, Emmans CE, Danielian P. Function of estrogen receptor as a transcription factor: A target for antiestrogens. In: Brugge J, Curran E, McCormick F (eds.). *Origins of human cancer: A comprehensive review.* Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1991:667–74.

8. Sutherland RL, Green MD, Hall RE, Reddel RR, Taylor IW. Tamoxifen induces accumulation of MCF-7 human mammary carcinoma cells in G0/G1 phase of the cell cycle. *Eur J Clin Oncol* .1983;19:615–21.
9. de Cremoux P. Hormonothérapie des cancers du sein. *Bull Cancer*. 2011; 98(11):1311-9.
10. Morani A, Warner M, Gustafsson JA. Biological functions and clinical implications of oestrogen receptors alfa and beta in epithelial tissues. *J Intern Med*. 2008; 264(2):128-42. Epub 2008 May 29.
11. Kumar V, Green S, Stack G, Berry M, Jin JR, Chambon P. Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell*.1987; 51: 941–51.
12. Vegeto E, Allan GF, Schrader WT, Tsai MJ, McDonnell DP, O'Malley BW. The mechanism of RU486 antagonism is dependent on the conformation of the carboxy-terminal tail of the human progesterone receptor. *Cell*. 1992; 69: 703-13.
13. Diez-Perez A. Selective estrogen receptor modulators (SERMS). *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2006; 50(4):720-34.
14. Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Häggblad J, Nilsson S et al. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*. 1997;138(3):863-70.
15. Boyapati SM, Shu XO, Ruan ZX, Cai Q, Smith JR, Wen W et al. Polymorphisms in ER-alpha gene interact with estrogen receptor status in breast cancer survival. *Clin Cancer Res*. 2005;11(3):1093-8.
16. Cai Q, Gao YT, Wen W, Shu XO, Jin F, Smith JR, Zheng W. Association of breast cancer risk with a GT dinucleotide repeat polymorphism upstream of the estrogen receptor-alpha gene. *Cancer Res*. 2003; 63(18):5727-30.

17. Katzenellenbogen JA, O'Malley BW, Katzenellenbogen BS. Tripartite steroid hormone receptor pharmacology: Interaction with multiple effector sites as a basis for the cell- and promotor-specific action of these hormones. *Mol Endocrinol.* 1996;10:119-31.
18. Osborne CK, Schiff R. Estrogen-receptor biology: continuing progress and therapeutic implications. *Journal of Clinical Oncology*; 2005;23(8):1616-22.
19. Brzozowski AM, Pike AC, Dauter Z, Hubbard RE, Bonn T, Engstrom O et al. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature.* 1997; 389: 753-8.
20. Gielen SC, Kuhne LC, Ewing PC, Blok LJ, Burger CW. Tamoxifen treatment for breast cancer enforces a distinct gene-expression profile on the human endometrium: an exploratory study. *Endocr Relat Cancer.* 2005; 12(4):1037-49.
21. Shang Y, Brown M. Molecular determinants for the tissue specificity of SERMs. *Science.* 2002; 295(5564):2465-8.
22. McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BW. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev.* 1999; 20(3):321-44.
23. Levenson AS, Jordan VC. Selective oestrogen receptor modulation: molecular pharmacology for the millennium. *Eur J Cancer.* 1999; 35(14):1974-85.
24. Lam H-YP. Tamoxifen is a calmodulin antagonist in the activation of cAMP phosphodiesterase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984; 118:27-32.
25. O'Brian CA, Liskamp RM, Solomon DH, Weinstein IB. Inhibition of protein kinase C by tamoxifen. *Cancer Res.* 1985;45:2462-5.
26. Gielen SC, Santegoets LA, Hanifi-Moghaddam P, Burger CW, Blok LJ. Signaling by estrogens and tamoxifen in the human endometrium. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2008;109(3-5):219-23.

27. Cheng WF, Lin HH, Thorng PL, Huang SC. Comparison of endometrial changes among symptomatic tamoxifen-treated and nontreated premenopausal and postmenopausal breast cancer patients. *Gynecol Oncol* 1997; 66:233-7.
28. Buijs C, Willemse PH, de Vries EG, Ten Hoor KA, Boezen HM, Hollema H, et al. Effect of tamoxifen on the endometrium and the menstrual cycle of premenopausal breast cancer patients. *Int J Gynecol Cancer*. 2009; 19(4):677-81.
29. Deligdisch L, Kalir T, Cohen CJ, de Latour M, Le Bouedec G, Penault-Llorca F. Endometrial histopathology in 700 patients treated with tamoxifen for breast cancer. *Gynecol Oncol*. 2000; 78(2):181-6.
30. Curtis RE, Boice JD, Shriner DA, Hankey BF, Fraumeni JF. Second cancers after adjuvant therapy for breast cancer [brief communication]. *J Natl Cancer Inst*. 1996; 88:332– 4.
31. Fisher B, Constantino JP, Redmond CK, Fisher ER, Wickerham DL, Cronin WM. 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.
32. Mignotte H, Lasset C, Bonadona V, Lesur A, Luporsi E, Rodier JF et al. Iatrogenic risk of endometrial carcinoma after treatment for breast cancer in a large French case-control study. *Federation Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer (FNCLCC)*. *Int J Cancer*. 1998; 76:325–30.
33. Van Leeuwen FE, Benraadt J, Coebergh JWW, Kiemeny LALM, Gimbrere CHF, Otter R et al. Risk of endometrial cancer following breast cancer treatment with tamoxifen. *Lancet*. 1994;343:448–52.
34. Forlander T, Cedermark B, Mattson A, Skoog L, Theve T, Askergren J. Adjuvant tamoxifen in early breast cancer : occurrence of new primary cancer. *Lancet*. 1989;1:117-20.

35. De Muylder X, Neven P, De Somer M, Van Belle Y, Vanderick G, De Muylder E. Endometrial lesions in patients undergoing tamoxifen therapy. *Int J Gynaecol Obstet*. 1991; 36(2):127-30.
36. Dibi RP, Zettler CG, Pessini SA, Ayub AV, de Almeida SB, da Silveira GP. Tamoxifen use and endometrial lesions: hysteroscopic, histological, and immunohistochemical findings in postmenopausal women with breast cancer. *Menopause*. 2009; 16(2):293-300.
37. Maugeri G, Nardo LG, Campione C, Nardo F. Endometrial lesions after tamoxifen therapy in breast cancer women. *Breast J*. 2001; 7(4):240-4.
38. Marttunen MB, Cacciatore B, Hietanen P, Pyrhönen S, Tiitinen A, Wahlström T et al.. Prospective study on gynaecological effects of two antioestrogens tamoxifen and toremifene in postmenopausal women. *Br J Cancer*. 2001; 84(7):897-902.
39. Mourits MJE, Van der Zee AGJ, Willemse PHB, Ten Hoor KA, Hollema H, De Vries EGE. Discrepancy between ultrasonographic and hysteroscopic and pathologic endometrial findings in postmenopausal breast cancer patients using tamoxifen. *Gynecol Oncol*. 1999; 73:21– 6.
40. Kurman RL. *Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract*. 5th edition. New York: Springer Verlag. 2002. pp 448-50.
41. Corley D, Rowe J, Curtis MT, Hogan WM, Noumoff JS, Livolsi VA. Postmenopausal bleeding from unusual endometrial polyps in women on chronic tamoxifen therapy. *Obstet Gynecol*. 1992; 79(1):111-6.
42. Kennedy MM, Baigrie CF, Manek S. Tamoxifen and the endometrium: review of 102 cases and comparison with HRT-related and non-HRT-related endometrial pathology. *Int J Gynecol Pathol*. 1999; 18(2):130-7.

43. Dreisler E, Stampe SS, Ibsen PH, Lose G. Prevalence of endometrial polyps and abnormal uterine bleeding in a Danish population aged 20-74 years. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2009; 33:102-8.
44. Lieng M, Qvigstad E, Sandvik L, Jorgensen H, Langebrekke A, Istre O. Hysteroscopic resection of symptomatic and asymptomatic endometrial polyps. *J Minim Invasive Gynecol.* 2007; 14: 189-94.
45. Savelli L, De Iaco P, Santini D, Rosati F, Ghi T, Pignotti E et al. Histopathologic features and risk factors for benignity, hyperplasia, and cancer in endometrial polyps. *Am J Obstet Gynecol.* 2003; 188(4): 927-31.
46. Antunes A Jr, Costa-Paiva L, Arthuso M, Costa JV, Pinto-Neto AM. Endometrial polyps in pre- and postmenopausal women: factors associated with malignancy. *Maturitas.* 2007; 57(4): 415-21.
47. Anastasiadis PG, Koutlaki NG, Skaphida PG, Galazios GC, Tsikouras PN, Liberis VA. Endometrial polyps: prevalence, detection, and malignant potential in women with abnormal uterine bleeding. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2000; 21(2): 180-3.
48. Lieng M, Istre O, Qvigstad E. Treatment of endometrial polyps: a systematic review. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2010; 89:992-1002.
49. Lee SC, Kaunitz AM, Ramos LS, Rhatigan RM. The oncogenic potential of endometrial polyps. A Systematic Review and Meta-Analysis. *Obstet Gynecol.* 2010; 116:1197-205.
50. Machtinger R, Korach J, Padoa A, Fridman E, Zolti M, Segal J et al. Transvaginal ultrasound and diagnostic hysteroscopy as a predictor of endometrial polyps: risk factors for premalignancy and malignancy. *Int J Gynecol Cancer.* 2005; 15(2): 325-8.

51. Cohen I, Bernheim J, Azaria R, Tepper R, Sharony R, Beyth Y. Malignant endometrial polyps in postmenopausal breast cancer tamoxifen-treated patients. *Gynecol Oncol.* 1999; 75(1):136-41.
52. Berlière M, Charles A, Galant C, Donnez J. Uterine side effects of tamoxifen: a need for systematic pretreatment screening. *Obstet Gynecol.* 1998; 91(1):40-4.
53. Schlesinger C, Kamoi S, Ascher SM, Kendell M, Lage JM, Silverberg SG. Endometrial polyps: a comparison study of patients receiving tamoxifen with two control groups. *Int J Gynecol Pathol.* 1998;17(4):302-11.
54. Giordano G, Gnetti L, Merisio C, Melpignano M. Postmenopausal status, hypertension and obesity as risk factors for malignant transformation in endometrial polyps. *Maturitas.* 2007;56(2):190-7.
55. McGurgan P, Taylor LJ, Duffy SR, O'Donovan PJ. Does tamoxifen therapy affect the hormone receptor expression and cell proliferation indices of endometrial polyps? An immunohistochemical comparison of endometrial polyps from postmenopausal women exposed and not exposed to tamoxifen. *Maturitas.* 2006;54(3):252-9.
56. Onalan R, Onalan G, Tonguc E, Ozdener T, Dogan M, Mollamahmutoglu L. Body mass index is an independent risk factor for the development of endometrial polyps in patients undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2009; 91(4):1056-60. Epub 2008 Mar 5.
57. Baiocchi G, Mancini N, Pazzaglia M, Giannone L, Burnelli L, Giannone E et al. Malignancy in endometrial polyps: a 12-years experience. *Am J Obstet Gynecol.* 2009; 201:462.e 1-4.
58. Gregoriou O, Konidaris S, Vrachnis N, Bakalianou K, Salakos N, Papadias K et al. Clinical parameters linked with malignancy in endometrial polyps. *Climacteric.* 2009; 12:454-8.

59. Belisário MS, Vassallo J, Andrade LA, Alvarenga M, Pinto GA, Monteiro IM. 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(1):114-8.
60. Inceboz US, Nese N, Uyar Y, Ozcakil HT, Kurtul O, Baytur YB, et al. Hormone receptor expressions and proliferation markers in postmenopausal endometrial polyps. *Gynecol Obstet Invest*. 2006; 61(1):24-8.
61. Sant'Ana de Almeida EC, Nogueira AA, Candido dos Reis FJ, Zambelli Ramalho LN, Zucoloto S. Immunohistochemical expression of estrogen and progesterone receptors in endometrial polyps and adjacent endometrium in postmenopausal women. *Maturitas*. 2004; 49(3):229-33.
62. Lopes RG, Baracat EC, de Albuquerque Neto LC, Ramos JF, Yatabe S, Depesr DB et al. Analysis of estrogen- and progesterone-receptor expression in endometrial polyps. *J Minim Invasive Gynecol*. 2007; 14(3):300-3.
63. Schwartz LB, Krey L, Demopoulos R, Goldstein SR, Nachtigall LE, Mittal K. Alterations in steroid hormone receptors in the tamoxifen-treated endometrium. *Am J Obstet Gynecol*. 1997;176(1 Pt 1):129-37.
64. Cohen I, Beyth Y, Altaras MM, Shapira J, Tepper R, Cardoba M et al. Estrogen and progesterone receptor expression in postmenopausal tamoxifen-exposed endometrial pathologies. *Gynecol Oncol*. 1997; 67(1):8-15.
65. Mourits MJ, Ten Hoor KA, van der Zee AG, Willemse PH, de Vries EG, Hollema H. The effects of tamoxifen on proliferation and steroid receptor expression in postmenopausal endometrium. *J Clin Pathol*. 2002; 55(7):514-9.

6. Anexos

6.1. Anexo 1 – Submissão do Trabalho para Publicação

Reproductive Sciences

Main Menu → Author Dashboard → Submission Confirmation

Powered by SCHOLARONE Manuscripts

SAGE track

Log Out Online Help

Instructions & Forms

Edit Account

You are logged in as Lucia Costa-Paiva

Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to Reproductive Sciences.

Manuscript ID: RSCI-12-029

Title: Differences in estrogen and progesterone receptor expression in the endometrial polyp and atrophic endometrium of postmenopausal women exposed and not exposed to tamoxifen

Authors: Leão, Rogerio
Andrade, Liliana
Vassalo, Jose
Antunes-Junior, Armando
Pinto-Neto, Aarão
Costa-Paiva, Lucia

Date Submitted: 24-Jan-2012

Print

Return to Dashboard

ScholarOne Manuscripts™ v4.8.0 (patent #7,257,767 and #7,263,655). © ScholarOne, Inc., 2011. All Rights Reserved.
ScholarOne Manuscripts is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.

Follow ScholarOne on Twitter

6.2. Anexo 2 – Aprovação do Comissão de Pesquisa



Comissão de Pesquisa do DTG / CAISM

Campinas, 24 de fevereiro de 2010.

Protocolo nº: 004/2010

O protocolo de pesquisa *"Expressão de marcadores imunohistoquímicos e receptores hormonais nos pólipos endometriais em usuárias de tamoxifeno"* do pesquisador Rogério de Barros Ferreira Leão, sob a orientação da Profa. Dra. Lucia Helena Costa Paiva, foi aprovado pela Comissão de Pesquisa do DTG/CAISM em 23/02/2010.

Atenciosamente,

A handwritten signature in blue ink, belonging to Prof. Dr. José Guilherme Cecatti, is written over the printed name. The signature is stylized and fluid.

Prof. Dr. José Guilherme Cecatti
Presidente da Comissão de Pesquisa do DTG/CAISM

Rua Alexander Flemming, n.º101 – Cidade Universitária Zeferino Vaz – Campinas-SP
Fone: (19) 3521-9400
comissaopesquisa@caism.unicamp.br

6.3. Anexo 3 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 22/09/09.
(Grupo III)

PARECER CEP: N° 847/2009 (Este n° deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0664.0.146.000-09

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “**EXPRESSÃO DE RECEPTORES HORMONAIS, CICLO-OXIGENASE-2, AROMATASE, MARCADORES DE PROLIFERAÇÃO E APOPTOSE CELULAR EM PÓLIPOS ENDOMETRIAIS DE MULHERES NA PRÉ E PÓS-MENOPAUSA**”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Armando Antunes Junior

INSTITUIÇÃO: CAISM/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 11/09/2009

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 22/09/10 (O formulário encontra-se no *site* acima)

II - OBJETIVOS

Avaliar a prevalência de malignidade e a expressão de receptores hormonais, em pólipos endometriais malignos, benignos e na atrofia endometrial em mulheres na pré e pós-menopausa.

III - SUMÁRIO

Será realizado um estudo de corte transversal com mulheres selecionadas através da revisão da escala cirúrgica do Centro cirúrgico do CAISM/UNICAMP, sendo selecionadas todas aquelas que foram submetidas a histeroscopia cirúrgica para ressecção de pólipos no período de janeiro de 1998 a dezembro de 2007. Estima-se que haja neste período cerca 800 pólipos retirados por histeroscopia. Serão avaliadas as características clínicas e avaliados a expressão dos receptores de estrogênio e progesterona, expressão da aromatase, COX-2, Bcl2, Ki67 utilizando-se blocos de parafinas arquivados no Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da UNICAMP em todos os pólipos selecionados. Serão comparados a expressão desses receptores e marcadores entre pólipos benignos, malignos e mesmo número de amostras de endométrio atrófico de mulheres na pré e pós-menopausa. As reações de imunohistoquímica serão realizadas no Laboratório de Imunohistoquímica do Setor de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer através da técnica de arranjo em matriz de amostras teciduais, ou tissue microarray (TMA).

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

O projeto apresenta-se redigido com metodologia adequada. Os critérios de inclusão e exclusão estão bem definidos; cálculo do tamanho amostral e análise estatística muito bem embasados. Os aspectos éticos estão bem discutidos no corpo do projeto e solicita dispensa da aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O orçamento é detalhado.

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13083-887 Campinas – SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br



V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, a dispensa do Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, bem como todos os anexos incluídos na pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII – DATA DA REUNIÃO

Homologado na IX Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 22 de setembro de 2009.

Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

6.4. Anexo 4 – Ficha de Coleta de Dados

INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS

[illegible]

scopia cirúrgica: / /

Histerometria: , cm

Tamanho do pólio: mm Tipo: ☐ pediculado ☐ séssil

Localização: ☐ fúndico ☐ parede lat. D ☐ parede lat. E ☐ parede ant. ☐ parede post.
☐ ístmico ☐ cornua! D ☐ cornua! E

Superfície: ☐ lisa ☐ irregular ☐ cística

Vascularização: ☐ aumentada ☐ típica ☐ atípica ☐ ausente

Conduta: POLIPECTOMIA ☐ SIM ☐ NÃO
BIÓPSIA DE ENDOMÉTRIO ☐ SIM ☐ NÃO
CURETAGEM UTERINA ☐ SIM ☐ NÃO

AP: ☐ pólio atrófico-cístico ☐ endométrio proliferativo
☐ pólio da mucosa endometrial ☐ endométrio secretor
☐ pólio atrófico da mucosa endometrial ☐ endométrio atrófico
☐ pólio c/ hiperplasia simples ☐ carcinoma endometrial
☐ pólio c/ hiperplasia complexa s/ atípia ☐ outros achados:
☐ pólio c/ hiperplasia simples e focos de atípia
☐ pólio c/ hiperplasia complexa e focos de atípia

GRAU HISTOLÓGICO: ☐ bem diferenciado ☐ mod. diferenciado ☐ pouco diferenciado

ESTADIAMENTO: ☐ IA ☐ IIA ☐ IIIA ☐ IVA
☐ IB ☐ IIB ☐ IIIB ☐ IVB
☐ IC ☐ IIIC