

Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Programa de pós-graduação em patologia molecular

Estudo da instabilidade de microssatélites no pólipó endometrial uterino

Saete da Silva Rios

Brasília
2010

Estudo da instabilidade de microssatélites no pólipo endometrial uterino

**Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de Brasília para obtenção do
título de Doutor em Patologia Molecular.**

Orientador:

Prof. Dr. Florêncio Figueiredo

Co-Orientadora:

Profa. Dra. Rosângela V. Andrade

**Brasília
2010**

Salete da Silva Rios

**Estudo da instabilidade de microssatélites no pólipo endometrial
uterino**

Aprovada em 01/09/10

Prof. Dr. Florêncio Figueiredo-Presidente- UnB

Prof. Dra. Andrea Barreto Motoyama-UnB

Prof. Dra. Fabiana Pirani Carneiro-UnB

Prof. Dr. Robert Pogue –UCB

Profa. Dra. Tânia Torres Rosa- UnB

Profa. Dra. Miriam S. Wanderley—suplente-UnB

Rios, Salete da Silva
Estudo da instabilidade de microssatélites no pólipó endometrial uterino
Salete da Silva Rios- Brasília, 2010
80 f.:II; 30cm

Tese (Doutorado)-Universidade de Brasília, Faculdade de Medicina-
Brasília, 2007
Orientação: Prof. Dr. Florêncio Figueiredo

1. Instabilidade de microssatélites. 2.Pólipo endometrial. 3. Neoplasia de endométrio 4. Alterações genéticas.5. Patologia endometrial
- I. Orientador II. Universidade. Dep. III. Título

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho às minhas maravilhosas e queridas filhas ANA CAROLINA E JULIANA e ao meu querido esposo CHEN. Vocês são TUDO na minha vida. Vocês são a minha principal motivação.

Meu esposo querido **CHEN**. Não existem palavras no mundo que possam descrever a gratidão que sinto neste momento por tudo o que você fez por mim. Você abriu mão da minha companhia para que eu me dedicasse a este trabalho. Você me ofereceu o seu ombro para chorar quando as coisas não davam certo. Você abriu mão de todas as suas férias, afastamentos e licenças para viajar comigo para os USA, a fim de que eu adquirisse mais conhecimentos e tivesse todo o tempo disponível para a finalização da pesquisa e elaboração do artigo e desta tese de doutorado. Você ficou disponível 24 horas e me deu toda a assessoria na área de informática (já que meus conhecimentos são elementares neste campo). Você discutia comigo questões de genética e medicina, mesmo sem ser da área só para me acalmar até que eu encontrasse as respostas. Você se dedicou com esmero e dedicação às nossas filhas nos momentos em que eu fiquei virtualmente ausente. Você me mandou seguir em frente nas horas mais difíceis em que eu achava que não tinha mais forças para prosseguir. Você fez toda a diferença e, por isto, eu quero lhe agradecer de todo o meu coração.

Dedico este trabalho também aos meus amados pais RAULINDO e ALMIRA, aos meus estimados irmãos ROSANA, ITAMAR e ITIEL e a toda a minha família.

À TODAS AS PACIENTES que consentiram em participar deste estudo, permitindo assim que a ciência avançasse um pouco mais no entendimento do pólipó endometrial uterino.

A TODOS QUE CONTRIBUÍRAM DIRETA E INDIRETAMENTE COM ESTE TRABALHO. Um trabalho desta magnitude seria totalmente impossível se não fosse a colaboração de dezenas ou até centenas de pessoas. Muitas delas injustamente não serão citadas pela exigüidade do papel. Elas desempenharam tarefas aparentemente pequenas, mas que foram gigantes e imprescindíveis dentro desta cadeia de eventos para que este trabalho fosse possível. O meu muitíssimo obrigada a todos vocês que eu citei e que não citei neste trabalho. Reconheço a grandeza do que fizeram e de todo o meu coração gostaria de agradecer.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, POR TUDO.

AO PROF. DR. FLORÊNCIO FIGUEIREDO, por ter me aceito como sua orientanda e ter me proporcionado, assim, o acesso a uma riqueza de conhecimentos que não teria sido possível sem este primeiro passo. Pela sabedoria, pelo estímulo à pesquisa, pela dedicação e amizade que sempre demonstrou em todos os momentos do nosso convívio de orientação tanto do mestrado quanto do doutorado.

À PROFA. DRA. ROSÂNGELA ANDRADE pela dedicação, pelo dinamismo, pela humildade, pela capacidade de administrar pessoas, pela sempre boa vontade e disponibilidade para acompanhar todo o trabalho. Atuou como co-orientadora sem medir esforços. Ficaria difícil concluir este estudo sem a sua inestimável participação. Muito obrigada!

AO PROF. DR. RINALDO W. PEREIRA pelos conhecimentos transmitidos para que a nossa pesquisa fosse possível.

À PROFA. DRA. ANAMÉLIA BOCCA por coordenar o programa de pós-graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília com responsabilidade e brilhantismo.

AO PROF. DR. NATHAN WALL pelo apoio incondicional, por ser um exemplo prático de profissionalismo, inteligência, conhecimento e humanidade. Pela forma calorosa com que me

acolheu em seu grupo de pesquisa em genética da Loma Linda University-CA - USA. Pela inestimável colaboração e pelos ensinamentos.

AO PROF. DR. ELMAR SAKALLA pelas orientações, pela sabedoria e pela dignidade. Obrigada pelos ensinamentos incalculáveis da área de ginecologia e obstetrícia.

AOS DRS WALKER e LUCIANA FELIX, GUSTAVO e SANDRA MACHADO, ROBERT e REJANE ARAGON, por me introduzirem a inúmeros professores e cientistas da Loma Linda University, que direta e indiretamente contribuíram com este trabalho. Pela amizade e suporte, em todo este período em que passei nos Estados Unidos.

À MESTRANDA LARISSA M. CAVALCANTE pela assistência prestada no desenvolvimento técnico de bancada deste trabalho.

À MESTRE ÉRICA CALDAS pelos conhecimentos e colaboração nos trabalhos técnicos da parte laboratorial desta pesquisa.

AOS PROFS. DRS. BAHJRY KALLED e EDUARDO FREITAS pela inestimável assessoria no campo da estatística

AOS DRS. JEAN PIERRE BRASILEIRO, NARAYANA BRASILEIRO, ANTONIO CARLOS RODRIGUES, ZILENE DO CARMO, LEDA DO CARMO, NATÁLIA ZAVATTIERO, VERA COIMBRA E LISANDRA GONÇALVES. Todos contribuíram para que, com esta pesquisa, avançássemos um pouco mais no entendimento do pólipo

endometrial uterino. Este estudo não teria sido possível se não fosse a generosidade destes profissionais.

AO DR. RAFAEL GUERRA pela visão e valorização do conhecimento. Sempre lhe serei grata.

AO DR. SÉRGIO SAMPAIO por entender que o profissional que estuda e se atualiza mais serve melhor aos seus clientes e pacientes.

AOS DRS. LUIS HENRIQUE HARGREAVES E DR JEZREEL AVELINO, pela compreensão durante a fase de pesquisa e elaboração desta tese, contribuindo assim para que este trabalho fosse possível. Não tenho palavras suficientes para agradecer por tudo o que fizeram por mim

AOS DRS. THEODORO OSTROWSKI e GUSTAVO TAKANO pelo suporte e pelo apoio. Muito obrigada por tudo.

À MARIA RITA, CÉLIA CHIANCA, JACKELINE DE ALMEIDA OLIVEIRA, GLEDSON ALESSANDRO R. SILVA, JOSÉ CARLOS, WESLLEY TSUTSUMIDA, ANTONIO DOMINGOS RODRIGUES E FERNANDA AMARAL CARDOSO . Todos vocês contribuíram para que este trabalho fosse possível. Os meus sinceros agradecimentos.

AOS PATOLOGISTAS E FUNCIONÁRIOS DA ANATOMIA PATOLÓGICA DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA. Muito obrigada pelo apoio

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas	xii
Lista de Figuras.....	xiv
Lista de tabelas.....	xv
Resumo.....	xvi
Summary.....	xviii
1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	7
3. Revisão da Literatura.....	8
3.1 Pólipo endometrial.....	8
3.1.1 Diagnóstico histológico e classificação dos pólipos endometriais.....	11
3.1.2 Patogênese do pólipo endometrial.....	12
3.1.3 Potencial de malignização do pólipo endometrial.....	17
3.2 Instabilidade de microssatélites.....	20
4. Métodos	25
4.1 Seleção das pacientes.....	25
4.2 Video-histeroscopia.....	26
4.3 Estudo histológico	28
4.4 Análise genética.....	29
4.4.1 Extração de DNA	29
4.4.2 Desenho dos iniciadores	31
4.4.3 Reação em cadeia de polimerase (PCR) e análise da instabilidade de microssatélites	32
4.5 Análise estatística	34
5. Resultados.....	35

5.1 Resultados dos achados clínicos.....	36
5.2 Resultados dos achados histológicos.....	38
5.3 Resultados do estudo genético.....	42
5.4 Resultados dos achados clínicos e histológicos e a sua associação com a instabilidade de microssatélites	50
6. Discussão	54
7. Conclusões.....	60
8. Bibliografia.....	61
Anexos	

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAT 25- marcador mononucleotídeo de instabilidade de microssatélites

BAT 26- marcador mononucleotídeo de instabilidade de microssatélites

COX 2- cicloxigenase 2

DNA- ácido desoxirribonucléico

D2S123- marcador dinucleotídeo de instabilidade de microssatélites

D5S346- marcador dinucleotídeo de instabilidade de microssatélites

D17S250- marcador dinucleotídeo de instabilidade de microssatélite

hMLH1- gene de reparo do DNA (gene human mut-L homologue 1)

hMLH3- gene de reparo do DNA (gene human mutL homolog 3)

HNPCC- câncer colorretal hereditário não poliposo

hPMS1- gene human postmeiotic segregation 1

hPMS2- gene human postmeiotic segregation 2

HUB- Hospital Universitário de Brasília

IMC- índice de massa corpórea

IMS- instabilidade de microssatélites

μL - microlitro

mL- mililitro

M- molar

mM- milimolar

MMR- Mismatch repair -genes de reparo do DNA

MMP-2- matrixmetalloproteinase 2

MMP-9- matrixmetalloproteinase 9

ng- nanograma

NCI - Nacional Cancer Institute

PCR- reação em cadeia da polimerase

PTEN- Proteína homóloga da tensina e da fosfatase

RER - erros de replicação do DNA

rpm – rotações por minuto

STRs – cadeia curta de repetição

SPSS - Statistical Package for the Social Science

TRH- terapia de reposição hormonal

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Pólipo endometrial uterino

Figura 2. Gráfico de distribuição por idade

Figura 3. IMC das pacientes com pólipo endometrial uterino

Figura 4. Histopatologia dos pólipos endometriais

Figura 5. Associação do número de pólipos com os achados histopatológico

Figura 6. Achados histopatológicos. Pólipo endometrial hiperplásico

Figura 7. A. Pólipo endometrial hiperplásico **7.B.** Pólipo com neoplasia

Figura 8. Eletroferogramas mostrando os alelos obtidos pelo marcador BAT 26 no caso 12(N e P). Visualização de ausência de instabilidade.

Figura 9. Eletroferogramas mostrando os alelos heterozigotos obtidos pelo marcador D2S123 no caso 10 (N e P). Visualização de ausência de instabilidade.

Figura 10. Artefatos de amplificação do tipo “stutter” obtidos pelo marcador D17S250[Mfd15CA], no caso 10 (N e P).

Figura 11. Eletroferogramas mostrando os alelos obtidos pelo marcador D17S250 no caso 10 (N e P). Visualização de ausência de instabilidade.

Figura 12. Eletroferogramas mostrando os alelos obtidos pelo marcador D17S250 no caso 84. Instabilidade de microssatélites.

Figura 13. Eletroferogramas mostrando os alelos obtidos pelo marcador D17S250 no caso 47. Instabilidade de microssatélites.

Figura 14. Eletroferogramas mostrando os alelos obtidos pelo marcador D17S250 no caso 112. Instabilidade de microssatélites.

Figura 15. Eletroferogramas mostrando os alelos obtidos pelo marcador D17S250 no caso 42.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Marcadores recomendados pelo NCI e respectivos cromossomos

Tabela 2. Descrição dos cinco microssatélites recomendados, com seqüência direta e reversa, e marcação com fluoróforos.

Tabela 3. Tamanho dos fragmentos esperados e observados dos 5 marcadores obtidos após a genotipagem.

Tabela 4. Relação entre os parâmetros clínicos e a instabilidade de microssatélites

Tabela 5. Relação entre a instabilidade de microssatélites e os achados histopatológicos

Tabela 6. Características clínicas, histológicas e genéticas de cada paciente que apresentou instabilidade de microssatélites.

Tabela 7. Regressão logística binária multivariada

RESUMO

A instabilidade de microssatélites tem se mostrado importante na patogênese molecular do carcinoma de endométrio. Apesar do pólipos endometrial ter sido implicado com a neoplasia de endométrio, ainda não está claro se a instabilidade de microssatélites desempenha algum papel na gênese do pólipos endometrial uterino. O objetivo deste estudo foi estimar a prevalência da instabilidade de microssatélites no pólipos endometrial e avaliar se existem parâmetros clínicos e histopatológicos que possam estar associados a este tipo de instabilidade. Entre setembro/2008 a abril/2009, pólipos endometriais de 109 pacientes foram coletados. A instabilidade de microssatélites foi pesquisada utilizando-se os marcadores recomendados pelo National Câncer Institute (NCI), a saber BAT25, BAT26, D2S123, D5S346 e o D17S250. Foi realizada análise histopatológica e as informações clínicas foram obtidas dos prontuários das pacientes. Foram detectadas instabilidade de microssatélites em 7 das 109 amostras válidas (6.4%). Destas, 6 foram positivas para instabilidade com o marcador D17S250 e uma com o D5S346. Todas as amostras apresentaram baixa instabilidade. Não houve diferença na instabilidade de microssatélites com relação às seguintes variáveis: idade, índice de massa corpórea, menarca, paridade, abortamento, menopausa e uso de terapia de reposição hormonal. A instabilidade de microssatélites ocorreu mais freqüentemente em pólipos hiperplásicos (3/20;15%) do que em pólipos endometriais comuns (4/86;4.6%) e para pacientes com múltiplos pólipos houve um aumento marginal, porém estatisticamente não significativo na freqüência de instabilidade de microssatélites ($p > 0.07$). Este é o primeiro estudo de instabilidade de microssatélites em pólipos endometrial uterino com uma amostra de 109 pacientes, com material obtido através de histeroscopia. A instabilidade genética foi infreqüente no pólipos endometrial uterino. Apesar desta alteração ter sido mais freqüente em pólipos hiperplásicos sem atipia e em múltiplos pólipos, isto não se demonstrou

estatisticamente significativa. Investigações adicionais e seguimento de longo prazo serão necessários para avaliar os resultados oncológicos destas pacientes.

Palavras Chaves: Instabilidade de microssatélites, pólipos endometrial uterino, neoplasia de endométrio.

SUMMARY

Rios, SR. **Microsatellite instability in endometrial polyps** [Tese]. Brasília: “Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília”; 2010.

The Microsatellite instability (MSI) has been shown to be important in the molecular pathogenesis of endometrial carcinoma. However, although endometrial polyps have been associated with endometrial carcinoma, it is still unclear whether MSI may play a role in endometrial polyp. The objective of this study was to estimate the prevalence of MSI in endometrial polyp and to evaluate whether there are clinical and histopathological parameters that are associated with this kind of instability. Between September/2008 and April/2009, endometrial polyps were collected from 109 patients. MSI was evaluated using the National Cancer Institute-recommended markers BAT25-BAT26-D2S123-D5S346 and D17S250. Histopathological analysis was performed, and clinical information was obtained from patients' records. MSI low was detected in 7/109 validated samples (6.4%). Of these, six were positive for instability at D17S250, while one at D5S346. There were no significant differences between endometrial polyps with and without MSI with regard to age, Body Mass Index, menarche, parity, miscarriage or menopause. However, MSI was more frequent in simple hyperplastic polyps without atypia (3/20; 15%) than in benign polyps (4/86; 4.6%) and, for patients with multiple polyps, had a marginal but statistically insignificant increase in the frequency of MSI ($p < 0.07$). This is the first prospective study of MSI in endometrial polyp in a population of 109 patients with samples obtained by hysteroscopy. MSI was infrequent in endometrial polyps. Although MSI appears to be more frequent in multiple and/or simple hyperplastic polyps without atypia it was not statistically significant. Further investigations and long term follow up are required to evaluate the oncologic outcomes of such patients.

KEY WORDS Microsatellite instability, endometrial polyp, endometrial neoplasia

1. INTRODUÇÃO

O câncer de endométrio é o tumor maligno mais comum do trato genital feminino encontrado em países industrializados ¹. A sua incidência nos Estados Unidos situa-se em 15-20/100.000 mulheres por ano ², com estimativas de que tenham ocorrido 42.160 novos casos com 7.780 mortes em 2009 ³. No Brasil, são esperados anualmente 5.685 casos novos de adenocarcinoma de endométrio, com taxa de 7,6 casos por 100.000 mulheres, variando de 2,0/100.000 na Região Norte a 9,9/100.000 na Região Sudeste⁴. A idade média para o desenvolvimento do carcinoma de endométrio é de 61 anos, sendo que 90% dos casos ocorre após os 50 anos ⁵.

Na etiologia do carcinoma de endométrio, há uma clara interação de fatores ambientais, genéticos e hormonais conforme observado por Creasman et al., 2001⁵. Os fatores de risco hormonais estão relacionados com o estímulo estrogênico contínuo, exógeno ou endógeno sem contraposição da progesterona. Os receptores hormonais estrogênicos alfa (ER α) e beta (ER β) e os receptores da progesterona (PR α e PR β) pertencem à super-família dos receptores nucleares esteróides/tireóide e estão implicados com a patogênese desta neoplasia⁶. É também conhecido que um desequilíbrio entre a expressão destes receptores esteróides é crucial para o desenvolvimento dos tumores endometriais. Adicionalmente, os tumores produtores de estrogênio, tais como aqueles da teca granulosa, a síndrome dos ovários policísticos e o uso do tamoxifeno, elevam os níveis de estradiol e estão associados com baixos níveis de progesterona, e isto se constitui em um mecanismo facilitador para o desenvolvimento deste tipo de neoplasia. Outras situações em que há exposição mais longa da paciente a um ambiente hormonal estrogênico por apresentar um número maior de ciclos menstruais, tais como menarca precoce, menopausa tardia, nuliparidade e

menor número de gestações, também apresentam um incremento no risco ⁷. A terapia de reposição hormonal com estrogênio sem contraposição da progesterona aumenta em 4 a 8 vezes a possibilidade de desenvolvimento desta doença ⁸. Existe uma clara correlação entre a obesidade e a neoplasia endometrial, pois verifica-se que até 70% das pacientes com câncer de endométrio são obesas ⁹. A associação entre a obesidade e o câncer de endométrio é hipotetizada devido ao ambiente mitogênico fornecido pela elevação do estrógeno, que ocorre pela aromatização de androgênio em estrogênio no tecido adiposo, levando a um aumento dos hormônios livres na circulação ¹⁰.

Um percentual dos carcinomas endometriais tem sido atribuído a fatores hereditários ^{11, 12}. Pacientes com familiares com historia de câncer intestinal precisam ser investigadas quanto ao risco de serem portadoras da síndrome de Lynch, a qual aumenta a possibilidade de apresentar neoplasia de endométrio em idade precoce. O risco de desenvolver câncer de endométrio durante a vida é de 32 a 60% em portadoras da síndrome de Lynch quando comparadas a 1% da população em geral ¹²⁻¹⁴. A síndrome de Lynch ou Câncer Colorretal Hereditário Não Poliposo (HNPCC) é uma síndrome autossômica dominante hereditária caracterizada pelo início precoce de carcinoma colorretal, que normalmente está associado a tumores extracolônicos, tais como o adenocarcinoma de endométrio, neoplasia de ovário, estômago, intestino delgado, pélvis renal e ureter ¹⁵. Alguns investigadores postulam que, em pacientes com HNPCC, o carcinoma de endométrio ocorre na mesma freqüência que o carcinoma intestinal e talvez até o preceda ¹⁶. Devido a alta incidência de neoplasia endometrial em pacientes portadoras da síndrome de Lynch, estudos concluíram que estas pacientes deveriam ser submetidas à histerectomia profilática com o objetivo de se reduzir o risco de desenvolvimento neoplásico ¹⁷. Geralmente, pacientes com HNPCC tem mutações das enzimas de reparo MLH1, MSH2 e MSH6 ¹⁸. Já no carcinoma de endométrio, é a

inativação de apenas duas destas proteínas, MSH2 e MSH6, que parece estar diretamente envolvida no desenvolvimento da tumorigênese ¹⁹.

De acordo com Vogelstein et al., 1990²⁰, os tumores malignos colorretais se desenvolvem por meio de uma série de lesões precursoras com atipias celulares e anormalidades arquiteturais, entre elas as displasias, as hiperplasias atípicas e o carcinoma *in situ* ²⁰. Há evidências que dão suporte à premissa de que o modelo de Vogelstein pode ser aplicado ao carcinoma de endométrio, baseando-se nos seguintes princípios:

1. Algumas das alterações genéticas que são encontradas no carcinoma endometrióide também estão presentes nas hiperplasias atípicas das lesões imediatamente precursoras;
2. Há um aumento do número das alterações genéticas que são encontradas no carcinoma bem diferenciado quando comparadas com as hiperplasias atípicas;
3. O número de alterações genéticas tende a aumentar de acordo com as alterações histológicas de alto grau;
4. E, finalmente, um grande número de aberrações cromossômicas são encontradas no carcinoma de endométrio quando comparadas às hiperplasias atípicas ²¹.

As alterações moleculares responsáveis pelo desenvolvimento da neoplasia de endométrio ocorrem de duas diferentes formas: por meio da instabilidade cromossômica e através da instabilidade de microssatélites ²¹. A instabilidade cromossômica é descrita como uma alteração genética maior, com perdas e ganhos de braços do cromossomo ou de todo o cromossomo ²². Isto envolve pequenos passos,

culminando com a aberração que ocorre nas lesões pré-malignas, chegando até as lesões invasivas. A instabilidade de microssatélites é uma das mais frequentes e precoces alterações que ocorrem no carcinoma de endométrio. Ela é caracterizada por mutações em seqüências repetitivas do genoma que não são suficientemente reparadas, devido a inativação de determinadas proteínas intranucleares que formam o sistema de reparos do DNA, levando ao acúmulo de mudanças estruturais de muitos genes ²³.

São conhecidos 2 tipos principais de carcinoma endometrial de acordo com Bokhman., 1983 ²⁴ : O tipo I e o tipo II, que se desenvolvem de forma distinta e mostram diferenciação clínica e histopatológica. O tipo I, corresponde a 70-80% das neoplasias, costuma ser do tipo histológico endometrióide, está associado ao hiperestrogenismo e costuma se desenvolver por meio da hiperplasia atípica de endométrio. Esta doença apresenta freqüente expressão dos receptores de estrógeno e progesterona e ocorre em idade pré e peri-menopausa. As características moleculares desta neoplasia são comparáveis aos tumores colorretais com um acúmulo e progressão das alterações genéticas, tais como: alterações da PTEN, K-Ras, mutações da β -catenina e a instabilidade de microssatélites. As alterações genéticas costumam ocorrer de forma freqüente e precoce, sendo que a instabilidade de microssatélites é encontrada em taxas que variam de 20-40%. Este tipo de patologia costuma estar associada a um bom prognóstico ^{21, 25}. O tipo II ocorre em 20-30% das pacientes ²⁶, normalmente apresenta padrão histológico compatível com o carcinoma seroso e de células claras, ocorrendo preferencialmente em endométrio atrófico. Não costuma apresentar lesões pré-malignas previamente e ocorre mais tardiamente do que o tipo I (entre e 5–10 anos). ²⁷. Este tipo de neoplasia não se associa a disfunções hormonais. Alterações da P53 ocorrem precocemente em quase todo este tipo de patologia, levando a uma massiva

instabilidade cromossômica com rápida progressão tumoral ²⁸. A instabilidade de microssatélites, no entanto, está presente em apenas 0.5% neste tipo de neoplasia ²¹.

O carcinoma endometrial quando reconhecido e tratado no início apresenta uma substancial melhora do prognóstico. Estimativas mostram que a taxa de sobrevida acima de 5 anos pode chegar a 84% quando estas lesões são diagnosticadas precocemente ²⁹. Já está bem estabelecido o potencial de malignização de algumas lesões endometriais tais como as hiperplasias típicas e atípicas do endométrio, bem como do pólipó endometrial uterino. O seguimento de pacientes com hiperplasia endometrial em clássico trabalho de Kurman et al., 1985³⁰, mostrou um potencial de malignização de 1,6% para as pacientes com hiperplasia simples sem atipias, 3% para as pacientes com hiperplasia complexa sem atipias, 8% para as pacientes com hiperplasia atípica simples e 29% para as pacientes com hiperplasia complexa com atipias, durante um longo período de seguimento que variou de 1 a 26.7 anos com uma média 13,4 anos ³⁰. Com relação ao pólipó endometrial, em 1953, Scott já dizia que esta lesão permanece um enigma, porque a sua freqüência, o seu potencial de sangramento, bem como o risco de transformação maligna são sempre motivo de preocupação ³¹. Hoje, cinco décadas após esta declaração, esta entidade nosológica ainda permanece pouco compreendida. Estudos mostram que o pólipó endometrial é uma lesão freqüente, representa um marcador de risco para o adenocarcinoma endometrial e reflete uma tendência deste tecido para desenvolver lesões proliferativas ²⁶. Estas lesões polipóides tem sido associadas com até 1/3 das neoplasias de endométrio em estágio inicial ³². Em estudos histopatológicos, foram verificados focos de adenocarcinoma em pólipos endometriais, bem como focos de lesões polipóides em espécimes de adenocarcinoma endometrial ³³ ³². Apesar da alta prevalência destas lesões, até o momento não existe diagnóstico que facilite ou oriente que tipo de pólipó tem um maior potencial para malignização,

restando apenas o diagnóstico histopatológico que, quando apresenta alteração, já é na fase de atipia celular, o que leva muitas vezes à indicação de histerectomia em nulíparas em idade precoce. A detecção e ressecção dos pólipos endometriais, especialmente em pacientes de risco, aumenta a possibilidade do diagnóstico precoce destas lesões com potencial de malignização.

Diante de inúmeras observações, nota-se que descobertas no campo da biologia molecular tem corroborado com o estudo da etiopatogenia, do diagnóstico e prognóstico das lesões endometriais. Entretanto, apesar da caracterização da instabilidade genômica em inúmeras patologias malignas e pré-malignas do endométrio, os pólipos endometriais ainda não foram devidamente estudados quanto à instabilidade dos microssatélites. O uso destes métodos moleculares poderá ser uma ferramenta adicional no diagnóstico precoce dos pólipos endometriais com potencial de malignização, ajudando assim no melhor seguimento destas pacientes. Desse modo, neste estudo, foram avaliados, pela análise histopatológica e o estudo da instabilidade de microssatélites, 109 pólipos endometriais ressecados por via endoscópica, com a finalidade de contribuir com novos conhecimentos neste campo de investigação.

2. OBJETIVOS

1. Investigar a presença da instabilidade de microssatélites em pólipos endometriais uterinos e correlacioná-la aos respectivos tipos de diferenciação histológica. A possível obtenção de marcadores moleculares poderá auxiliar na clínica prognóstica e diagnóstica destes pólipos.
2. Avaliação de parâmetros clínicos que possam estar relacionados com esta instabilidade de microssatélites

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Pólipo endometrial

Os pólipos endometriais são formações exofíticas nas quais estão presentes o endométrio com seus componentes glandular, estromal e vasos sanguíneos³⁴. Estas lesões são consideradas proliferações focais que formam massas circunscritas com protrusão para a cavidade uterina. São recobertos por única camada de células sujeitas à influência hormonal. A prevalência destes pólipos encontra-se em torno de 24% da população feminina em geral²⁶. Acometem preferencialmente multíparas com aumento da incidência dos 40 aos 49 anos³⁵. O tumor pode ser sésil ou pedunculado e apresenta dimensões variáveis, podendo variar de milimétricos a tamanhos descomunais, sendo os mais comuns entre 2 e 4 centímetros³⁶. Os pólipos endometriais maiores e pedunculados podem se projetar no canal endocervical e apresentar-se como uma grande massa visível ao exame físico²⁶. A cor geralmente é acinzentada, ocasionalmente vermelho ou marrom. Eles podem ser solitários ou múltiplos. É chamada de hiperplasia polipóide a presença de múltiplos e pequenos pólipos na cavidade endometrial³⁷. A sua localização mais freqüente é na região fúndica, seguida da região cornual uterina²⁶.

A maioria dos pólipos costuma ser assintomática, porém, quando apresenta alteração, o sintoma principal é o sangramento uterino anormal de intensidade variável, bem como sangramento na pós-menopausa^{38, 39}. Ocasionalmente, alguns pólipos maiores pedunculados preenchem toda a cavidade endometrial, podendo levar à esterilidade pela obstrução dos óstios tubários^{37, 40}. Eles também tem sido implicados como causa de esterilidade, por impedir fisicamente a implantação do blastocisto ou por

alterar o desenvolvimento da fase secretora do endométrio, tornando-o menos receptivo à implantação embrionária ⁴¹. A obstrução e dilatação do canal cervical pelos pólipos endometriais pode levar à dismenorréia e predispor à endometrite ⁴². O diagnóstico diferencial do pólipo endometrial pode ser feito com as hiperplasias endometriais, com o adenocarcinoma polipóide, com os adenomiomas e também com os adenossarcomas ²⁶.

Os pólipos endometriais podem ser diagnosticados pela ultra-sonografia, que costuma visualizar lesão hiperecólica uniforme e bem-definida. Podem também se apresentar sob a forma de espessamento endometrial inespecífico e heterogêneo, contendo ou não áreas císticas ⁴³. Outros métodos, tais como a histerossonografia, histerossalpingografia e a curetagem uterina, também podem diagnosticá-los. Entretanto, a histeroscopia é a técnica mais utilizada atualmente para o diagnóstico desta lesão, visto que a mesma oferece a possibilidade de visualização direta da cavidade uterina, sem a necessidade de preparo prévio, podendo ainda ser realizada sem analgesia. Além do mais, esta técnica permite definir o tamanho, a localização, a quantidade e o aspecto destas lesões. Uma das maiores vantagens da vídeo-histeroscopia é a possibilidade de se biopsiar diretamente as áreas suspeitas, porque, quando ocorre o surgimento deste tipo de lesão em endométrio atrófico, somente este método pode esclarecer se a alteração encontra-se verdadeiramente em um pólipo ou no endométrio adjacente, se é multifocal e se envolve a base do pólipo. A histeroscopia apresenta ainda, sensibilidade e especificidade maiores que 95%, e é considerada padrão ouro para o diagnóstico do pólipo endometrial uterino ⁴⁴. Apesar de todas estas vantagens, vale ressaltar que este método ainda pode apresentar falhas. Uma das maiores causas de falhas atribuídas à histeroscopia é o diagnóstico equivocado de lesões endometriais,

porque lesões que são reconhecidas como pólipos à histeroscopia, em até 13% das mesmas, não são confirmadas histologicamente ⁴⁵.

O tratamento atual do pólipo endometrial é feito preferencialmente com a ressecção via histeroscopia. Entretanto, existe controvérsia com relação à indicação cirúrgica para retirada dos mesmos. A falta de dados a respeito do potencial de malignização dos pólipos, juntamente com os potenciais riscos, bem como os custos da vídeo-histeroscopia, não permitem concluir se há benefício custo-efetivo na retirada cirúrgica de todo pólipo endometrial diagnosticado ⁴⁴. Especialistas advogam que pólipos com baixo risco para malignização, tais como aqueles de pacientes que não apresentam sangramento uterino anormal, de mulheres que não estão em uso de tamoxifeno e aqueles pólipos que não apresentam características suspeitas à histeroscopia, deveriam ter uma conduta expectante ³⁶. Em concordância a estes autores, pesquisas mostram que o curso natural de pólipos menores que 10 mm é a regressão espontânea, e postulam que seria prudente a observação de pequenos pólipos por alguns meses ao invés de se submeter a paciente a procedimento cirúrgico ⁴⁶. A maioria dos autores, entretanto, acredita que os pólipos devem sim, ser retirados. O principal motivo para indicação da ressecção cirúrgica é para afastar malignidade, porque somente a cirurgia com o estudo histopatológico da lesão pode afirmar que se trata realmente de uma lesão benigna. O segundo motivo para indicação da exérese destas lesões é para o tratamento dos sintomas, especialmente o sangramento irregular e a dismenorréia, que são alterações comuns associadas a este tipo de patologia ^{38,47}.

3.1.1 Diagnóstico histológico e classificação dos pólipos endometriais

Do Ponto de vista histológico de acordo com Mazur et al., 1995⁴², os pólipos apresentam características que facilitam o seu diagnóstico tais como:

1. O tecido apresenta-se como grande fragmento e tem forma polipóide;
2. Estas lesões tendem a ser marcadas tridimensionalmente pela superfície epitelial;
3. Apresentam estroma denso, por vezes fibrosos com grandes artérias, e as glândulas costumam ser irregulares, tortuosas e mais dilatadas do que o normal. As glândulas aparentemente estão fora da fase do ciclo menstrual ou geralmente mostram-se hiperplásicas;
4. Os pólipos normalmente apresentam-se como fragmentos de tecidos que se projetam separadamente do tecido endometrial ⁴².

A classificação dos pólipos endometriais do ponto de vista histológico é difícil, por serem lesões morfológicamente diferenciadas. Para fins de propósitos práticos, os pólipos são classificados como benignos e adenomioma polipóide atípico. Os pólipos benignos podem ainda se apresentar nas seguintes formas morfológicas: Proliferativos/hiperplásicos, atróficos, funcionais, mistos endometrial/endocervical e adenomiomatoso. Os pólipos também podem apresentar lesões focais como hiperplasias, hiperplasias atípicas e carcinoma intra-epitelial ⁴².

De acordo com Mazur et al., 1995,⁴² os pólipos pode ser definidos da seguinte forma:

A. Pólipos Comuns:

Pólipos proliferativos/hiperplásicos. São os mais comuns. Eles geralmente são diagnosticados somente ao exame microscópico, mostram proliferação irregular das glândulas, núcleo pseudoestratificado e atividade mitótica.

Pólipos atróficos. São usualmente encontrados na pós-menopausa. Apresentam glândulas atróficas marcadas por tecido epitelial colunar baixo e mostram atividade mitótica. As glândulas geralmente são dilatadas e císticas e o estroma denso e fibrótico.

Pólipos com padrão funcional. Estes pólipos, assim como o endométrio à sua volta são hormonalmente responsivos e apresentam mudanças proliferativas ou secretórias.

Pólipos mistos endometrial-endocervical. Originam-se no alto da endocérvice e no baixo seguimento uterino e costumam conter tecido endocervical e endometrial.

Pólipo de padrão adenomiosomatoso. Estes pólipos apresentam músculo em seu estroma. Eles geralmente têm padrão proliferativo/hiperplásico ou funcional.

B. Adenomioma polipóide atípico. É um pólipo raro caracterizado por glândulas que são marcadas por epitélio atípico e circundadas por fibras musculares lisas. Ocorre geralmente na pós-menopausa ou perimenopausa em idade por volta dos 40 anos⁴².

3.1.2 Patogênese do pólipo endometrial uterino

A etiologia dos pólipos endometriais não foi ainda claramente estabelecida. Entretanto, os fatores hormonais, bem como os fatores genéticos parecem desempenhar um papel preponderante em sua gênese mais frequente.

A. Alterações hormonais

O estímulo hormonal tanto estrogênico como progestagênico são conhecidos moduladores da proliferação e diferenciação endometrial através dos seus receptores⁴⁸. Isto justifica o fato de que a neoplasia endometrial origina-se da exposição do endométrio à ação do estrógeno. A progesterona protege as células endometriais da hiperestimulação estrogênica, pois diminui o número de receptores para o estrógeno, aumenta o metabolismo intracelular e inibe a conversão da androstenediona em estrona, reduzindo a atividade mitótica das células endometriais^{49, 50}

Classicamente, está descrito que o estímulo estrogênico, tais como aqueles evidenciados em mulheres obesas, em pacientes que fazem uso prolongado de hormônios em terapia de reposição hormonal, e em usuárias de tamoxifeno para tratamento de neoplasia da mama, podem predispor ao desenvolvimento dos pólipos endometriais uterinos^{38, 51-53}. A base hormonal para o desenvolvimento destas lesões é que as mesmas nunca foram descritas antes da menarca⁴⁸. Entretanto, autores acreditam que a hipótese da estimulação estrogênica é paradoxal pois como justificar os pólipos de mulheres na pós-menopausa? Assim, não está claro se os pólipos surgidos durante o menacme compartilham a mesma etiopatogenia daqueles pólipos diagnosticados na pós-menopausa⁵⁴.

Receptores hormonais. Os pólipos endometriais são conhecidos por induzir hiperplasia focal do endométrio com o aumento das expressões dos receptores de estrógeno e progesterona no epitélio glandular polipóide, quando comparado ao epitélio glandular adjacente⁵⁵. Foi postulado que teoricamente os pólipos poderiam surgir de uma super-expressão dos receptores estrogênicos localizadamente ou de uma expressão reduzida dos receptores da progesterona. Ao contrário do que foi previsto, no entanto, foi concluído que os pólipos endometriais talvez resultem de uma diminuição

dos receptores de estrogênio, bem como dos receptores de progesterona nas células estromais do endométrio. Devido à diminuição de todos os receptores, os pólipos seriam insensíveis às mudanças hormonais cíclicas e falhariam em sofrer as alterações normais do endométrio ⁵³. Paradoxalmente, pesquisadores, ao estudar os receptores hormonais no pólipo endometrial em diferentes fases do ciclo menstrual, encontraram que os pólipos costumam apresentar uma diminuição dos receptores apenas de progesterona na fase proliferativa, e um acréscimo dos receptores de estrógeno na fase secretora ⁵⁶. Outros estudos mostraram, que há uma diferenciação entre os receptores das porções estromal e glandular do pólipo. Foi demonstrado que os receptores estrogênicos e da progesterona eram em menor quantidade na porção estromal do que na porção glandular de pólipos de pacientes na pós-menopausa e havia uma correlação entre este diminuto número de receptores e os baixos níveis de estrógeno circulante ⁵⁷.

Obesidade. A obesidade tem sido imputada como um fator de risco independente para o desenvolvimento do pólipo endometrial. Pesquisadores sugerem que a histeroscopia deveria ser recomendada como um exame habitual em pacientes com o IMC maior ou igual a 30, ou seja obesas, porque estudos mostram que a obesidade age como um iniciador na patogênese do pólipo endometrial uterino ⁵⁸. Acredita-se que o fator causal óbvio associado a esta condição seria ocasionado por um ambiente estrogênico ^{38,59}. Entretanto, ao se estudar a obesidade como fator de risco para o desenvolvimento do pólipo endometrial uterino, após estudos com regressão logística usando a idade, obesidade, e níveis de estradiol, encontrou-se que a obesidade é um fator de risco isolado para o desenvolvimento desta lesão ⁵⁸.

Terapia de reposição hormonal. Acredita-se que a terapia de reposição hormonal com ou sem progesterona seja um fator que talvez induza ao crescimento dos pólipos endometriais ⁶⁰. Estudos encontraram pólipos endometriais associados ao uso dos anticoncepcionais hormonais orais em 2.1 % das pacientes, mas a maior frequência destes pólipos foi relatada entre as usuárias de terapia de reposição hormonal (25%) ⁶¹. Postula-se que a terapia de reposição hormonal não somente induza a formação do pólipo endometrial como também leva ao desenvolvimento de hiperplasias nestas lesões. Pesquisadores demonstraram que pacientes fazendo uso de terapia de reposição hormonal apresentavam hiperplasia endometrial nos pólipos duas vezes mais frequente do que as pacientes controles que não faziam uso da TRH ⁶².

Tamoxifeno e o pólipo endometrial. Tamoxifeno é um modulador seletivo para os receptores de estrogênio (SERM) que é frequentemente utilizado para o tratamento do câncer de mama em pacientes com receptores estrógeno-positivo ⁶³. O pólipo endometrial é a patologia mais comum descrita associada ao uso do tamoxifeno na pós-menopausa ⁶⁴. Alguns fatores de risco têm sido implicados com o desenvolvimento destes pólipos em pacientes usuárias de tamoxifeno, tais como ser mais idosa, apresentar história de longa duração da neoplasia da mama, ter aumento do IMC e a apresentar endométrio mais espesso ⁶⁵. Algumas destas mulheres tendem a desenvolver pólipo endometrial recorrente, principalmente se fizeram uso de TRH previamente ⁵¹. Outra característica importante dos pólipos de pacientes usuárias de tamoxifeno é que estas lesões tendem a ser múltiplas e maiores do que naquelas pacientes que não fazem uso deste tipo de medicação ⁶⁶.

B. Alterações genéticas e o pólipo endometrial

Com relação às alterações genéticas, foram demonstradas alterações envolvendo principalmente o cromossomo 6p21, sugerindo que as aberrações cromossômicas teriam um papel na sua gênese mais freqüente. Estas alterações provavelmente envolvem genes que estão relacionados com o processo proliferativo⁶⁷,⁶⁸. Foram encontradas também 3 anormalidades citogenéticas maiores que estão associadas a esta patologia, a saber: rearranjo na região 6p21-22, rearranjo da região 12q13-15 e rearranjo na região 7q22 destes cromossomos⁶⁹.

A apoptose desempenha um importante papel no pólipo endometrial uterino, apresentando alteração dependente da fase do ciclo. As proteínas de proliferação Ki-67 e de apoptose, Bcl-2 e P-53 mutante foram detectadas mais freqüentemente durante a fase proliferativa do ciclo menstrual do que durante a fase luteínica nos pólipos endometriais uterinos⁷⁰. Elevados níveis de Bcl-2, um inibidor de apoptose, foi encontrado no pólipo endometrial, dando suporte à teoria da falta de apoptose. Os pólipos de mulheres na pré e pós menopausa, apesar de expressarem diferentes quantidade de receptores hormonais (E e P), ambos mantêm os mecanismos reguladores para as taxas de proliferação celular (Ki-67), entretanto, parecem ter perdido o controle usual para os receptores hormonais reguladores da apoptose (expressão da Bcl). Isto leva a crer que os pólipos endometriais se desenvolvem não de um aumento da proliferação celular, mas sim de um decréscimo da morte celular através da apoptose^{56,71}.

Os pólipos também costumam expressar Cox-2 (cicloxigenase-2), MMP-2 e MMP-9 (Matriz metaloproteinase 2 e 9). Estas enzimas habitualmente são influenciadas pelos níveis de estrógeno e estão envolvidas com o processo de

proliferação celular e angiogênese^{72, 73 54}. Sabe-se, entretanto, que não apenas estas alterações ocorrem no pólipo endometrial, como também podem ocorrer alterações da PTEN (Proteína homóloga da tensina e da fosfatase) A PTEN é um gene supressor de tumor, que resulta na proteína citoplasmática de mesmo nome, e possui a capacidade de modular a apoptose e o ciclo celular, bem como de inibir a migração celular. A mutação do gene de supressão tumoral PTEN é a mais freqüente alteração associada ao adenocarcinoma de endométrio. Estudos mostram que a perda da função da PTEN por mutação é um evento precoce na tumorigênese endometrial que talvez ocorra em resposta aos fatores de risco hormonais⁷⁴. Em pólipos com hiperplasia complexa, foi encontrada perda da PTEN, sugerindo que a perda de expressão da PTEN pode orientar lesões que precisam ser melhor controladas². Em pacientes usuárias de tamoxifeno a transformação maligna dos pólipos, deve-se na maioria das vezes à mutação do códon 12 do K-ras. K-ras é um gene que codifica proteína de sinalização intracelular com conseqüente proliferação celular exacerbada. Estas mutações neste grupo de pacientes têm sido muito elevadas, chegando a 64%⁷⁵.

3.1.3 Potencial de malignização dos pólipos endometriais uterinos.

A literatura descreve fatores clínicos que são classicamente associados ao aumento do risco para o desenvolvimento da neoplasia de endométrio relacionada ao pólipo endometrial uterino. São eles: a idade avançada, o status pós-menopausal, a hipertensão e a obesidade⁷⁶. Em estudo conduzido em São Paulo, mulheres com idade acima de 60 anos portadoras de pólipo endometrial, apresentaram uma maior incidência de malignidade e de lesões pré-malignas, quando comparadas aos controles de idade mais jovem⁷⁷. Outra pesquisa encontrou 13% de malignidade em uma série de pólipos

endometriais e foi concluído que estes achados eram significativamente associados com idade maior que 65 anos³³. O status menopausal também tem sido considerado um fator importante de risco para malignização do pólipo, independente da idade⁷⁶. A associação da hipertensão arterial aos pólipos tem sido amplamente estudada e é considerada entidade nosológica que aumenta o potencial de malignização destas lesões⁷⁸. Em estudo conduzido na Itália sobre hipertensão e o risco de malignização dos pólipos endometriais ficou constatada que a hipertensão era a característica mais significativa de risco para malignização dos pólipos endometriais.^{44,76}

As alterações endócrinas e genéticas poderiam facilitar a transformação neoplásica e ser um passo dentre outros múltiplos estágios necessários para facilitar a oncogênese endometrial². Estrogênio e progesterona agem reciprocamente no tecido endometrial responsivo para incrementar o risco de neoplasia. A progesterona tem a habilidade de se opor biologicamente aos efeitos do estrogênio através dos seus receptores. Mulheres expostas ao estrogênio sem os efeitos opostos da progesterona mostram uma resposta dose duração dependente, com um aumento de 2 a 10 vezes para o risco do desenvolvimento de neoplasia endometrial^{10,25}.

Observações sugerem que os pólipos endometriais, assim como as hiperplasias atípicas endometriais, são monoclonais, portanto, neoplásicas, em contraste com o endométrio normal, que é policlonal⁷⁹. A diversidade morfológica dos pólipos endometriais mostra que os mesmos costumam seguir uma seqüência evolutiva, progredindo de pólipos atróficos a hiperplásicos, chegando finalmente a pólipos carcinomatosos. Entretanto, opiniões diferem se o pólipo endometrial é um marcador intrínseco para concorrente ou subsequente malignização³³. Estudos sugerem que estas lesões talvez representem um estágio intermediário entre as hiperplasias e a malignização endometrial⁸⁰.

Os pólipos podem ser um fator de risco para o carcinoma de endométrio, devido à sua associação com as lesões hiperplásicas e neoplásicas. Esta associação das hiperplasias e dos carcinomas ligados aos pólipos endometriais no entanto, diverge amplamente nas diversas séries publicadas. O risco de transformação maligna está ligado diretamente à idade da paciente. Quanto maior a idade, maior é o risco³³. Para as hiperplasias associadas aos pólipos, os estudos mostram uma frequência média de 3,6% a 28,8%^{33,81}. Já para o carcinoma, foi encontrada uma incidência média de 0,8 a 13%, podendo chegar a 32%, em estudos feitos com pacientes acima de 65 anos. Adicionalmente, em úteros com o diagnóstico de carcinoma endometrial, foram detectados pólipos associados a esta neoplasia em até 32 % dos casos^{32, 33, 44}. Já está bem estabelecido que o carcinoma endometrial do tipo seroso é apto para crescer e se desenvolver no pólipo endometrial, pois pesquisadores encontraram que 88% destas lesões carcinomatosas cresceram dentro de pólipos endometriais^{82-84, 85}.

O diagnóstico histopatológico e a confirmação do surgimento de uma neoplasia associada ao pólipo endometrial necessitam preencher alguns critérios. Primeiro, faz-se necessário que o pólipo seja retirado por completo e não somente partes ou fragmentos. A indicação de toda a retirada se faz necessária, porque somente pode ser considerada como neoplasia originada em um pólipo aquela que esteja efetivamente localizada nesta lesão. Além deste critério, a base do pólipo, bem como o endométrio adjacente, devem ser considerados benignos³⁴.

3.2 Instabilidade de microssatélites

Estudos recentes têm mostrado o papel da análise genômica em várias neoplasias, principalmente endometrial e intestinal, e sua correlação com o diagnóstico e prognóstico destas lesões. Dentre estes estudos, destacam-se a instabilidade de microssatélites (IMS), que tem sido correlacionada com o câncer endometrial uterino, genético e esporádico e tem também grande importância prognóstica nestas lesões^{86, 87}. Os microssatélites são definidos como curtas seqüências de 1-6 bases, repetidas em “tandem”, ou série que freqüentemente mostram polimorfismo multialélico e têm sido extensivamente usados como marcadores genéticos⁸⁸. A IMS foi primeiramente associada à síndrome de Lynch em 1993^{89, 90}. A natureza polimórfica dos microssatélites é devido às altas taxas de mutações causadas por erro da DNA polimerase e isso pode originar variantes aumentando ou diminuindo o número de repetições internas, isto é, podendo causar instabilidade. Este tipo de alteração depende de numerosos parâmetros incluindo o número de repetições, conteúdo da seqüência, localização cromossômica e capacidade do reparo de pareamento das células⁹¹. Existem vários mecanismos que envolvem os genes de reparos, tais como erros de pareamento, erros de excisão do tipo nuclear e erros por excisão das bases⁹². São chamadas de mononucleotídeos se a mesma base se repete, como por exemplo repetições de poliadeninas; dinucleotídeos são as repetições de duas bases por exemplo citosina-adenina 9C-A e assim sucessivamente até o agrupamento de 6 bases⁹³. Embora os microssatélites sejam normalmente encontrados nas regiões não codificadoras do DNA, eles também podem ser associados a mudanças estruturais em áreas codificadoras de muitos genes^{94, 23}. Habitualmente, há uma significativa variação individual no número de repetições contidas nos microssatélites. Entretanto, essa quantidade mantém-se

estável em todas as células e são transmitidas de uma geração para outra. Assim, elas são únicas para cada indivíduo, e idênticas nas células de diferentes tecidos de uma mesma pessoa, sejam elas germinativas ou somáticas⁹⁵.

A função dos microssatélites no genoma não está clara. Embora o DNA repetitivo já tenha sido conhecido como “junk DNA”, acredita-se atualmente que ele desenvolva funções especialmente associadas com a regulação da expressão gênica. São conhecidas seqüências de microssatélites e minissatélites (longas seqüências repetidas em “tandem” entre 20 e 50 vezes, contendo unidade de até 100 pares de bases) que podem afetar a regulação gênica através de transcrição ou alterando a cromatina e a conformação do DNA^{96,97}. Por serem encontrados em todos os cromossomos, eles têm tido ampla utilização tais como: no mapeamento do genoma humano, em estudos forenses, em populações genéticas, no manuseio de recursos biológicos e para segregar alelos em estudos sobre herança de doenças^{95,98}.

Já está bem estabelecido que a IMS ocorre devido à inativação de proteínas intranucleares que compreendem o sistema de reparo do DNA (MMR). Este sistema inclui as proteínas hMLH1, hMLH3, hMSH2, hMSH3, hMSH6, hPMS1 e hPMS2, responsáveis pela identificação e excisão de erros durante a replicação⁹⁰. As proteínas MLH1, MSH2 e MSH6 são as mais freqüentemente alteradas, por promoverem metilação e mutação^{99, 100}. A metilação do DNA consiste em uma modificação covalente da atividade de uma família de enzimas chamadas DNA metiltransferase (DNMT) que catalisa a transferência do grupo metil da S-adenosilmetionina (SAM) para um resíduo de citosina que antecede uma guanina-dinucleotídeo¹⁰¹. A hipermetilação do gene de reparo hMLH1, ocorre em estágios iniciais da progressão tumoral e o seu silenciamento resulta em instabilidade de microssatélites¹⁰²

Quando há um defeito no sistema que zela pelo mecanismo de replicação do DNA, (como resultado do deslizamento da DNA polimerase durante a síntese), ocorre instabilidade de microssatélites. Este é um fenômeno comum e, em células normais, pode ser corrigido ¹⁰³. Todavia, em células com alterações, isto é, como resultado de mutações ou hipermetilações de um ou mais genes do sistema de reparo MMR, estas expansões e deleções não são reparadas. Estes defeitos são manifestos por bandas extras e aberrantes dentro de múltiplos marcadores de microssatélites. Tal fenômeno é particularmente evidente em certas neoplasias, tais como nos tumores colorretais, provenientes de mutações herdadas dos genes do reparo, causados por erros da DNA polimerase (slippage) da ordem de 5-10 por locus DNA ^{104, 105}. Esta alteração também ocorre freqüentemente em neoplasias endometriais, como resultado da inativação da MLH1 através da promoção da hipermetilação ¹⁰⁶. Portanto, a IMS é considerada um marcador de defeitos dos genes MMR, que são sinalizadores moleculares para alterações nos genes de reparo do DNA.

A instabilidade genômica apresenta duas vias aparentemente distintas na origem de tumores. A primeira via e mais comum é caracterizada pela inativação em sequência de genes de supressão tumoral. Os tumores gerados através desta via usualmente costumam apresentar instabilidade cromossômica com freqüentes anormalidades citogenéticas e perdas de alelos¹⁰⁷. As mutações em oncogenes normalmente são eventos isolados e dominantes, enquanto a inativação de genes de supressão tumoral costumeiramente dependem da perda funcional de ambas as cópias dos genes relevantes. A primeira das duas perdas ocorre mais freqüentemente por mutação. A segunda perda é um evento cromossômico, geralmente uma deleção. A segunda via é característica de tumores em pacientes com câncer colorretal hereditário não poliposo ou síndrome de Lynch¹⁰⁸.

Os critérios para definição e o diagnóstico da IMS foram determinados em uma conferência internacional sobre instabilidade de microssatélites e patrocinada pelo National Cancer Institute (NCI) em 1998. Dentre várias conclusões ficou estabelecido que: a forma de instabilidade genômica associada aos erros de reparo do DNA deveria ser chamada de instabilidade de microssatélites. Um painel de 5 marcadores microssatélites foi validado e recomendado para ser usado em futuras pesquisas da área.

Tabela 1- Marcadores recomendados pelo NCI e respectivos cromossomos

Marcador	Cromossomo
BAT 25	1p13.1
BAT 26	2p
D2S123	2p16
D5S346	5q21/22
D17S250	17q11-q12

A IMS poderá ser obtida de tumores obtidos “in natura” e também através de espécimes dissecadas e fixadas para estudo histopatológico.⁹³ Estas alterações podem ser detectadas pela reação em cadeia de polimerase (PCR) e visualizadas por diferentes técnicas¹⁰⁹.

Apesar do pólipó endometrial ser muito freqüente e estar associado ao carcinoma de endométrio, ainda não está claro se a instabilidade de microssatélites desempenha um papel na gênese desta doença, devido ao baixo número de estudos publicados, todos com pequena quantidade de amostras. Até o momento, ainda não existe nenhum estudo molecular prospectivo com amostras de lesões polipóides obtidas através da histeroscopia para estudo da IMS. Apesar da instabilidade de microssatélites

estar associada a processos pré-malignos e malignos de lesões endometriais os pólipos não foram ainda devidamente avaliados quanto a esta instabilidade.

4.MÉTODOS

4.1 Seleção das pacientes

Após a aprovação do estudo pelo comitê de ética em pesquisa médica da Universidade Católica de Brasília registrado sob o número CEP/UCB56/2008, as amostras foram coletadas de pacientes que deram o consentimento informado, aceitando participar do estudo. Foi realizada a análise prospectiva de pólipos endometriais obtidos de 119 pacientes do Hospital Universitário de Brasília e do Instituto Verhum que foram admitidas entre setembro de 2008 a abril de 2009, e que receberam o diagnóstico de pólipos endometrial através de ultrassonografia transvaginal e, subsequentemente, foram submetidas à ressecção histeroscópica. Os fatores avaliados incluíram características clínicas das pacientes, bem como possíveis fatores de risco para malignização dos pólipos tais como: idade, índice de massa corpórea (IMC), menarca, paridade, abortamentos e menopausa (mulheres eram consideradas como em pós-menopausa se reportassem ausência de menstruação por pelo menos 12 meses consecutivos ou se tivessem o diagnóstico de menopausa cirúrgica). Foram, ainda, investigados o uso de terapia de reposição hormonal (TRH) e o número de pólipos. Foram considerados como múltiplos pólipos a presença de 2 ou mais pólipos na cavidade endometrial uterina. Somente pacientes que foram submetidas a exérese cirúrgica do pólipo e obtiveram o resultado histopatológico confirmando que realmente se tratava de uma lesão polipóide e apresentavam o endométrio adjacente com o diagnóstico de endométrio normal, foram incluídas no estudo. Os dados clínicos das pacientes foram obtidos através dos prontuários.

4.2 Vídeo-histeroscopia

Todas as pacientes envolvidas nesta análise receberam as informações sobre este procedimento diagnóstico e terapêutico, bem como os riscos envolvidos no mesmo. Atualmente, a vídeo histeroscopia é considerada o padrão ouro para o diagnóstico dos pólipos endometriais ¹¹⁰. As pacientes foram previamente preparadas para a cirurgia. A ressecção ocorreu sob sedação, na maioria das vezes, exceto quando as condições clínicas não permitiam. Todas foram assistidas por anestesista em centro cirúrgico, monitoradas com oximetria e tinham acesso venoso durante o procedimento. Inicialmente, a paciente foi colocada em posição ginecológica, realizado o toque vaginal e colocado o espéculo de Collins. Foi realizada dilatação do canal cervical até a vela 9 de Hegar. O ressectoscópio foi então preparado com alças de corte ligadas ao bisturi elétrico de corrente monopolar. O pólipo e a mucosa adjacente endometrial foram identificados (Figuras 1A,1B,1C,1D) e removidos utilizando-se um ressectoscópio monopolar (Karl-Storz- Tuttlingen- Alemanha). Estudos mostram que amostras obtidas da base do pólipo e do endométrio adjacente são necessárias para análise acurada do pólipo ⁴⁴. Um pequeno fragmento do tecido polipóide e do endométrio adjacente foram colocados em recipientes separados com a solução de RNA-later - RNA stabilization reagent (Quiagen Inc., Valencia, CA), para análise genética, e outra amostra separado do pólipo e endométrio adjacente foram fixados em formol a 10% e enviado para análise histopatológica.

Visualização de diferentes tipos de pólipos endometriais pela vídeo-histeroscopia

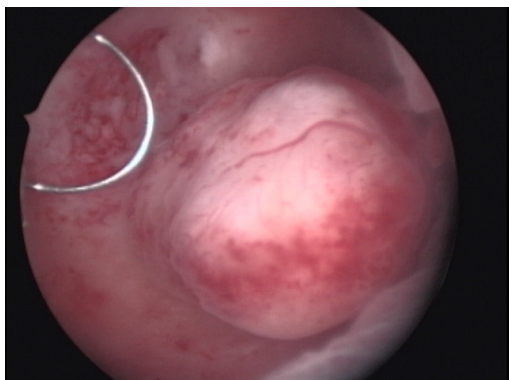


Figura 1. A



Figura 1.B

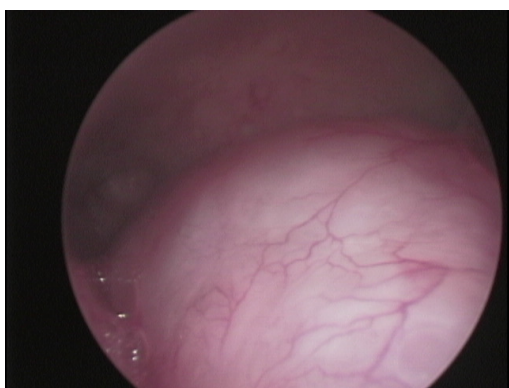


Figura 1.C

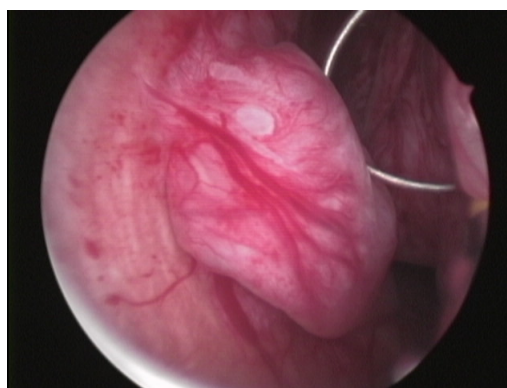


Figura 1.D

Figura 1.

1.A Pólipo pediculado, 1. B Pólipo de paciente pós-menopausa, 1.C Pólipo séssil e 1.D Pólipo vascularizado. As lesões são visualizadas após a passagem do ressectoscópio monopolar óptica de 5mm a 30° (Karl-Storz- Tuttlingen-Alemanha).

4.3 Estudo histológico

A análise histopatológica foi realizada e revisada por patologistas da divisão de patologia do Hospital Universitário de Brasília. Ao chegar ao Laboratório, a peça cirúrgica foi identificada, analisada, descrita e fotografada. A peça foi então clivada e, após este procedimento, o material foi processado tecnicamente, incluído em parafina e corado com hematoxilina-eosina. A lâmina foi coberta com lamínula de vidro, observada ao microscópio e ao final elaborado o laudo histopatológico.

O diagnóstico das lesões endometriais foi descrito da seguinte forma: Os pólipos foram considerados como benignos (pólipos endometriais, pólipos com hiperplasia simples sem atipia, pólipos com hiperplasia complexa sem atipia,) ou pré-malignos/malignos (pólipos com hiperplasia simples e atipia, pólipos com hiperplasia complexa com atipia e carcinoma invasor de endométrio) ¹¹¹. As definições histopatológicas foram baseadas nos seguintes critérios: foi definida como hiperplasia simples sem atípias as lesões em que a arquitetura endometrial se mostrava moderadamente distorcida cheia de glândulas com dilatação cística; foi definida como hiperplasia complexa sem atípias lesões em que o epitélio se apresentava cheio de ramificações glandulares complexas e ativa estratificação mitótica com células de forma tubular; foi definida como hiperplasia atípica simples quando as alterações eram similares as da hiperplasia simples sem atípias, porém com glândulas mais irregulares e marcadas por células atípicas; foi definida como hiperplasia complexa com atípias quando as lesões eram caracterizadas por um aumento na complexidade glandular e atípias citológicas; o carcinoma endometrial foi caracterizado como uma lesão que se

apresentava cheia de glândulas tubulares malignas variando em tamanho, invadindo o estroma, mostrando importantes atipias e atividade mitótica ²⁶.

4.4 Análise genética

4.4.1 Extração de DNA

O DNA do tecido normal e do pólipó foi extraído e purificado usando-se o kit padrão Invisorb Spin Micro DNA kit- Invitex (Berlin, Germany).

Inicialmente, incubou-se a quantidade necessária a ser utilizada de tampão de eluição D a 56°C. A amostra de tecido fresco (máx. 5mg) foi colocada em um tubo eppendorff de 1,5 mL e macerou-se até completa lise do fragmento de tecido. Subseqüentemente, adicionou-se 100 µL de tampão de lise M e 10 µL de Proteinase K* à amostra, misturando em vórtex por 10 segundos. Após esse passo, incubou-se o tubo com a reação por 30 min a 56°C sobre contínua agitação (800 rpm). Feito isso, a amostra foi centrifugada por 2 minutos na velocidade máxima e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo eppendorff de 1,5 mL.

Em seguida, adicionou-se 100 µL de tampão de ligação B6 e procedeu-se misturando a amostra por movimentos de pipetagem. Foi colocada uma coluna Spin (Spin Filter) em um tubo eppendorff de 2 ml e pipetou-se o material lisado na membrana da coluna. Periodicamente, o tubo foi centrifugado por 1 min a 13,000xg. Foi adicionado 300 µL de tampão de lavagem I à membrana da coluna Spin e centrifugou-se novamente por 30 segundos a 13,000xg. O tubo eppendorff foi descartado, passando

* Proteinase K – armazenamento (2 a 8°C), outros componentes do kit (18 a 25°C). Foi adicionada H₂O à proteinase K (a quantidade de água depende do número de extrações), e armazenou-se a - 20°C.

a coluna Spin para um novo tubo de 2 ml. Em seguida, adicionou-se 750 µl de tampão de lavagem II e centrifugou-se por 30 segundos a 13,000xg. O tubo eppendorff foi novamente descartado, e a coluna Spin foi passada para outro tubo eppendorff de 2 ml. Centrifugou-se por 2 min a 13,000xg para eliminar completamente o etanol residual. Assim, colocou-se a coluna Spin em um novo tubo eppendorff de 1,5 ml e adicionou-se 200 µL do tampão de eluição D a 56°C (previamente aquecido no banho) à membrana da coluna Spin. Em seguida, o eppendorff foi incubado à temperatura ambiente por 1 min, sendo logo após centrifugado a 6,000xg por 1 min. Por fim, a coluna Spin foi descartada e a amostra extraída foi devidamente identificada e armazenada a -20°C.

Quantificação do DNA em Gel de Agarose a 1%

Os DNAs foram quantificados em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo (10mg/mL). Para preparação do gel, colocou-se 0,3g de agarose (Gibco BRL ®) e 30ml de trisborato EDTA (TBE 1X) em um erlenmeyer. O gel foi levado ao microondas (30seg), e, após ser esfriado em água corrente, adicionou-se 4 µL de brometo de etídeo (10mg/mL). Em seguida, colocou-se o gel na cama para solidificar juntamente com os dois pentes de 14 poços. Os DNAs foram quantificados aplicando-se 5µL de DNA de cada amostra e 4µL de tampão de carregamento. Foi utilizado como padrão de tamanhos de fragmentos o DNA ladder 1Kb plus (Invitrogen). A eletroforese foi realizada com voltagem de 90 e miliamperagem de 50.

Para a análise dos géis e captura das imagens, utilizou-se um transiluminador UV, presente no aparelho Gel Logic 120 Eletrophoresis Documentation and Analysis System (Eastman Kodak, New Haven, CT, USA). Os DNAs foram quantificados segundo o programa Kodak digital science 1D.

Quantificação do DNA no Nanodrop

A fim de se verificar a concentração de DNA, as amostras foram avaliadas no aparelho Spectrophotometer ND – 1000 V3.5.1 – Nanodrop, utilizando-se apenas 1 µL de DNA de cada amostra para quantificação. A partir da concentração observada, as amostras foram diluídas para a concentração de trabalho a 10ng/µL.

4.4.2 Desenho de iniciadores

O desenho dos iniciadores foi feito com base nos critérios do NCI (Instituto Nacional do Câncer), que os indicou como sendo os mais informativos para detecção de instabilidade. As seqüências diretas e reversas de cada iniciador foram retiradas do banco de gene e da base de dados genéticos. Os primers foram marcados com fluorescência para análise em eletroforese capilar (tabela 2). Em todos os primers reversos uma seqüência denominada `PIG-tailing` constituída de 5 nucleotídeos - **TCAGGG** foi adicionada, a fim de evitar a adenilação (adição de A) da região 3`. As seqüências, bem como o tipo de marcação estão evidenciadas na tabela abaixo:

Tabela 2: Descrição dos cinco microssatélites recomendados, com seqüência direta e reversa, e suas respectivas marcações.

Iniciadores	Marcação	Seqüência direta	Seqüência reversa
BAT25	FAM	5'-TCG CCT CCA AGA ATG TAA GT-3'	5'-TCT GCA TTT TAA CTA TGG CTC-3'
BAT26	NED	5'-TGA CTA CTT TTG ACT TCA GCC-3'	5'-AAC CAT TCA ACA TTT TTA ACC C-3'
D2S123	FAM	5'-AAA CAG GAT GCC TGC CTT TA-3'	5'-GGA CTT TCC ACC TAT GGG AC-3'
D5S346	VIC	5'-AGC AGA TAA GAC AGT ATT ACT AGT T-3'	5'-ACT CAC TCT AGT GAT AAA TCG GG-3'
D17S250 [Mfd15CA]	PET	5'-GGA AGA ATC AAA TAG ACA AT-3'	5'-GCT GGC CAT ATA TAT ATT TAA ACC-3'

4.4.3 Reação em cadeia de polimerase e instabilidade de microssatélites

A análise da instabilidade de microssatélites foi realizada utilizando-se os cinco marcadores determinados por consenso do NCI para detecção do câncer colorretal. Estes marcadores incluem os mononucleotídeos BAT 25 e BAT 26, e os dinucleotídeos D2S123, D5S346 e D17S250. A PCR foi realizada com uma solução de 12.5 µl contendo 1.25 µL 10X PCR tampão (Invitrogen), 1.25 µL de albumina sérica de bovino (BSA; 2.5 mg/mL), 0.625 µL (50 mM) MgCl₂, 1.25 µL (25 mM) desoxirribonucleotídeo trifosfato (dNTP), 0.2 µL platinum Taq polymerase (5 U/µL; Invitrogen), 2 µL DNA (10 ng) e 0.5 µL de cada primer (0.4 µM). Os produtos da PCR foram em seguida colocados no termociclador Veriti 96 Well Thermocycler (Applied Biosystems, Foster City CA, USA) para amplificação. As amostras foram desnaturadas a 95°C por 2 minutos, seguido de 20 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 59°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos com extensão final a 72°C por 20 minutos.

Tabela 3: Tamanho dos fragmentos esperados e observados dos 5 marcadores obtidos após a genotipagem.

Marcador	Tamanho do fragmento esperado	Tamanho do fragmento observado	Alelos
BAT25	110-130	123-127	A
BAT26	110-120	118-122	A
D2S123	200-230	202-230	C/A
D5S346	100-130	116-134	G/C
D17S250[Mfd15CA]	140-170	154-169	C/T

Após a PCR, 1 µL do produto foi misturado com 8.85 µL de Hi-Di formamide (Applied Biosystems) e 0.15 µL de GeneScan 500 LIZ Size Standard

(Applied Biosystems). Cada amostra de pólipo e o seu correspondente tecido normal de cada paciente foram analisados para os 5 marcadores em singleplex PCR. Inicialmente um programa foi designado para amplificar todos os loci individualmente e sob as mesmas condições. Os primers foram então combinados com a finalidade de amplificação simultânea. O marcador D17S250 não amplificou sob estas condições. Assim, foi realizada uma reação em multiplex para os outros marcadores e em singleplex para este marcador não amplificado conjuntamente. A solução foi desnaturada a 95°C por 2 minutos e esfriada no gelo antes de ser colocada no sequenciador - DNA ABI PRISM 3130XL Genetic Sequencer (Applied Biosystems). A análise dos resultados obtidos foi realizada utilizando-se o programa 4.0 GeneMapper (Applied Biosystems). Ficou estabelecido que o diagnóstico da IMS seria firmado, quando ocorresse uma mudança de qualquer extensão, deleção ou inserção de unidades repetitivas de bases em um microssatélite do tecido da lesão em comparação com o tecido normal da mesma paciente⁹³. A fim de avaliar os resultados da IMS um painel dos 5 marcadores foi utilizado para classificar os tumores. As lesões foram categorizadas como de alta instabilidade se dois ou mais dos cinco marcadores apresentassem instabilidade. Eram considerados como de baixa instabilidade se apenas um dos marcadores apresentasse IMS e eram considerados estáveis se não houvesse diferença entre os resultados encontrados quando comparados o pólipo com o tecido normal. O tecido normal do endométrio adjacente da própria paciente serviu de controle negativo. A validação do estudo com o controle adequado de DNA do tecido normal (IMS negativo) e do tecido com alterações (IMS-positivo) foi realizada. Os resultados foram todos confirmados em duplicata. Estes resultados foram posteriormente correlacionados aos parâmetros clínicos e histopatológicos.

4.5 Análise estatística

A análise estatística foi realizada na Loma Linda University-CA USA- sob a supervisão do Prof. Dr. Khaled Bahajri. Foram utilizadas frequência, média e desvio padrão. O teste exato de Fisher ¹¹² foi usado para analisar as variáveis quantitativas com respeito à presença ou ausência de instabilidade de microssatélites. Regressão logística binária multivariada foi utilizada para determinar a razão de chances (Odds Ratio) para variáveis independentes associadas. Beta foi usada para indicar a presença de probabilidade de falha ou rejeição das hipóteses testadas, quando a hipótese era falsa ou verdadeira¹⁰⁴. O nível de significância foi estabelecido em $p < 0.05$. A análise estatística foi realizada utilizando-se o Statistical Package for the Social Science para windows versão 17.0 (SPSS Inc, IL, USA). Utilizaram-se ainda os programas Excel e Word para tabelas textos e gráficos.

5. RESULTADOS

Um total de 109 pólipos endometriais foram selecionados para o nosso estudo. A avaliação da instabilidade de microssatélites não foi obtida em 10 amostras devido à dificuldades técnicas relacionadas com o DNA. Foram analisados os achados clínicos tais como a idade e o índice de massa corpórea, bem como o número de pólipos encontrados em cada paciente. Foram ainda avaliados os achados histopatológicos e posteriormente foi feita a correlação destes achados com a instabilidade de microssatélites.

5.1 Resultados dos achados clínicos

A idade das pacientes variou de 28 a 76 anos com uma média de 52 anos (figura 2). O maior percentual de pacientes foi encontrado na faixa etária dos 41 aos 50 anos (43%). De 51 a 60 anos foi a segunda faixa etária mais prevalente com 20% das pacientes.

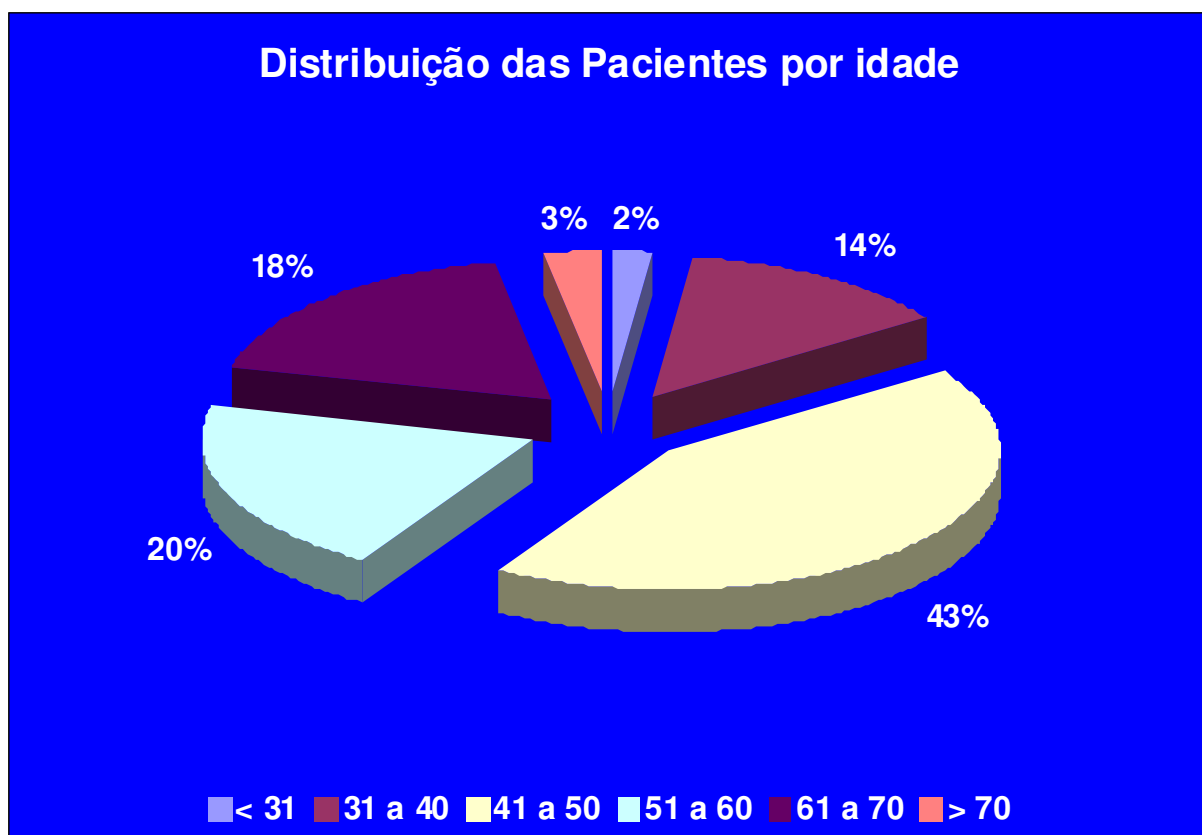


Figura 2. Pacientes e distribuição por idade

Índice de massa corpórea (IMC) das pacientes estudadas (Figura 3). Dentre as participantes, 27,7% estavam com sobrepeso e 21,5% apresentavam-se obesas perfazendo assim 49,2% ou seja; cerca da metade das pacientes deste estudo apresentavam um incremento do peso.

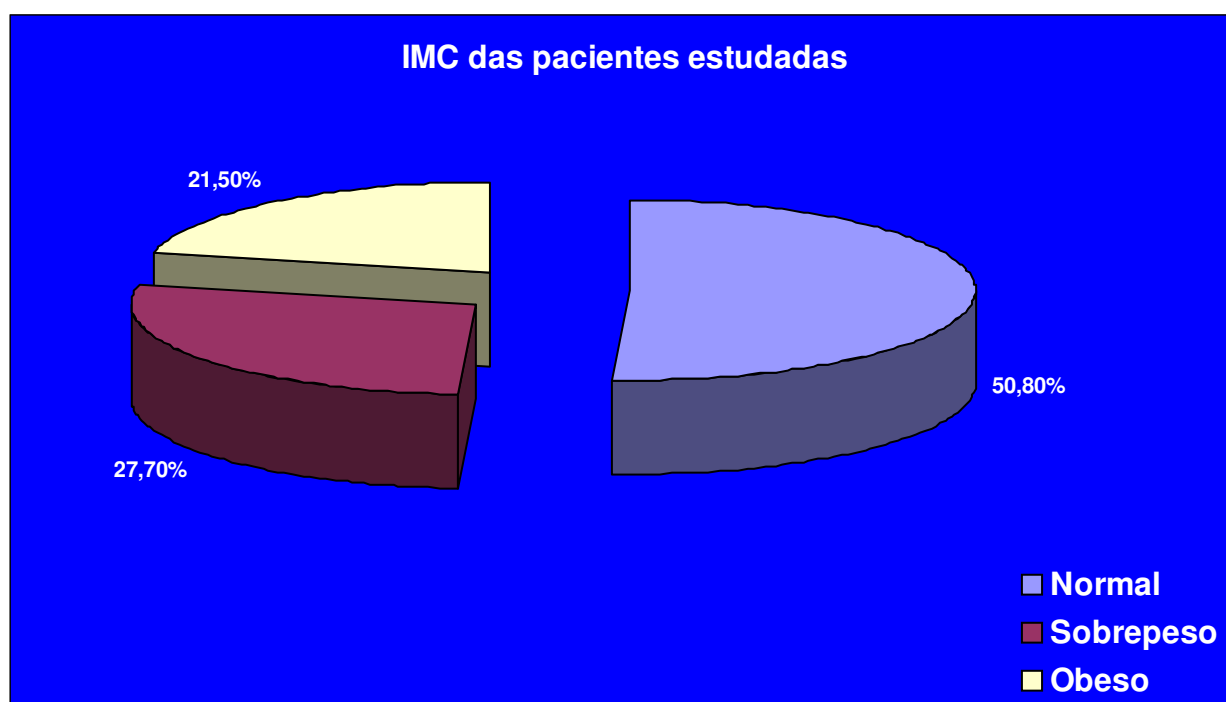


Figura 3. IMC das pacientes com pólipos endometriais uterinos

5.2 Resultados dos achados histológicos

A histopatologia das lesões demonstrou que 86 (79%) das mesmas eram de pólipos endometriais comuns, 20 (18,3%) eram de pólipos com hiperplasia simples sem atipia, havia 1 (0,9%) pólipo endometrial com hiperplasia complexa sem atipia, 1 (0,9%) pólipo endometrial com hiperplasia atípica simples e 1 (0,9%) carcinoma endometrial (figura 4).

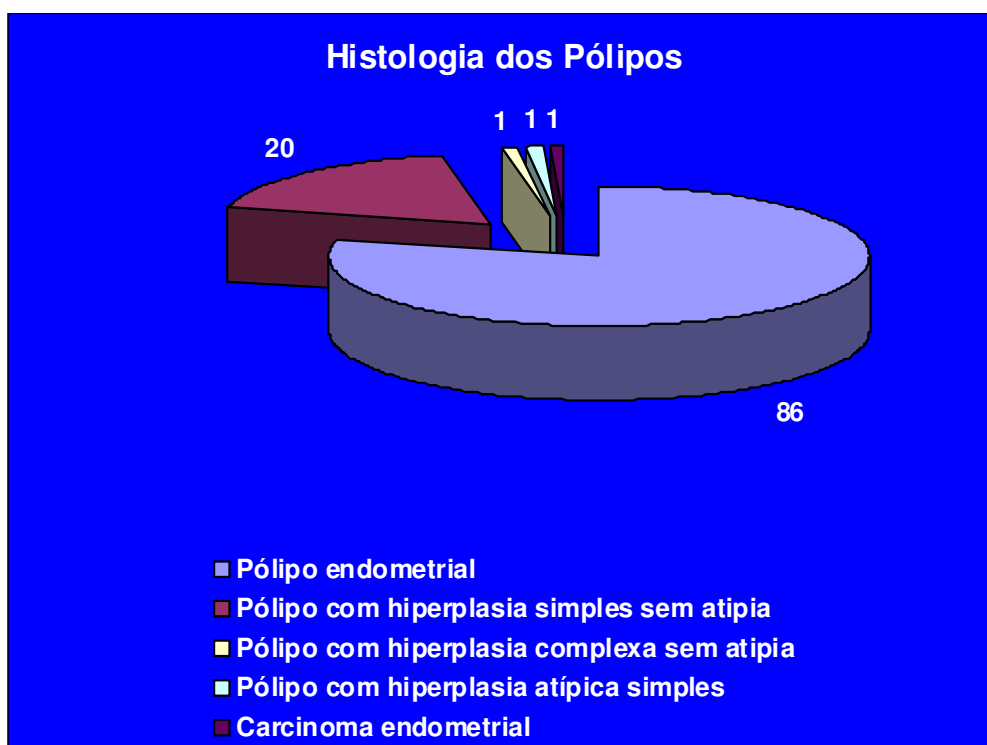


Figura 4. Distribuição dos pólipos endometriais estudados por tipos histológicos.

Para análise do número de pólipos foi encontrado que 28 das pacientes apresentaram múltiplos pólipos versus 81 participantes com pólipos solitários. Ao correlacionar o número de pólipos aos achados histopatológicos foi encontrado que os pólipos endometriais múltiplos se associavam mais frequentemente à hiperplasia simples sem atipia 10/20 (50%), quando comparados àqueles pólipos endometriais comuns sem este tipo de alteração 18/76 (23,6%) (Figura 5).

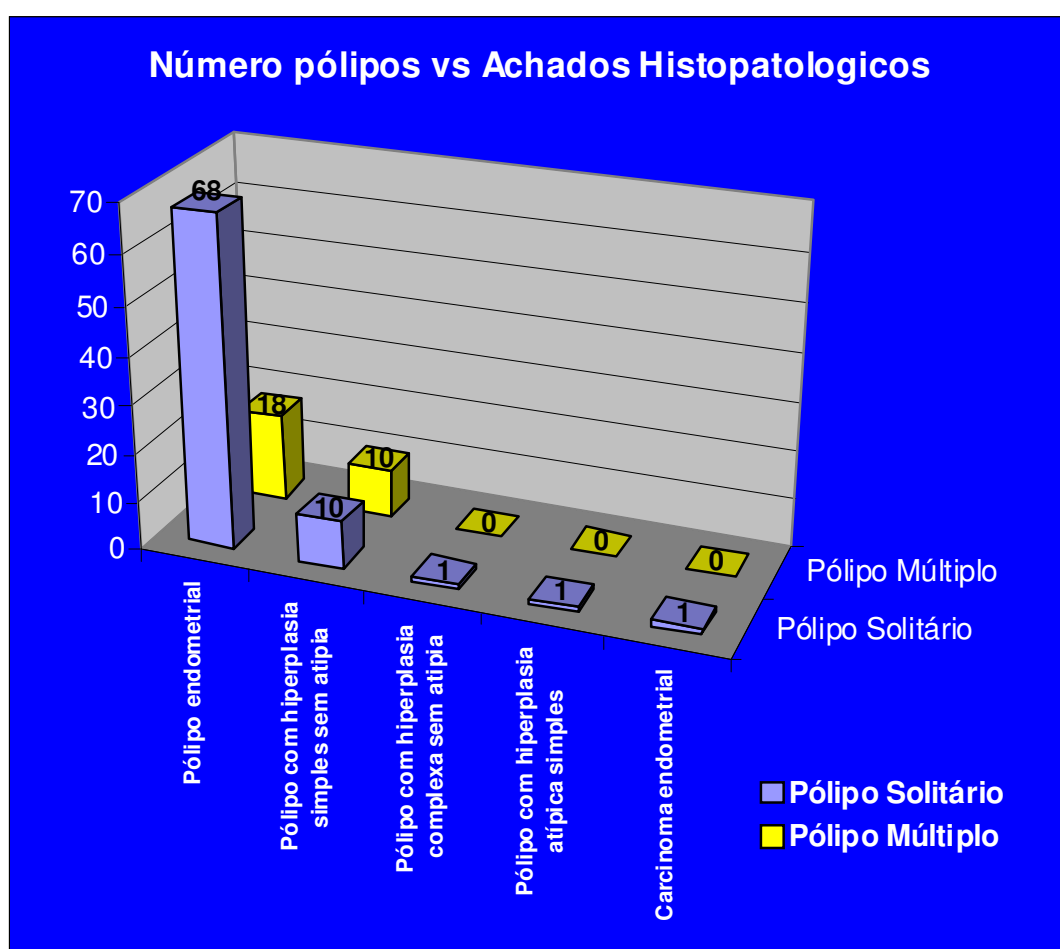


Figura 5. Associação do número de pólipos com os achados histopatológicos

O pólipio endometrial hiperplásico (Figura 6) foi o mais frequentemente encontrado em associação à instabilidade de microssatélites

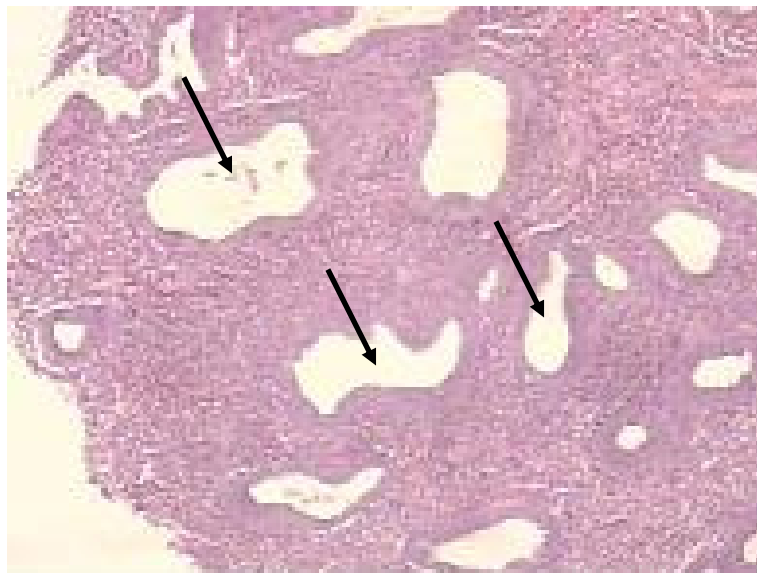


Figura 6. Estudo microscópico de pólipio endometrial hiperplásico. As glândulas neste tipo de lesão apresentam-se irregulares (setas) com núcleo pseudoestratificado e atividade mitótica. (Coloração hematoxilina/eosina aumento 20 vezes).

Nas figuras abaixo notam-se pólipos com diferentes tipos histológicos onde o primeiro (figura 7.A) apresenta hiperplasia simples sem atipia e o segundo (figura 7.B) apresenta um pólipo com carcinoma endometrial. Esta foi a única neoplasia encontrada no estudo. Tratava-se de um tumor do tipo adenocarcinoma endometrióide com grau I de diferenciação.

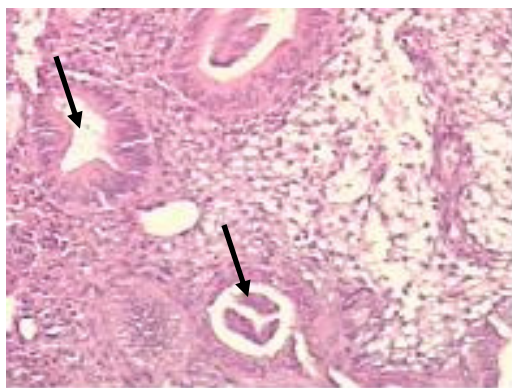


Figura 7.A Pólipo endometrial hiperplásico. Apresenta glândulas irregulares (setas) com núcleo pseudoestratificado. O estroma denso é uma das características do pólipo. (Coloração hematoxilina/eosina aumento 20 vezes)

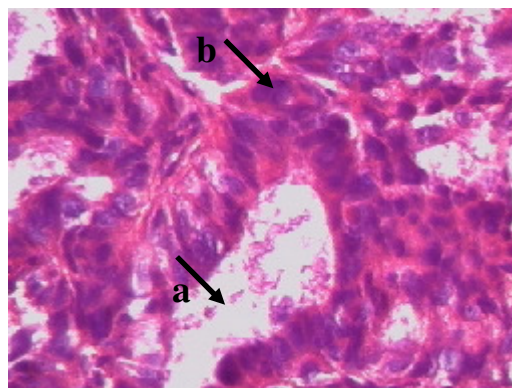


Figura 7.B Pólipo com neoplasia. Proliferação neoplásica, formada por estruturas sólidas e por glândulas irregulares, ramificadas e justapostas (seta a), revestidas por células colunares, com núcleos em vários níveis de estratificação, pleomórficos e atípicos, com cromatina grosseira e figuras de mitose freqüentes (seta b). (Coloração hematoxilina/eosina- aumento 40 vezes)

5.3 Resultados do estudo genético

De um total de 109 pólipos analisados, 7 apresentaram IMS, todos com baixa instabilidade. Houve predomínio do marcador D17S250 (6 casos) e 1 caso com o marcador D5S346. Não foi encontrada instabilidade de microssatélites associada aos mononucleotídeos BAT 25 e BAT 26 (figura 8) nem associada ao dinucleotídeo D2S123 (Figura 9)

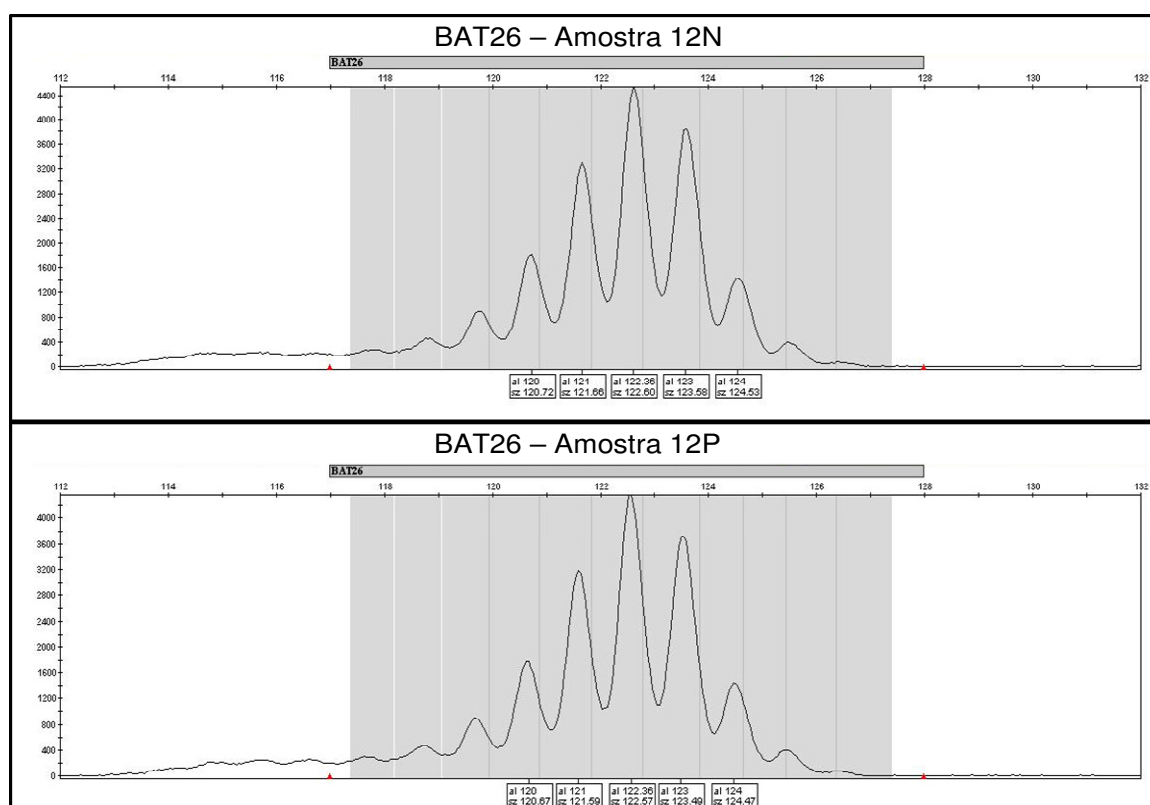


Figura 8. Eletroferogramas mostrando os alelos obtidos pelo marcador BAT 26 da participante de número 12 (N e P). A comparação gráfica dos alelos do tecido normal apresenta-se igual à encontrada no tecido polipóide. O maior alelo mede 122.6 em ambos os tecidos, portanto um caso de ausência de instabilidade de microssatélites.

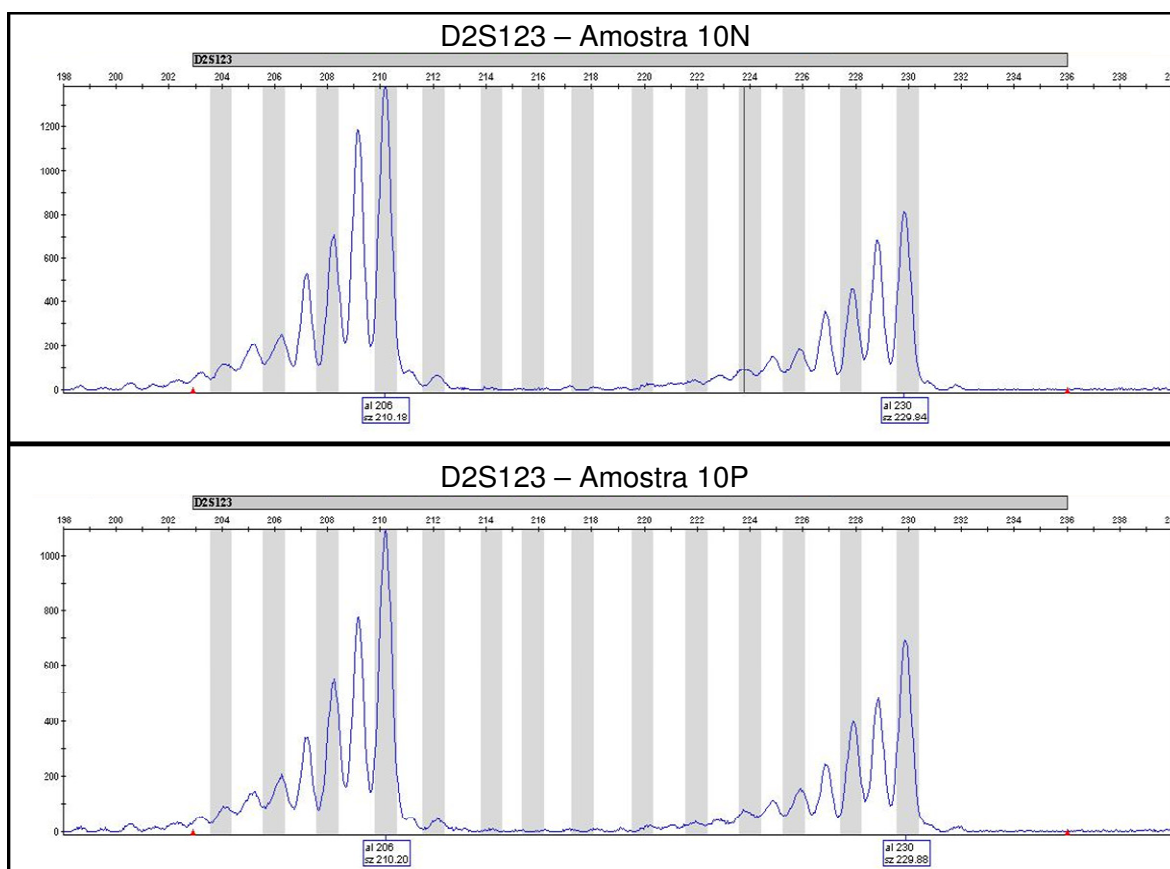


Figura 9. Eletroferogramas mostrando os alelos heterozigotos obtidos pelo marcador D2S123 da participante de número 10 (N e P). Nota-se que os alelos medem respectivamente 210 e 229 respectivamente, não há portanto diferenças entre o tamanho dos alelos das amostras do tecido polipóide quando comparados aos das amostras de tecido normal. Visualização de ausência de instabilidade de microssatélites.

Foram observados picos “stutters” durante a análise. Cada pico verdadeiro costuma estar circundado por este tipo de alteração. Na maioria das vezes os picos que não são reconhecidos como alelos verdadeiros são chamados de alelos fantasmas ou stutters (figura 13). Os “stutters costumam ocorrer mais frequentemente nos dinucleotídeos e são altamente reprodutíveis para um determinado marcador. Stutters são falhas que geram bandas com unidades de repetição a menos do que o alelo original. Eles costumam ocorrer devido a erro de replicação por alteração da enzima taq polimerase, e aumentam de acordo com o número de ciclos da PCR. Eles também ocorrem quando o material biológico está comprometido^{113, 114}

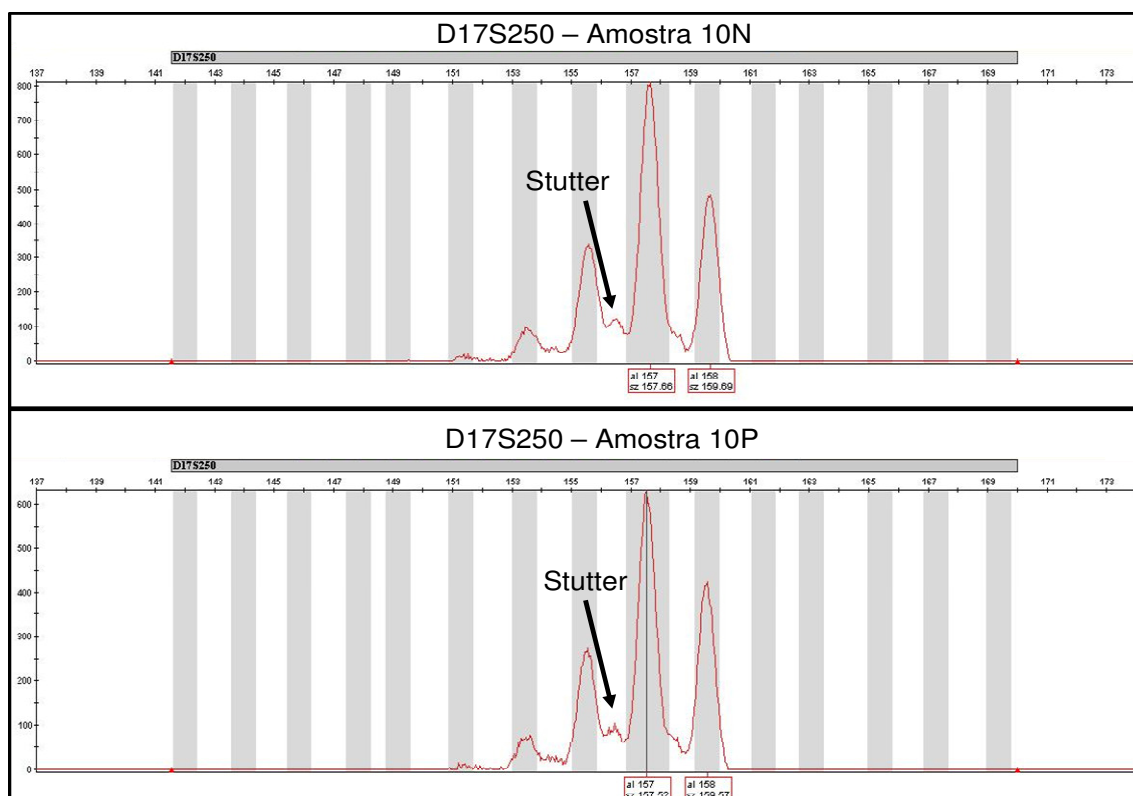


Figura 10. Artefatos de amplificação do tipo “stutter” (setas), obtidos pelo marcador D17S250[Mfd15CA], da participante de número 10 (N e P). Nota-se que os alelos verdadeiros apresentam um tamanho de 157 (maiores) e 159 (menores) respectivamente no tecido normal e no tecido polipóide respectivamente. Os picos menores circundantes são reconhecidos como falsos alelos ou alelos fantasmas.

Dos 7 casos que apresentaram instabilidade de microssatélites 6 foram com o marcador D17S250 (Figuras 11-15)

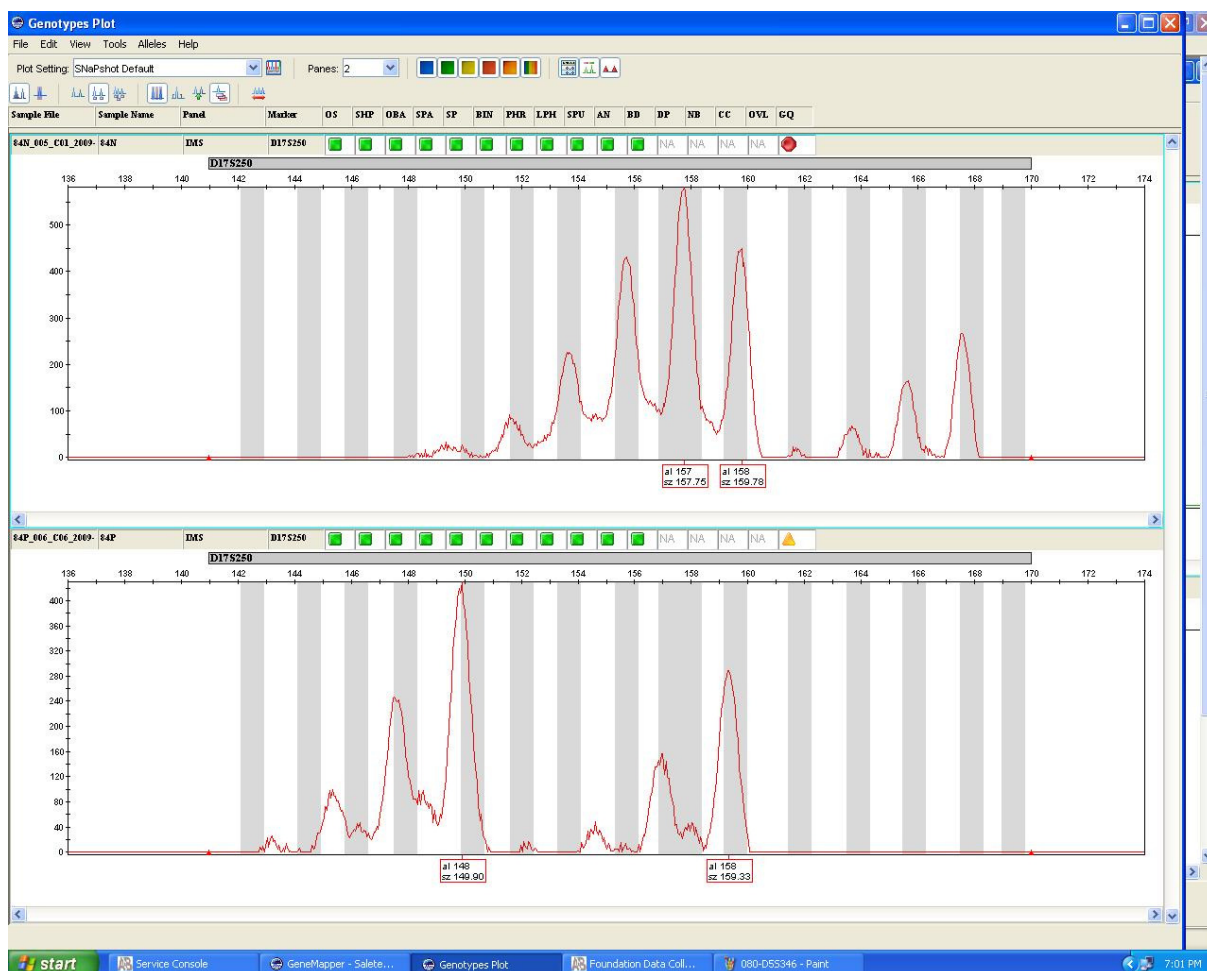


Figura 11. Eletroferogramas mostrando instabilidade de microssatélites da participante de número 84. O pólipo endometrial deste caso mostra alteração da altura e posição dos picos. Há diferenciação do tamanho dos picos dos alelos do tecido normal quando comparados ao tamanho dos alelos do tecido polipóide (157 X 149)

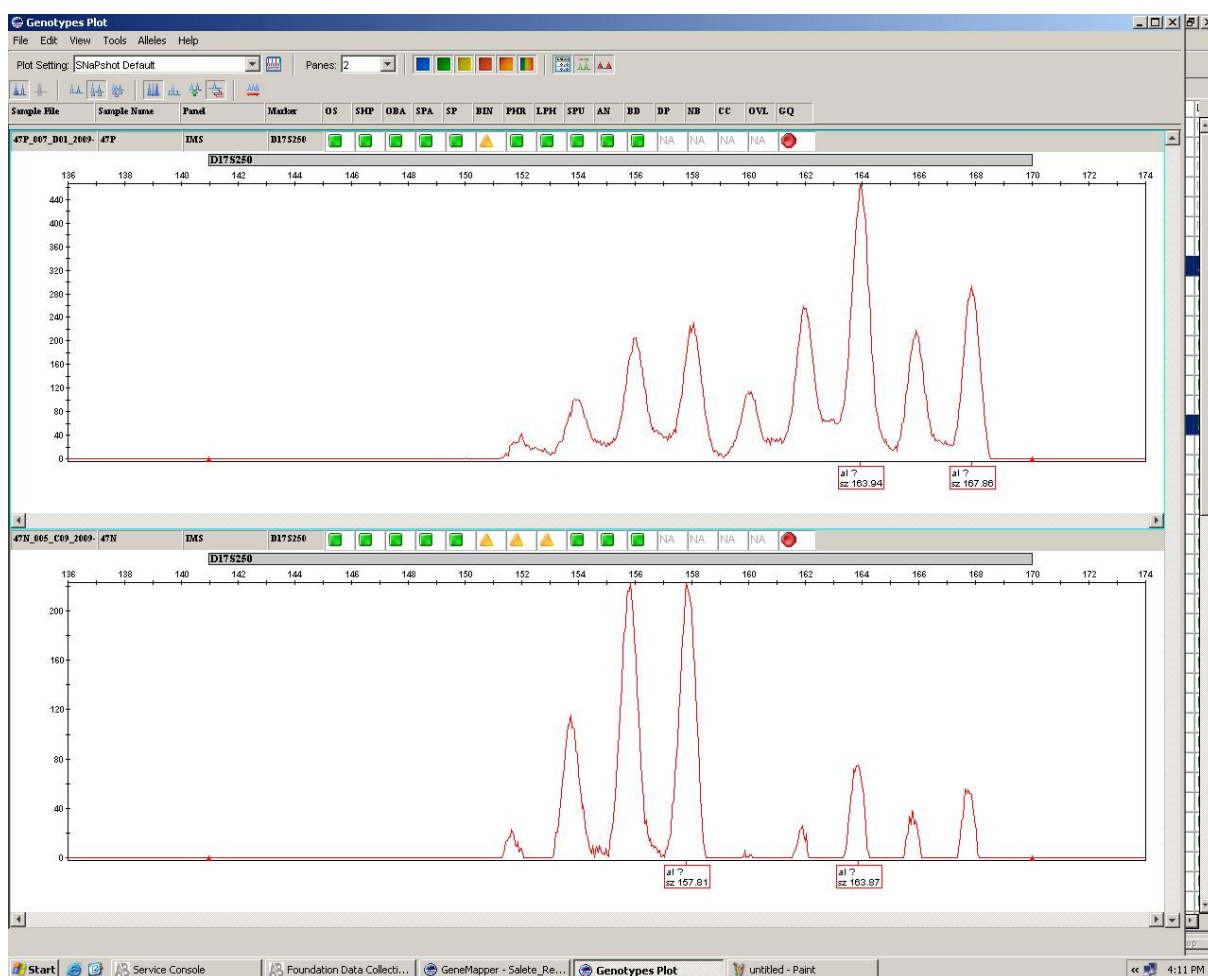


Figura 12. Eletroferogramas mostrando instabilidade de microssatélites da participante de número 47. Há alteração do tamanho e distribuição dos picos ou seja; padrão característico de instabilidade de microssatélites. Além disso os alelos maiores apresentam tamanhos diferenciados quando comparados entre o pólipo e o tecido normal (163x157).



Figura 13. Eletroferogramas da participante de número 69 mostrando uma diferenciação no padrão de tamanho e distribuição dos gráficos do tecido polipóide quando comparados ao tecido normal. Visualiza-se também uma alteração no tamanho dos maiores picos na análise do marcador D17S250.



Figura 14. Participante de número 112. Há uma diferenciação no padrão do tamanho e distribuição dos picos quando comparados o tecido normal e o tecido polipóide. Há também uma pequena diferença entre os tamanhos dos alelos, que não pode ser atribuída a alterações técnicas visto que para os marcadores dinucleotídeos como é o caso, todo desvio no tamanho dos alelos é reconhecido como instabilidade de microssatélites¹¹⁵

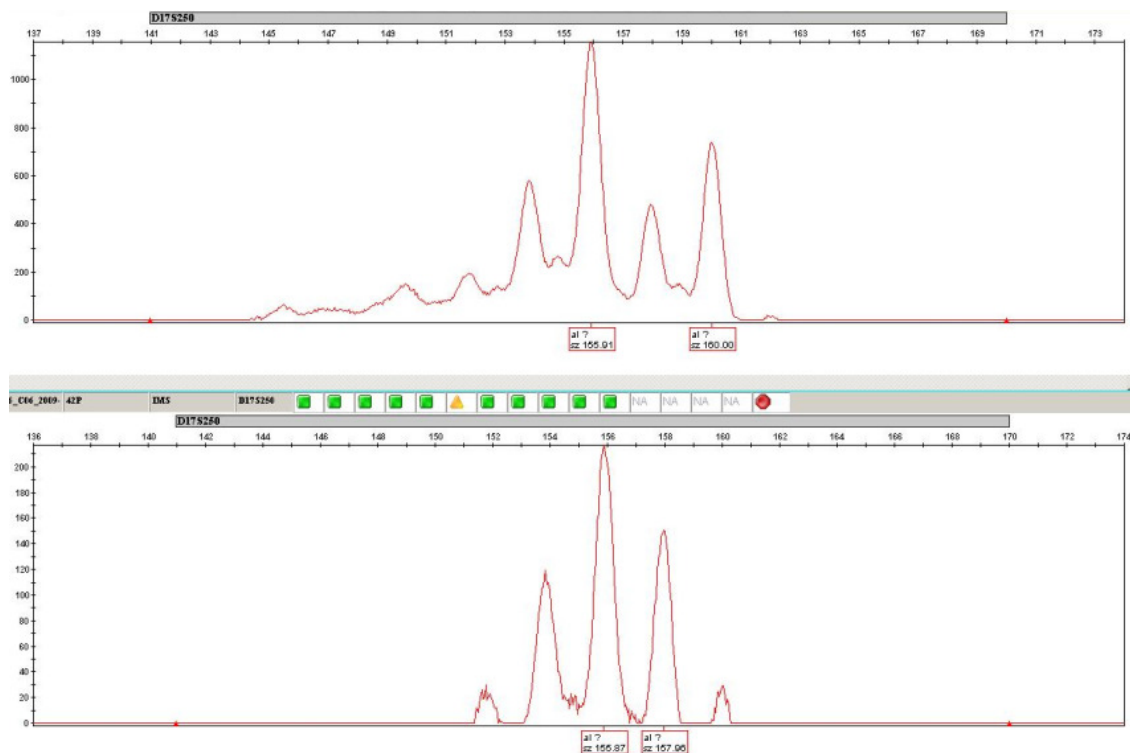


Fig. 15. Eletroferograma do marcador D17S250 da participante de número 42. A amostra do pólipio endometrial (P) deste caso IMS positivo mostra desvio do padrão quando comparado com o tecido normal. Há também uma diferenciação no tamanho dos picos menores quando comparados entre as amostras de tecido normal e o tecido com alteração.

5.4 Resultados dos achados clínicos e histopatológicos e a sua associação com a instabilidade de microssatélites

Não houve diferenças significativas entre o pólipos endometrial e a instabilidade de microssatélites com respeito à idade, idade da menarca, IMC médio, paridade abortamento, menopausa ou uso de terapia de reposição hormonal (p-value=0.99). Entretanto, pacientes com múltiplos pólipos apresentaram um marginal, porém não estatisticamente significante aumento da frequência de instabilidade de microssatélites quando comparadas com pacientes com pólipos solitários. A correlação entre os parâmetros clínicos e a instabilidade de microssatélites é apresentada na tabela 4 abaixo.

Tabela 4. Relação entre os parâmetros clínicos e a instabilidade de microssatélites

Variáveis	IMS negativo (n=107)	IMS positivo (n=7)	p-value
Idade	50.06 ± 0.55	53.42 ± 12.67	0.421
IMC (Kg/M ²)	26.36 ± 6.04	29.41 ± 11.98	0.602
Menarca	13.34 ± 1.92	13.33 ± 1.97	0.99
Paridade	2.14 ± 1.37	3 ± 2.61	0.184
Abortamento	1 ± 1.3	2 ± 1	0.186
Menopausa(%)			
Sim	39 (92.8%)	3 (7.2%)	0,54
Não	63 (94.0%)	4 (6.0%)	
Número de pólipos			
Solitario (%)	78 (96.3%)	3 (3.7%)	0.07
Multiplo (%)	24 (85.7%)	4 (14.3%)	

A avaliação histopatológica dos 109 pólipos é apresentada na tabela 5 a seguir:

Tabela 5 - Relação entre a instabilidade de microssatélites e os achados histopatológicos

Resultados histopatológicos	IMS				OR (CI)	p-value
	Sim		Não			
	Número	Percent. (%)	Número	Percent (%)		
Benigno						
Pólipos endometriais	4	4.7	82	95.3	1.0	0.13
Pólipos endometriais com hiperplasia simples sem atipia	3	15	17	85.0	3.6 (0.74-17.66)	
Pólipo endometrial com hiperplasia complexa sem atipia **	0	0.0	1	100.0	N/A*	
Lesões pré-malignas ou malignas						
Pólipo endometrial com hiperplasia atípica simples **	0	0.0	1	100.0	N/A*	
Carcinoma endometrial **	0	0.0	1	100.0	N/A*	

N/A* OR Não pode ser gerada

** Este dado não foi considerado quando do cálculo do P-value ou sua frequência foi muito baixa

Nós avaliamos a instabilidade de microssatélites em 5 loci, mas somente o D17S250 (6 amostras) e o D5S346 (1 amostra) mostraram esta alteração. Portanto, todos os casos apresentaram baixa instabilidade (tabela 6).

Tabela 6 – Características clínicas, histopatológicas e genéticas das pacientes que apresentaram instabilidade de microssatélites.

Número da paciente	Achados histopatológicos	Idade da paciente (anos)	Número de Pólipos		IMS marcadores				
			Solitário	Múltiplo	BAT25	BAT26	D2S123	D5S346	D17S250
18	Pólipo endometrial	66		X	-	-	-	-	+
42	Pólipo com hiperplasia simples sem atipia	65	X		-	-	-	-	+
47	Pólipo com hiperplasia simples sem atipia	68		X	-	-	-	-	+
69	Pólipo endometrial	46		X	-	-	-	-	+
84	Pólipo endometrial	38		X	-	-	-	-	+
105	Pólipo com hiperplasia simples sem atipia	41	X		-	-	-	+	-
112	Pólipo endometrial	50	X		-	-	-	-	+

A regressão logística binária multivariada foi usada para correlacionar as seguintes variáveis: pólipos com hiperplasia simples sem atipia e o número de pólipos, enquanto a idade foi usada para controle do modelo. Após ajustar a idade e o número de pólipos, lesões com hiperplasia simples sem atipia mostraram maior chance de apresentar IMS (OR: 2.59;95% CI: 0.48, 13.88). Além disso, múltiplos pólipos tinham mais chance de apresentar IMS (OR:3.29; 95% CI: 0.61, 17.84). Estes achados não foram estatisticamente significantes.

Tabela 7 - Regressão logística binária multivariada

Variável dependente = Instabilidade de Microssatélites (Sim/Não)			
Variáveis	Beta	Odds Ratio (OR)	95 % Intervalo de confiança
Constante	-4.67		
Idade (\geq 50 anos)	0.12	1.13	(0.22, 5.81)
Pólipos com hiperplasia simples sem atipia	0.95	2.59	(0.48, 13.88)
Múltiplos pólipos	1.19	3.29	(0.61,17.84)

6. DISCUSSÃO

A instabilidade de microssatélites tem sido sistematicamente estudada em muitas condições caracterizadas por pólipos, tais como pólipo nasal, gástrico e intestinal¹¹⁶⁻¹¹⁸. Apesar de o pólipo endometrial ser uma patologia freqüente e a instabilidade de microssatélites ter sido encontrada em 20-34% dos carcinomas esporádicos de endométrio^{119, 120}, a prevalência de IMS no pólipo endometrial permanece um enigma, primariamente devido ao pequeno número de publicações a este respeito e também porque as publicações existentes utilizaram amostras pouco representativas no estudo. Adicionalmente, estes estudos utilizaram material obtido através de curetagem, a qual é um método sabidamente falho em extrair todo o pólipo e resulta em uma espécie que contém um misto de pólipo com mucosa endometrial, porque retira a lesão às cegas¹²¹.

Que seja do nosso conhecimento até o presente, não há trabalhos publicados que tenham tido, como objetivo principal da investigação, o estudo da associação da instabilidade de microssatélites com o pólipo endometrial uterino. A maioria dos trabalhos apresenta o pólipo endometrial apenas como um dos componentes do estudo. Shia et al., 2008⁸⁵, estudando IMS em carcinoma de endométrio, encontrou 37 pólipos; porém, não fez correlação dos mesmos com a instabilidade de microssatélites⁸⁶. Faquin et al., 2000⁹³, conduziram um estudo retrospectivo em que investigaram a presença de IMS em uma ampla faixa de alterações endometriais e descreveram alguns pólipos, mas este não era o objetivo da investigação⁹⁴.

Esta pesquisa foi realizada com pólipos endometriais de 109 pacientes que desconheciam história de HNPCC. A prevalência da IMS no pólipo endometrial foi de 6.4% (6/109), todos eles com baixa instabilidade, ou seja, apenas um marcador se mostrou alterado.

O significado clínico e biológico da baixa instabilidade tem sido conflitante. Estudos encontraram que a baixa instabilidade de microssatélites em tumores colorretais não difere daqueles tumores que não apresentam instabilidade em uma ampla faixa de características clínicas, genéticas e histopatológicas¹²². Entretanto, Kim et al., 2009¹²³, encontraram que, apesar de a IMS-baixa no carcinoma colorretal estar aparentemente localizada em uma zona cinzenta entre a ausência de instabilidade e a alta instabilidade, estes tumores dispõem de características clínicas e patológicas diferenciadas e, provavelmente, formam um distinto sub-grupo¹²³. Com relação à baixa instabilidade no carcinoma de endométrio, estudos mostram que a prevalência varia de 10 a 30%, mas o seu significado não está claro^{119, 120}.

Nesta casuística, 20% dos pólipos endometriais apresentaram hiperplasia simples de endométrio sem atipia, um achado semelhante ao de outros¹²⁴. A instabilidade de microssatélites foi encontrada mais freqüentemente neste achado histológico (pólipos com hiperplasia simples de endométrio sem atipia) (3/20, 15%) do que nos pólipos endometriais comuns (4/86, 4,6%). O exato comportamento de como as lesões pré-malignas de endométrio progridem para o carcinoma endometrial não foi ainda completamente estabelecido. Até o presente, a atipia nuclear é o mais importante fator de risco de progressão para malignidade³⁰. De acordo com o modelo de Vogelstein, tumores malignos se desenvolvem do tecido normal através de uma série de lesões precursoras. Este processo é acompanhado pela aquisição de alterações genéticas, particularmente oncogenes e genes de supressão tumoral, levando ao aumento subsequente da instabilidade de microssatélites²⁰. Existem evidências moleculares e epidemiológicas que sugerem que a hiperplasia endometrial é uma lesão precursora para a neoplasia de endométrio¹²⁵. Estudos tem mostrado que pacientes com mutação do sistema de reparo MMR que apresentam hiperplasia típica de endométrio e instabilidade

de microssatélites usualmente apresentam progressão destas lesões, para a neoplasia de endométrio.⁷⁸ Expressão aberrante deste sistema de reparo talvez esteja presente em diferentes graus de hiperplasia endometrial e até mesmo no endométrio normal de algumas destas pacientes bem antes do desenvolvimento da lesão neoplásica¹²⁵⁻¹²⁸. Em concordância com estes dados, estudos concluíram, que a IMS talvez se desenvolva antes das alterações clínicas e histopatológicas, pré-datando, assim, o diagnóstico de carcinoma endometrial por anos^{94, 129}. Pesquisadores postulam que a maioria das alterações genéticas, tais como a aquisição do fenótipo de IMS, parecem ocorrer muito precocemente em uma célula mutante que é capaz de responder à modulação e influência hormonal e, talvez, preceda a aquisição das alterações morfológicas do carcinoma endometrial^{21, 94}.

No presente estudo, a frequência de carcinoma endometrial entre os pólipos foi de apenas um caso para um total de 109 pacientes. Esta neoplasia era do tipo adenocarcinoma endometrióide e não apresentou instabilidade de microssatélites. Esta paciente tinha 45 anos e usava um dispositivo intra-uterino contendo levonorgestrel com finalidade de contracepção. Desperta atenção o fato desta paciente haver desenvolvido neoplasia de endométrio em uso deste tipo de hormônio, porque mulheres com hiperplasia complexa de endométrio com o desejo de procriar normalmente tem indicação para o uso de progestágenos, objetivando-se tratar destas lesões. Este hormônio leva à regressão das hiperplasias na maioria das pacientes e tem se mostrado eficaz no tratamento do carcinoma de endométrio^{130, 131}. Entretanto, apesar destes efeitos benéficos, a literatura reporta caso de paciente usuária de progesterona para tratamento de hiperplasia atípica de endométrio e a sua progressão posterior para neoplasia endometrial metastática¹³². A paciente deste estudo apresentava um adenocarcinoma bem diferenciado que poderia ser classificado como do tipo I, de

acordo com os critérios de Bokhman²⁴. Este tipo de carcinoma é o mais frequentemente associado com a instabilidade de microssatélites¹²⁸. Estudos recentes, no entanto, sugerem que esta associação depende de a doença estar em um estágio avançado⁸⁷. Assim, este achado negativo pode ser explicado primeiramente porque não são todas as pacientes com adenocarcinoma de endométrio do tipo I que apresentam instabilidade de microssatélites e também porque a neoplasia desta paciente estava em um estágio inicial e tratava-se de um adenocarcinoma bem diferenciado, situações que não favorecem a presença da IMS.

A presença de múltiplos pólipos foi encontrada em 28 pacientes (25.68%), um achado similar ao de outros estudos³⁸. A IMS foi mais observada em mulheres que tinham mais de um pólipo 4/28 (14%) versus 3/81 (3.7%) do que naquelas com pólipos solitários. Este dado mostrou-se marginalmente significativo ($p < 0.07$). A importância deste resultado deve-se ao fato de que a presença de múltiplos pólipos tem sido associada ao aumento de risco para neoplasia endometrial³⁶.

A idade média das pacientes foi de 52 anos, com 21% delas acima de 60 anos. De um total de 109 casos, 39% estavam na pós-menopausa e, destas, 24,4% faziam uso de terapia de reposição hormonal dado similar ao de Savelli e cols. (24.8%)⁴⁴. Foi ainda relatado um caso de carcinoma mamário. As neoplasias mamárias de caráter hereditário apresentam alterações genéticas, tais como as mutações dos genes BRCA1 e BRCA2 que são genes de supressão tumoral do câncer de mama^{133, 134}. Estudos mostram que a instabilidade de microssatélites também pode ocorrer nas neoplasias de mama. Moynihan et al., 2008 encontraram que a IMS ou perda de heterosigossidade ocorreram em 83% dos casos do carcinoma mais freqüente da mama, o carcinoma ductal invasor¹³⁵. Além disso, evidências indicam que a maioria das neoplasias de mama mostram IMS especialmente dos dinucleotídeos¹³⁶. Neste estudo, a

paciente com diagnóstico de neoplasia mamária não estava fazendo uso de medicações moduladoras dos receptores de estrogênio (SERM), e sua lesão endometrial não apresentou alteração dos microssatélites nos marcadores investigados.

O índice de massa corpórea é indubitavelmente o meio mais acessível para medir a adiposidade. Neste estudo, a avaliação do IMC mostrou que cerca da metade das pacientes apresentavam sobrepeso ou obesidade. A distribuição do IMC ocorreu da seguinte forma: 50,8% apresentavam o IMC normal, 27,7% apresentavam sobrepeso e 21,5% eram obesas. Estudo conduzido na Europa encontrou IMC normal em 39% das pacientes, sobrepeso em 39% e obesidade em 19%, respectivamente ³⁸. Mulheres com sobrepeso e obesas apresentam pólipos endometrial muito mais frequente do que aquelas com o IMC normal, especialmente na pós-menopausa ¹³⁷. Ao estudar instabilidade de microssatélites e a sua relação com o índice de massa corpórea em pacientes portadoras de carcinoma endometrial foi observado que, a despeito da maioria das pacientes portadoras desta neoplasia ser obesa, não havia relação entre o alto índice de massa corpórea e instabilidade de microssatélites ¹³⁸. Este estudo concluiu semelhantemente que não há uma correlação da IMS com o aumento do índice de massa corpórea.

Uma das limitações do presente estudo é que, por ser um estudo transversal, não permite estabelecer umnexo causal. Considerando-se que o marcador D17S250 requereu uma específica otimização da PCR, e foi quase o único que se mostrou instável na série investigada, será também necessário avaliar um maior número de casos com o uso de marcadores adicionais, para que se possa concluir se este fato não interferiu nos resultados finais. Por outro lado, esta pesquisa apresentou o maior número de casos em estudos publicados sobre este tópico, com amostras obtidas através

da histeroscopia para o estudo da IMS no pólipo endometrial uterino o que a torna um excelente modelo de estudo.

A detecção precoce é crucial para que se obtenham bons resultados em qualquer patologia, e o desenvolvimento de métodos diagnósticos é muito importante para aumentar a chance de detecção precoce. Apesar de estudos terem demonstrado uma estabelecida associação entre o aumento de risco de transformação maligna em pólipos endometriais associados a parâmetros clínicos, tais como hipertensão, idade e status menopausal^{33, 44, 77}, ainda não existe nenhum marcador que pode ser usado para prever qual pólipo endometrial benigno está sob o risco de transformação maligna. Os métodos moleculares tem sido utilizados para o diagnóstico de lesões pré-malignas em uma ampla variedade de doenças, diagnosticando assim, patologias mais precocemente do que previamente esperado¹³⁹. Entretanto, não há método clínico, histoquímico ou bioquímico que tenha provado ser melhor do que o estudo histopatológico para prever que pólipo endometrial está sob o risco de transformação maligna.

A incidência da neoplasia endometrial em pacientes com pólipo oscila de acordo com a literatura entre 0,8 a 13%^{33, 44}. Considerando-se que foi encontrada neste estudo uma prevalência de 6,7% de instabilidade de microssatélites nos pólipos endometriais, ou seja, um percentual que, embora estatisticamente não tenha significância, estava situado entre a faixa percentual de malignização dos pólipos; o nosso questionamento é no sentido de que, apesar deste ser um achado infrequente no pólipo endometrial, poderia a instabilidade de microssatélites ser o elo que liga a paciente com pólipo endometrial e o risco de sofrer transformação maligna no futuro? Somente estudos longitudinais com maior número de pacientes e o uso de marcadores adicionais poderão nos responder a estes questionamentos.

7.CONCLUSÕES

Este estudo foi o primeiro publicado que apresenta a presença de instabilidade de microssatélites em pólipos endometriais obtidos por histeroscopia. Era esperado, por dados da literatura, encontrar um número maior de casos de IMS no pólipo endometrial uterino. Porém, a heterogeneidade entre a população estudada e o pequeno número de marcadores podem ter impactado nos resultados. Em conclusão, este estudo mostrou que a IMS foi infrequente no pólipo endometrial. Dada a falta de significância estatística dos nossos achados e uma não clara associação entre IMS e múltiplos pólipos e pólipos hiperplásicos, adicionais investigações, com um número maior de amostras, bem como o seguimento das pacientes que apresentaram instabilidade genética neste estudo serão necessárias para que se possa determinar se a IMS poderá ser um marcador útil para predizer qual pólipo endometrial está sob o risco de sofrer transformação maligna.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Munstedt K, Grant P, Woenckhaus J, Roth G, Tinneberg HR. Cancer of the endometrium: current aspects of diagnostics and treatment. *World J Surg Oncol*. 2004;2:24.
2. Hecht JL, Mutter GL. Molecular and pathologic aspects of endometrial carcinogenesis. *J Clin Oncol*. 2006 Oct 10;24(29):4783-91.
3. Society AC. What Are the Key Statistics About Endometrial Cancer? 2009 10/22/2009 [cited 2010 4/19/2010]; Available from: http://www.cancer.org/docroot/CRI/content/CRI_2_4_1X_What_are_the_key_statistics_for_endometrial_cancer.asp
4. Scavuzzi A, Amorim M, Pinho JB, Santos LC. Comparison of ultrasonographic, hysteroscopic and histopathologic findings in women with postmenopausal uterine bleeding. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2003 May 2003;25(4).
5. Creasman WT, Odicino F, Maisonneuve P, Beller U, Benedet JL, Heintz AP, Ngan HY, Sideri M, Pecorelli S. Carcinoma of the corpus uteri. *J Epidemiol Biostat*. 2001;6(1):47-86.
6. Oehler MK, Rees MC, Bicknell R. Steroids and the endometrium. *Curr Med Chem*. 2000 May;7(5):543-60.
7. Society AC. What Are the Risk Factors for Endometrial Cancer? 2009 [cited 4/28/2010]; Available from: http://www.cancer.org/docroot/cric/content/cric_2_4_2x_what_are_the_risk_factors_for_endometrial_cancer.asp
8. Grimes DA, Economy KE. Primary prevention of gynecologic cancers. *Am J Obstet Gynecol*. 1995 Jan;172(1 Pt 1):227-35.
9. Courneya KS, Karvinen KH, Campbell KL, Pearcey RG, Dundas G, Capstick V, Tonkin KS. Associations among exercise, body weight, and quality of life in a population-based sample of endometrial cancer survivors. *Gynecol Oncol*. 2005 May;97(2):422-30.
10. Parazzini F, La Vecchia C, Bocciolone L, Franceschi S. The epidemiology of endometrial cancer. *Gynecol Oncol*. 1991 Apr;41(1):1-16.
11. Gruber SB, Thompson WD. A population-based study of endometrial cancer and familial risk in younger women. Cancer and Steroid Hormone Study Group. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1996 Jun;5(6):411-7.
12. Quehenberger F, Vasen HF, van Houwelingen HC. Risk of colorectal and endometrial cancer for carriers of mutations of the hMLH1 and hMSH2 gene: correction for ascertainment. *J Med Genet*. 2005 Jun;42(6):491-6.
13. Aarnio M, Sankila R, Pukkala E, Salovaara R, Aaltonen LA, de la Chapelle A, Peltomaki P, Mecklin JP, Jarvinen HJ. Cancer risk in mutation carriers of DNA-

- mismatch-repair genes. *Int J Cancer*. 1999 Apr 12;81(2):214-8.
14. Dunlop MG, Farrington SM, Carothers AD, Wyllie AH, Sharp L, Burn J, Liu B, Kinzler KW, Vogelstein B. Cancer risk associated with germline DNA mismatch repair gene mutations. *Hum Mol Genet*. 1997 Jan;6(1):105-10.
 15. Lynch HT, Smyrk T. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome). An updated review. *Cancer*. 1996 Sep 15;78(6):1149-67.
 16. Aarnio M, Mecklin JP, Aaltonen LA, Nystrom-Lahti M, Jarvinen HJ. Life-time risk of different cancers in hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) syndrome. *Int J Cancer*. 1995 Dec 20;64(6):430-3.
 17. Schmeler KM, Lynch HT, Chen LM, Munsell MF, Soliman PT, Clark MB, Daniels MS, White KG, Boyd-Rogers SG, Conrad PG, Yang KY, Rubin MM, Sun CC, Slomovitz BM, Gershenson DM, Lu KH. Prophylactic surgery to reduce the risk of gynecologic cancers in the Lynch syndrome. *N Engl J Med*. 2006 Jan 19;354(3):261-9.
 18. Wijnen JT, Vasen HF, Khan PM, Zwinderman AH, van der Klift H, Mulder A, Tops C, Moller P, Fodde R. Clinical findings with implications for genetic testing in families with clustering of colorectal cancer. *N Engl J Med*. 1998 Aug 20;339(8):511-8.
 19. Schweizer P, Moisio AL, Kuismanen SA, Truninger K, Vierumaki R, Salovaara R, Arola J, Butzow R, Jiricny J, Peltomaki P, Nystrom-Lahti M. Lack of MSH2 and MSH6 characterizes endometrial but not colon carcinomas in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer Res*. 2001 Apr 1;61(7):2813-5.
 20. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990 Jun 1;61(5):759-67.
 21. Lax SF. Molecular genetic pathways in various types of endometrial carcinoma: from a phenotypical to a molecular-based classification. *Virchows Arch*. 2004 Mar;444(3):213-23.
 22. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instability in colorectal cancers. *Nature*. 1997 Apr 10;386(6625):623-7.
 23. Gryfe R, Kim H, Hsieh ET, Aronson MD, Holowaty EJ, Bull SB, Redston M, Gallinger S. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2000 Jan 13;342(2):69-77.
 24. Bokhman JV. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol*. 1983 Feb;15(1):10-7.
 25. Potischman N, Hoover RN, Brinton LA, Siiteri P, Dorgan JF, Swanson CA, Berman ML, Mortel R, Twiggs LB, Barrett RJ, Wilbanks GD, Persky V, Lurain JR. Case-control study of endogenous steroid hormones and endometrial cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1996 Aug 21;88(16):1127-35.
 26. Blaustein A, Kurman RJ. Blaustein's pathology of the female genital tract. 5th

- ed. New York: Springer; 2002.
27. Lax SF, Pizer ES, Ronnett BM, Kurman RJ. Clear cell carcinoma of the endometrium is characterized by a distinctive profile of p53, Ki-67, estrogen, and progesterone receptor expression. *Hum Pathol*. 1998 Jun;29(6):551-8.
 28. Lax SF. Molecular genetic changes in epithelial, stromal and mixed neoplasms of the endometrium. *Pathology*. 2007 Feb;39(1):46-54.
 29. Society AC. Cancer Facts and figures. 2004 [cited 2010; Available from: <http://www.cancer.org/Cancer/EndometrialCancer/DetailedGuide/endometrial-uterine-cancer-survival-rates>
 30. Kurman RJ, Kaminski PF, Norris HJ. The behavior of endometrial hyperplasia. A long-term study of "untreated" hyperplasia in 170 patients. *Cancer*. 1985 Jul 15;56(2):403-12.
 31. Scott RB. The elusive endometrial polyp. *Obstet Gynecol*. 1953 Feb;1(2):212-8.
 32. Farrell R, Scurry J, Otton G, Hacker NF. Clinicopathologic review of malignant polyps in stage 1A carcinoma of the endometrium. *Gynecol Oncol*. 2005 Aug;98(2):254-62.
 33. Hileeto D, Fadare O, Martel M, Zheng W. Age dependent association of endometrial polyps with increased risk of cancer involvement. *World J Surg Oncol*. 2005 Feb 9;3(1):8.
 34. Peterson WF, Novak ER. Endometrial polyps. *Obstet Gynecol*. 1956 Jul;8(1):40-9.
 35. Lima G, Gebrim, LH, Oliveira VC, Martins NV. . *Ginecologia Oncológica*. São Paulo; 1999.
 36. Fernandez-Parra J, Rodriguez Oliver A, Lopez Criado S, Parrilla Fernandez F, Montoya Ventoso F. Hysteroscopic evaluation of endometrial polyps. *Int J Gynaecol Obstet*. 2006 Nov;95(2):144-8.
 37. Katz VL. *Comprehensive gynecology*. 5th ed. Philadelphia: Mosby Elsevier; 2007.
 38. Reslova T, Tosner J, Resl M, Kugler R, Vavrova I. Endometrial polyps. A clinical study of 245 cases. *Arch Gynecol Obstet*. 1999;262(3-4):133-9.
 39. Clevenger-Hoeft M, Syrop CH, Stovall DW, Van Voorhis BJ. Sonohysterography in premenopausal women with and without abnormal bleeding. *Obstet Gynecol*. 1999 Oct;94(4):516-20.
 40. Foss BA, Horne HW, Jr., Hertig AT. The endometrium and sterility. *Fertil Steril*. 1958 May-Jun;9(3):193-205; discussion -6.
 41. Sillo-Seidl G. The analysis of the endometrium of 1,000 sterile women. *Hormones*. 1971;2(2):70-5.

42. Mazur MT, Kurman RJ. Diagnosis of endometrial biopsies and curettings : a practical approach. New York: Springer-Verlag; 1995.
43. Orvieto R, Bar-Hava I, Dicker D, Bar J, Ben-Rafael Z, Neri A. Endometrial polyps during menopause: characterization and significance. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1999 Nov;78(10):883-6.
44. Savelli L, De Iaco P, Santini D, Rosati F, Ghi T, Pignotti E, Bovicelli L. Histopathologic features and risk factors for benignity, hyperplasia, and cancer in endometrial polyps. *Am J Obstet Gynecol.* 2003 Apr;188(4):927-31.
45. Van Bogaert LJ. Clinicopathologic findings in endometrial polyps. *Obstet Gynecol.* 1988 May;71(5):771-3.
46. Haimov-Kochman R, Deri-Hasid R, Hamani Y, Voss E. The natural course of endometrial polyps: could they vanish when left untreated? *Fertil Steril.* 2009 Aug;92(2):828 e11-2.
47. Goldstein SR, Monteagudo A, Popiolek D, Mayberry P, Timor-Tritsch I. Evaluation of endometrial polyps. *Am J Obstet Gynecol.* 2002 Apr;186(4):669-74.
48. Thijs II, Neven P, Van Hooff I, Tonglet R, Van Belle Y, De Muylder X, Vanderick G. Oestrogen and progesterone receptor expression in postmenopausal endometrial polyps and their surrounding endometrium. *Eur J Cancer.* 2000 Sep;36 Suppl 4:108-9.
49. Voigt LF, Weiss NS, Chu J, Daling JR, McKnight B, van Belle G. Progestagen supplementation of exogenous oestrogens and risk of endometrial cancer. *Lancet.* 1991 Aug 3;338(8762):274-7.
50. Vorherr H. Endocrinology of breast cancer. *Maturitas.* 1987 Aug;9(2):113-22.
51. Biron-Shental T, Tepper R, Fishman A, Shapira J, Cohen I. Recurrent endometrial polyps in postmenopausal breast cancer patients on tamoxifen. *Gynecol Oncol.* 2003 Aug;90(2):382-6.
52. Oguz S, Sargin A, Kelekci S, Aytan H, Tapisiz OL, Mollamahmutoglu L. The role of hormone replacement therapy in endometrial polyp formation. *Maturitas.* 2005 Mar 14;50(3):231-6.
53. Mittal K, Schwartz L, Goswami S, Demopoulos R. Estrogen and progesterone receptor expression in endometrial polyps. *Int J Gynecol Pathol.* 1996 Oct;15(4):345-8.
54. Erdemoglu E, Guney M, Karahan N, Mungan T. Expression of cyclooxygenase-2, matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in premenopausal and postmenopausal endometrial polyps. *Maturitas.* 2008 Mar 20;59(3):268-74.
55. Lopes RG, Baracat EC, de Albuquerque Neto LC, Ramos JF, Yatabe S, Depesr DB, Lippi UG. Analysis of estrogen- and progesterone-receptor expression in endometrial polyps. *J Minim Invasive Gynecol.* 2007 May-Jun;14(3):300-3.

56. Taylor LJ, Jackson TL, Reid JG, Duffy SR. The differential expression of oestrogen receptors, progesterone receptors, Bcl-2 and Ki67 in endometrial polyps. *BJOG*. 2003 Sep;110(9):794-8.
57. Gul A, Ugur M, Iskender C, Zulfikaroglu E, Ozaksit G. Immunohistochemical expression of estrogen and progesterone receptors in endometrial polyps and its relationship to clinical parameters. *Arch Gynecol Obstet*. 2010 Mar;281(3):479-83.
58. 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 Apr;91(4):1056-60.
59. Creasman WT. Endometrial cancer: incidence, prognostic factors, diagnosis, and treatment. *Semin Oncol*. 1997 Feb;24(1 Suppl 1):S1-140-S1-50.
60. Maia H, Jr., Barbosa IC, Marques D, Calmon LC, Ladipo OA, Coutinho EM. Hysteroscopy and transvaginal sonography in menopausal women receiving hormone replacement therapy. *J Am Assoc Gynecol Laparosc*. 1996 Nov;4(1):13-8.
61. Dreisler E, Stampe Sorensen S, Ibsen PH, Lose G. Prevalence of endometrial polyps and abnormal uterine bleeding in a Danish population aged 20-74 years. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2009 Jan;33(1):102-8.
62. Ettinger B, Kenemans P, Johnson SR, Mol-Arts M, Van Os S, Seifert W, Verweij PJ, Cummings SR. Endometrial effects of tibolone in elderly, osteoporotic women. *Obstet Gynecol*. 2008 Sep;112(3):653-9.
63. Trialists EBC. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *Lancet*. 1998;351(9114):1451-67.
64. Nuovo MA, Nuovo GJ, McCaffrey RM, Levine RU, Barron B, Winkler B. Endometrial polyps in postmenopausal patients receiving tamoxifen. *Int J Gynecol Pathol*. 1989;8(2):125-31.
65. Cohen I, Azaria R, Bernheim J, Shapira J, Beyth Y. Risk factors of endometrial polyps resected from postmenopausal patients with breast carcinoma treated with tamoxifen. *Cancer*. 2001 Sep 1;92(5):1151-5.
66. 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 Oct;17(4):302-11.
67. Dal Cin P, De Wolf F, Klerckx P, Van Den Berghe H. The 6p21 chromosome region is nonrandomly involved in endometrial polyps. *Gynecol Oncol*. 1992 Sep;46(3):393-6.
68. Speleman F, Dal Cin P, Van Roy N, Van Marck E, Buytaert P, Van den Berghe H, Leroy JG. Is t(6;20)(p21;q13) a characteristic chromosome change in endometrial polyps? *Genes Chromosomes Cancer*. 1991 Jul;3(4):318-9.

69. Dal Cin P, Vanni R, Marras S, Moerman P, Kools P, Andria M, Valdes E, Deprest J, Van de Ven W, Van den Berghe H. Four cytogenetic subgroups can be identified in endometrial polyps. *Cancer Res.* 1995 Apr 1;55(7):1565-8.
70. Maia H, Jr., Maltez A, Studart E, Athayde C, Coutinho EM. Ki-67, Bcl-2 and p53 expression in endometrial polyps and in the normal endometrium during the menstrual cycle. *BJOG.* 2004 Nov;111(11):1242-7.
71. McGurgan P, Taylor LJ, Duffy SR, O'Donovan PJ. Are endometrial polyps from pre-menopausal women similar to post-menopausal women? An immunohistochemical comparison of endometrial polyps from pre- and post-menopausal women. *Maturitas.* 2006 Jun 20;54(3):277-84.
72. Iurlaro M, Loverro G, Vacca A, Cormio G, Ribatti D, Minischetti M, Ria R, Bruno M, Selvaggi L. Angiogenesis extent and expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 correlate with upgrading and myometrial invasion in endometrial carcinoma. *Eur J Clin Invest.* 1999 Sep;29(9):793-801.
73. Li W, Xu RJ, Jiang LH, Shi J, Long X, Fan B. Expression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase correlates with tumor angiogenesis in endometrial carcinoma. *Med Oncol.* 2005;22(1):63-70.
74. Mutter GL, Lin MC, Fitzgerald JT, Kum JB, Baak JP, Lees JA, Weng LP, Eng C. Altered PTEN expression as a diagnostic marker for the earliest endometrial precancers. *J Natl Cancer Inst.* 2000 Jun 7;92(11):924-30.
75. Hachisuga T, Miyakawa T, Tsujioka H, Horiuchi S, Emoto M, Kawarabayashi T. K-ras mutation in tamoxifen-related endometrial polyps. *Cancer.* 2003 Nov 1;98(9):1890-7.
76. Giordano G, Gnetti L, Merisio C, Melpignano M. Postmenopausal status, hypertension and obesity as risk factors for malignant transformation in endometrial polyps. *Maturitas.* 2007 Feb 20;56(2):190-7.
77. 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 Aug 20;57(4):415-21.
78. Effects of adjuvant tamoxifen and of cytotoxic therapy on mortality in early breast cancer. An overview of 61 randomized trials among 28,896 women. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *N Engl J Med.* 1988 Dec 29;319(26):1681-92.
79. Jovanovic AS, Boynton KA, Mutter GL. Uteri of women with endometrial carcinoma contain a histopathological spectrum of monoclonal putative precancers, some with microsatellite instability. *Cancer Res.* 1996 Apr 15;56(8):1917-21.
80. Ismail SM. Pathology of endometrium treated with tamoxifen. *J Clin Pathol.* 1994 Sep;47(9):827-33.
81. Gebauer G, Hafner A, Siebzehnrubl E, Lang N. Role of hysteroscopy in

- detection and extraction of endometrial polyps: results of a prospective study. *Am J Obstet Gynecol.* 2001 Jan;184(2):59-63.
82. Silva EG, Jenkins R. Serous carcinoma in endometrial polyps. *Mod Pathol.* 1990 Mar;3(2):120-8.
 83. Wheeler DT, Bell KA, Kurman RJ, Sherman ME. Minimal uterine serous carcinoma: diagnosis and clinicopathologic correlation. *Am J Surg Pathol.* 2000 Jun;24(6):797-806.
 84. McCluggage WG, Sumathi VP, McManus DT. Uterine serous carcinoma and endometrial intraepithelial carcinoma arising in endometrial polyps: report of 5 cases, including 2 associated with tamoxifen therapy. *Hum Pathol.* 2003 Sep;34(9):939-43.
 85. Hui P, Kelly M, O'Malley DM, Tavassoli F, Schwartz PE. Minimal uterine serous carcinoma: a clinicopathological study of 40 cases. *Mod Pathol.* 2005 Jan;18(1):75-82.
 86. Shia J, Black D, Hummer AJ, Boyd J, Soslow RA. Routinely assessed morphological features correlate with microsatellite instability status in endometrial cancer. *Hum Pathol.* 2008 Jan;39(1):116-25.
 87. Arabi H, Guan H, Kumar S, Cote M, Bandyopadhyay S, Bryant C, Shah J, Abdul-Karim FW, Munkarah AR, Ali-Fehmi R. Impact of microsatellite instability (MSI) on survival in high grade endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2009 May;113(2):153-8.
 88. Hearne CM, Ghosh S, Todd JA. Microsatellites for linkage analysis of genetic traits. *Trends Genet.* 1992 Aug;8(8):288-94.
 89. Peltomaki P, Lothe RA, Aaltonen LA, Pylkkanen L, Nystrom-Lahti M, Seruca R, David L, Holm R, Ryberg D, Haugen A, et al. Microsatellite instability is associated with tumors that characterize the hereditary non-polyposis colorectal carcinoma syndrome. *Cancer Res.* 1993 Dec 15;53(24):5853-5.
 90. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature.* 1993 Jun 10;363(6429):558-61.
 91. Hussein MR, Wood GS. Microsatellite instability and its relevance to cutaneous tumorigenesis. *J Cutan Pathol.* 2002 May;29(5):257-67.
 92. Berek JS, Novak E. *Berek & Novak's gynecology.* 14th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
 93. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN, Srivastava S. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res.* 1998 Nov 15;58(22):5248-57.

94. Faquin WC, Fitzgerald JT, Lin MC, Boynton KA, Muto MG, Mutter GL. Sporadic microsatellite instability is specific to neoplastic and preneoplastic endometrial tissues. *Am J Clin Pathol*. 2000 Apr;113(4):576-82.
95. Naidoo R, Chetty R. The application of microsatellites in molecular pathology. *Pathol Oncol Res*. 1998;4(4):310-5.
96. Lodish HF. *Molecular cell biology*. 5th ed. New York: W.H. Freeman and Company; 2003.
97. Iglesias AR, Kindlund E, Tammi M, Wadelius C. Some microsatellites may act as novel polymorphic cis-regulatory elements through transcription factor binding. *Gene*. 2004 Oct 27;341:149-65.
98. Ruschoff J, Bocker T, Schlegel J, Stumm G, Hofstaedter F. Microsatellite instability: new aspects in the carcinogenesis of colorectal carcinoma. *Virchows Arch*. 1995;426(3):215-22.
99. Esteller M, Levine R, Baylin SB, Ellenson LH, Herman JG. MLH1 promoter hypermethylation is associated with the microsatellite instability phenotype in sporadic endometrial carcinomas. *Oncogene*. 1998 Nov 5;17(18):2413-7.
100. Esteller M, Catusus L, Matias-Guiu X, Mutter GL, Prat J, Baylin SB, Herman JG. hMLH1 promoter hypermethylation is an early event in human endometrial tumorigenesis. *Am J Pathol*. 1999 Nov;155(5):1767-72.
101. Strathdee G, Brown R. Aberrant DNA methylation in cancer: potential clinical interventions. *Expert Rev Mol Med*. 2002 Mar;4(4):1-17.
102. Mukai T, Sekiguchi M. Gene silencing in phenomena related to DNA repair. *Oncogene*. 2002 Dec 16;21(58):9033-42.
103. Thibodeau SN, French AJ, Roche PC, Cunningham JM, Tester DJ, Lindor NM, Moslein G, Baker SM, Liskay RM, Burgart LJ, Honchel R, Halling KC. Altered expression of hMSH2 and hMLH1 in tumors with microsatellite instability and genetic alterations in mismatch repair genes. *Cancer Res*. 1996 Nov 1;56(21):4836-40.
104. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science*. 1993 May 7;260(5109):816-9.
105. Strand M, Prolla TA, Liskay RM, Petes TD. Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. *Nature*. 1993 Sep 16;365(6443):274-6.
106. Gurin CC, Federici MG, Kang L, Boyd J. Causes and consequences of microsatellite instability in endometrial carcinoma. *Cancer Res*. 1999 Jan 15;59(2):462-6.
107. Goel A, Arnold CN, Niedzwiecki D, Chang DK, Ricciardiello L, Carethers JM, Dowell JM, Wasserman L, Compton C, Mayer RJ, Bertagnolli MM, Boland CR. Characterization of sporadic colon cancer by patterns of genomic instability.

- Cancer Res. 2003 Apr 1;63(7):1608-14.
108. Fuzikawa AK, Haddad LA, da-Cunha-Melo JR, Brasileiro-Filho G, Pena SD. Utilization of microsatellites for the analysis of genomic alterations in colorectal cancers in Brazil. *Braz J Med Biol Res.* 1997 Aug;30(8):915-21.
 109. Schlegel J, Bocker T, Zirngibl H, Hofstadter F, Ruschoff J. Detection of microsatellite instability in human colorectal carcinomas using a non-radioactive PCR-based screening technique. *Virchows Arch.* 1995;426(3):223-7.
 110. Sharma M. Management of endometrial polyps: a clinical review. *Reviews in Gynaecological and Perinatal Practice.* 2004 March 2004;4(1):1-6.
 111. Ben-Arie A, Goldchmit C, Laviv Y, Levy R, Caspi B, Huszar M, Dgani R, Hagay Z. The malignant potential of endometrial polyps. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2004 Aug 10;115(2):206-10.
 112. Cupples LA, Heeren T, Schatzkin A, Colton T. Multiple testing of hypotheses in comparing two groups. *Ann Intern Med.* 1984 Jan;100(1):122-9.
 113. Bakker SC. Unravelling the genetics of schizophrenia and ADHD. In: Utrecht U, editor. Differences in Stutter Intensities between microsatellites are related to length and sequence of the repeat. Utrecht: Utrecht University; 2005. p. 82-94.
 114. Berg KD, Glaser CL, Thompson RE, Hamilton SR, Griffin CA, Eshleman JR. Detection of microsatellite instability by fluorescence multiplex polymerase chain reaction. *J Mol Diagn.* 2000 Feb;2(1):20-8.
 115. Loukola A, Eklin K, Laiho P, Salovaara R, Kristo P, Jarvinen H, Mecklin JP, Launonen V, Aaltonen LA. Microsatellite marker analysis in screening for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC). *Cancer Res.* 2001 Jun 1;61(11):4545-9.
 116. Karatzanis AD, Tzortzaki E, Samara KD, Neofytou E, Zenk J, Iro H, Siafakas N, Velegrakis GA. Microsatellite DNA instability in nasal polyposis. *Laryngoscope.* 2009 Apr;119(4):751-6.
 117. Nogueira AM, Carneiro F, Seruca R, Cirnes L, Veiga I, Machado JC, Sobrinho-Simoes M. Microsatellite instability in hyperplastic and adenomatous polyps of the stomach. *Cancer.* 1999 Nov 1;86(9):1649-56.
 118. Sandmeier D, Benhattar J, Martin P, Bouzourene H. Serrated polyps of the large intestine: a molecular study comparing sessile serrated adenomas and hyperplastic polyps. *Histopathology.* 2009 Aug;55(2):206-13.
 119. Tibiletti MG, Furlan D, Taborelli M, Facco C, Riva C, Franchi M, Cossu A, Trubia M, Taramelli R, Capella C. Microsatellite instability in endometrial cancer: relation to histological subtypes. *Gynecol Oncol.* 1999 May;73(2):247-52.
 120. Wong YF, Ip TY, Chung TK, Cheung TH, Hampton GM, Wang VW, Chang AM. Clinical and pathologic significance of microsatellite instability in

- endometrial cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 1999 Sep;9(5):406-10.
121. Epstein E, Ramirez A, Skoog L, Valentin L. Dilatation and curettage fails to detect most focal lesions in the uterine cavity in women with postmenopausal bleeding. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2001 Dec;80(12):1131-6.
 122. Jass JR, Young J, Leggett BA. Biological significance of microsatellite instability-low (MSI-L) status in colorectal tumors. *Am J Pathol*. 2001 Feb;158(2):779-81.
 123. Kim YH, Min BH, Choi HK, Kim SJ, Kim KM, Kim JY, Chang DK, Son HJ, Rhee PL, Kim JJ, Rhee JC, Chun HK. Sporadic colorectal carcinomas with low-level microsatellite instability in Korea: do they form a distinct subgroup with distinguished clinicopathological features? *J Surg Oncol*. 2009 May 1;99(6):351-5.
 124. Rahimi S, Marani C, Renzi C, Natale ME, Giovannini P, Zeloni R. Endometrial polyps and the risk of atypical hyperplasia on biopsies of unremarkable endometrium: a study on 694 patients with benign endometrial polyps. *Int J Gynecol Pathol*. 2009 Nov;28(6):522-8.
 125. Doll A, Abal M, Rigau M, Monge M, Gonzalez M, Demajo S, Colas E, Llauro M, Alazzouzi H, Planaguma J, Lohmann MA, Garcia J, Castellvi S, Ramon y Cajal J, Gil-Moreno A, Xercavins J, Alameda F, Reventos J. Novel molecular profiles of endometrial cancer-new light through old windows. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2008 Feb;108(3-5):221-9.
 126. de Leeuw WJ, Dierssen J, Vasen HF, Wijnen JT, Kenter GG, Meijers-Heijboer H, Brocker-Vriends A, Stormorken A, Moller P, Menko F, Cornelisse CJ, Morreau H. Prediction of a mismatch repair gene defect by microsatellite instability and immunohistochemical analysis in endometrial tumours from HNPCC patients. *J Pathol*. 2000 Nov;192(3):328-35.
 127. Ichikawa Y, Tsunoda H, Takano K, Oki A, Yoshikawa H. Microsatellite instability and immunohistochemical analysis of MLH1 and MSH2 in normal endometrium, endometrial hyperplasia and endometrial cancer from a hereditary nonpolyposis colorectal cancer patient. *Jpn J Clin Oncol*. 2002 Mar;32(3):110-2.
 128. Nieminen TT, Gylling A, Abdel-Rahman WM, Nuorva K, Aarnio M, Renkonen-Sinisalo L, Jarvinen HJ, Mecklin JP, Butzow R, Peltomaki P. Molecular analysis of endometrial tumorigenesis: importance of complex hyperplasia regardless of atypia. *Clin Cancer Res*. 2009 Sep 15;15(18):5772-83.
 129. Takano K, Ichikawa Y, Ueno E, Ohwada M, Suzuki M, Tsunoda H, Miwa M, Uchida K, Yoshikawa H. Microsatellite instability and expression of mismatch repair genes in sporadic endometrial cancer coexisting with colorectal or breast cancer. *Oncol Rep*. 2005 Jan;13(1):11-6.
 130. Randall TC, Kurman RJ. Progestin treatment of atypical hyperplasia and well-differentiated carcinoma of the endometrium in women under age 40. *Obstet Gynecol*. 1997 Sep;90(3):434-40.

131. Jadoul P, Donnez J. Conservative treatment may be beneficial for young women with atypical endometrial hyperplasia or endometrial adenocarcinoma. *Fertil Steril*. 2003 Dec;80(6):1315-24.
132. Rubatt JM, Slomovitz BM, Burke TW, Broaddus RR. Development of metastatic endometrial endometrioid adenocarcinoma while on progestin therapy for endometrial hyperplasia. *Gynecol Oncol*. 2005 Nov;99(2):472-6.
133. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*. 1994 Oct 7;266(5182):66-71.
134. Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J, Collins N, Gregory S, Gumbs C, Micklem G. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature*. 1995 Dec 21-28;378(6559):789-92.
135. Moinfar F, Beham A, Friedrich G, Deutsch A, Hrzenjak A, Luschin G, Tavassoli FA. Macro-environment of breast carcinoma: frequent genetic alterations in the normal appearing skins of patients with breast cancer. *Mod Pathol*. 2008 May;21(5):639-46.
136. Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*. 2001 May 17;411(6835):366-74.
137. Dreisler E, Sorensen SS, Lose G. Endometrial polyps and associated factors in Danish women aged 36-74 years. *Am J Obstet Gynecol*. 2009 Feb;200(2):147 e1-6.
138. McCourt CK, Mutch DG, Gibb RK, Rader JS, Goodfellow PJ, Trinkaus K, Powell MA. Body mass index: relationship to clinical, pathologic and features of microsatellite instability in endometrial cancer. *Gynecol Oncol*. 2007 Mar;104(3):535-9.
139. Mutter GL. Diagnosis of premalignant endometrial disease. *J Clin Pathol*. 2002 May;55(5):326-31.

ANEXOS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLERECIDO

A Senhora está sendo convidada a participar como voluntária em uma pesquisa. Após ser esclarecida sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra da pesquisadora responsável. Em caso de recusa, a senhora não será penalizada de forma alguma. Em caso de dúvida, procure os pesquisadores nos telefones 3248-2774 ou 8138-3868.

1. INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

Título do Projeto: Estudo da instabilidade de microssatélites no pólipó endometrial uterino

3. JUSTIFICATIVAS

1. Esta pesquisa se justifica pela possibilidade de auxiliar o médico no diagnóstico dos pólipos endometriais através da genética molecular.
2. Até onde vai o nosso conhecimento, até o presente, não foram publicados estudos em revistas médicas mostrando o estudo genético (instabilidade de microssatélites) em pólipos endometriais, apesar de se saber da existência do seu risco de virar câncer, permanecendo assim uma lacuna na identificação real desta questão.

4. OBJETIVOS

Esta pesquisa tem como objetivo fazer um estudo genético de risco do desenvolvimento de câncer do seu pólipo e depois este resultado será comparado com o resultado da biópsia e com os seus dados clínicos. Estes dados poderão ser usados para a possível detecção do risco de câncer (prognóstico) e auxiliar na determinação genética (diagnóstico) destes pólipos.

5. PROCEDIMENTOS

Ao comparecer para consulta ginecológica com o resultado do exame mostrando pólipo endometrial a senhora será encaminhada para a retirada da lesão e interrogada se aceita participar da pesquisa. Caso aceite a senhora responderá a um questionário padrão e avisará a data, local da cirurgia e o nome do colega que fará a sua cirurgia para que eu possa entrar em contato com o mesmo solicitando permissão para ir até o local da operação para recolher o material. Vale salientar que caso consinta em participar da pesquisa, o seu aceite significa que a senhora permitirá que se leve o seu pólipo com margens para estudo da biópsia (histopatológico) e a outra parte juntamente com as bordas servirá para extração do material genético que será utilizado na pesquisa básica no laboratório de genética da Universidade Católica de Brasília.

6. DESCONFORTOS E RISCOS ESPERADOS

Não se aplica, pois o material de estudo limita-se ao pólipo, e à retirada de pólipo endometrial com as bordas pelas práticas atuais é obrigatória, devido à necessidade de se afastar câncer dos mesmos, portanto considerando-se que a pesquisa limita-se ao uso de material já retirado não tem sentido falar em desconfortos e riscos.

7. BENEFÍCIOS ESPERADOS

Em longo prazo poderão ser obtidos marcadores moleculares que auxiliarão na determinação dos fatores de risco de câncer do pólo endometrial. A paciente em particular poderá beneficiar-se de um diagnóstico mais preciso de sua lesão. Esta pesquisa é totalmente sem custos para a senhora.

8. MÉTODOS ALTERNATIVOS EXISTENTES

Procedimentos alternativos no âmbito cirúrgico ficam a cargo do seu cirurgião assistente e independem da análise da biópsia (histopatológica) e molecular (instabilidade de microssatélites).

9. FORMA DE ACOMPANHAMENTO E ASSISTÊNCIA ASSIM COMO SEUS RESPONSÁVEIS

Não se aplica.

10. GARANTIA DE ESCLARECIMENTOS ANTES E DURANTE O CURSO DA PESQUISA

1. Acesso a qualquer tempo às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa inclusive para dirimir eventuais dúvidas - Sim
2. Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo sem que isto traga prejuízo a continuidade da assistência - Sim
3. Salvaguarda da confidencialidade sigilo e privacidade - Sim

11. IDENTIFICAÇÃO DE EVENTUAIS DANOS DECORRENTES DA PESQUISA

Não se aplica.

12. OBSERVAÇÕES IMPORTANTES

1. Os pesquisadores comprometem-se a manter o sigilo profissional requerido para exercer a profissão de médico. O seu questionário e demais dados ficarão arquivados por 5 anos e ficará resguardado de acordo com o código de ética em pesquisa previamente citado.
2. Este material ficará restrito para este estudo
3. Toda e qualquer dúvida que a senhora apresentar poderá retirar com a pesquisadora a qualquer momento no telefone 8138-3868 e 3248-2774

Declaro que após ser esclarecida pela pesquisadora a respeito da pesquisa consinto voluntariamente em participar da mesma

Brasília -----/-----/-----

Nome _____

RG: _____ Data de nascimento _____ / _____ / _____

Endereço _____

Cidade _____

Assinatura da declarante

Testemunha

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLERECIDO

Eu-----
RG-----CPF-----No do prontuário-----
abaixo assinado concordo em participar do estudo sobre a presença da instabilidade de microssatélite (estudo genético) nos pólipos endometriais uterinos, desenvolvido pelos pesquisadores Dra. Salete Rios, Prof. Dr. Florêncio Figueiredo E Prof. Dr^a Rosângela Vieira de Andrade, do curso de pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília . Fui devidamente informada e esclarecida pelos pesquisadores sobre este estudo. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção do meu acompanhamento/assistência/tratamento. Declaro que após ser esclarecida pela pesquisadora a respeito da pesquisa consinto voluntariamente em participar da mesma.
Brasília -----/-----/-----

Nome _____
RG: _____ Data de nascimento ____/____/_____
Endereço _____
_____ Cidade _____
Assinatura do declarante _____

Representante legal

Natureza do declarante _____
Nome _____
RG _____ Data de nascimento ____/____/_____
Sexo_M() F()
Endererço _____
_____ Assinatura do declarante _____

Declaração do pesquisador

Declaro para fins da realização da pesquisa que cumprirei todas as exigências acima , na qual obtive de forma apropriada e voluntária o consentimento livre e esclarecido da declarante acima , qualificada para a realização desta pesquisa

Assinatura da pesquisadora responsável

