



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

MIRIAN HELENA HOESCHL ABREU

**Comparação entre aspectos clínicos, histológicos e
inflamatórios e risco de lesões endometriais entre mulheres
obesas e não obesas**

Brasília – DF

2019

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

MIRIAN HELENA HOESCHL ABREU

Tese apresentada como requisito para a obtenção do título de Doutora em Patologia Molecular pelo Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília.

Linha de pesquisa:
Biologia Celular do Câncer

Orientador: Prof. Dr. José Raimundo Corrêa

Coorientadora: Kelly Dias Magalhães

Brasília – DF

2019

Ficha catalográfica

HM675c Hoeschl Abreu, Mirian Helena
Comparação entre aspectos clínicos, histológicos e
inflamatórios e risco de lesões endometriais entre mulheres
obesas e não obesa / Mirian Helena Hoeschl Abreu;
orientador Jose Raimundo Correa; co-orientador Kelly Dias
Magalhaes. -- Brasília, 2019.
69 p.

Tese (Doutorado - Doutorado em Patologia Molecular) --
Universidade de Brasília, 2019.

1. Curetagem aspirativa. 2. Câncer de endométrio. 3.
Inflamação. 4. Síndrome metabólica. 5. Obesidade. I. Raimundo
Correa, Jose, orient. II. Dias Magalhaes, Kelly, co-orient.
III. Título.

MIRIAN HELENA HOESCHL ABREU

**COMPARAÇÃO ENTRE ASPECTOS CLÍNICOS,
HISTOLÓGICOS E INFLAMATÓRIOS E RISCO DE LESÕES
ENDOMETRIAIS ENTRE MULHERES OBESAS E NÃO OBESAS**

Tese apresentada como requisito para a obtenção do título de Doutora em Patologia Molecular pelo Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da

Universidade de 22 de novembro de 2019.

BANCA EXAMINADORA:

Presidente: José Raimundo Corrêa

Universidade de Brasília – UnB

Membro: João Batista de Sousa

Universidade de Brasília - UnB

Membro: Walquíria Quida Salles Pereira Primo

Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal

Membro: Aldo Henrique Fonseca Pacheco Tavares

Universidade de Brasília – UnB

Suplente: Mariana Machado Hecht

Universidade de Brasília - UnB

LOCAIS DE DESENVOLVIMENTO:

Laboratório de Microscopia Eletrônica

Instituto de Ciências Biológicas

Universidade de Brasília.

Laboratório de Imunologia e Inflamação

Instituto de Ciências Biológicas

Universidade de Brasília.

Hospital Regional da Asa Norte (HRAN)

Ambulatório de Cirurgia Bariátrica

Ambulatório de Ginecologia Oncológica

Aos meus valorosos pais, Lilian e Annibal,
Aos meus queridos irmãos, Mônica e Annibal,
Aos meus filhos, Jade e João Gabriel,
Pelo seu imenso amor.

AGRADECIMENTOS

FAP/DF – Fundação de Apoio a Pesquisa do Distrito Federal, que propiciou o fomento necessário

À Universidade de Brasília, que propiciou o ambiente de pesquisa

Ao Laboratório de Biologia Celular – Universidade de Brasília, que acolheu este projeto de Pesquisa

Ao Laboratório de Imunologia – Universidade de Brasília, onde os procedimentos laboratoriais de dosagens de citocinas foram realizados

Ao Hospital Regional da Asa Norte, pelo ambiente onde se desenvolveu a coleta de dados e a maior parte da pesquisa

À Chefia da Ginecologia e Obstetrícia, Cláudio Lucio Albuquerque, que permitiu o desenvolvimento da etapa da pesquisa com o grupo controle

À Secretaria do Segundo Andar da Maternidade, que fornecia os mapas cirúrgicos de Cirurgias Ginecológicas

À Coordenadora da Residência Médica, Rosana Zabulon Feijó, pelo apoio ao projeto e estímulo constantes

Aos médicos cirurgiões da Cirurgia Digestiva e Bariátrica, Rafael Oliveira Galvão, cirurgião responsável pelas reuniões aos sábados, com mulheres candidatas à Cirurgia Bariátrica e demais médicos

Aos residentes da Cirurgia Digestiva e Bariátrica do Hospital Regional da Asa Norte que pacientemente esperavam a coleta de endométrio e tecido adiposo durante o transoperatório da cirurgia bariátrica, representados pelo médico Tales Maia

Ao Comitê de Ética do Hospital Regional da Asa Norte, pela orientação sobre o texto a ser encaminhado para a Plataforma Brasil

Aos residentes e alunos do internato da Escola de Ciências da Saúde da Ginecologia e Obstetrícia do Hospital Regional da Asa Norte HRAN, em especial à médica Cristina Cordeiro Pinheiro pela colaboração na coleta de dados

Aos Auxiliares e Técnicos de Enfermagem do Centro Cirúrgico, que cooperaram com a disponibilização de materiais durante as cirurgias, coleta de endométrio, e amostras sanguíneas

Aos Auxiliares e Técnicos do Ambulatório e 7º andar, que recebiam as pacientes para as entrevistas e consultas

À Secretaria da Cirurgia Bariátrica, que forneceu as listas de pacientes aguardando cirurgia

Aos colegas de mestrado e doutorado da UnB que me ensinaram e incentivaram: Nabylla Paixão Pereira, Lorena Pereira de Andrade, Karen Letícia Rodrigues de Paiva, Luis Henrique Costa Corrêa.

Aos meus tios, Helena Ângela e Antônio Carlos Wagner Cordeiro de Azeredo, que são um apoio constante.

Às estimadas pacientes por sua compreensão, colaboração e resiliência, meu sincero agradecimento.

“Ama-se mais o que se conquista com esforço.”

(Benjamin Disraeli)

RESUMO

Introdução. Entre os 22 tipos diferentes de câncer relacionados à obesidade, situa-se o câncer de endométrio que tem como sintomas iniciais o sangramento uterino anormal e espessamento endometrial. Neste contexto inserem-se as alterações metabólicas, as histológicas endometriais e o processo inflamatório. **Objetivos.** Comparar através da avaliação clínica, da histologia do endométrio e do perfil inflamatório no sangue periférico mulheres obesas e não obesas com sangramento uterino anormal e espessamento endometrial e estabelecer uma correlação entre estes aspectos e o maior risco de lesões endometriais pré-malignas e malignas. **Métodos.** Os dados clínicos foram coletados por meio de entrevista estruturada. Amostras de endométrio foram feitas usando-se cânula de aspiração endometrial ambulatorial de 3 mm. O diagnóstico histológico seguiu a nomenclatura da WHO 2014; a imuno-histoquímica para pesquisa de PTEN utilizou anticorpo monoclonal murínico. Para avaliação do perfil inflamatório utilizou-se ELISA em plasma de sangue venoso e a dosagem de IL-6, TNF- α , IL-10 e TGF- β . **Resultados.** Foram 35 mulheres obesas comparadas à 21 não obesas. As variáveis de risco para histologia alterada foram diretamente proporcionais ao IMC, dias de sangramento e espessura do endométrio e inversamente à presença de HAC. A área do fragmento biopsiado não diferiu entre histologia normal ou alterada. Mulheres hipertensas apresentaram PTEN alterado. Não houve diferença no perfil inflamatório entre obesas e não obesas. **Conclusão.** É possível que, o controle da obesidade, a diminuição do processo inflamatório, e a investigação do endométrio minimizem o risco de alterações endometriais em mulheres com sangramento uterino anormal e espessamento endometrial.

Palavras-chave: Curetagem aspirativa, câncer de endométrio, inflamação, síndrome metabólica, obesidade.

ABSTRACT

Introduction. Among the 22 different types of obesity-related cancers are endometrial cancer, the initial symptoms of which are abnormal uterine bleeding and endometrial thickening. In this context, metabolic changes, endometrial histological changes and the inflammatory process are included **Objective.** To compare through clinical evaluation, endometrial histology and inflammatory profile in peripheral blood obese and non-obese women with abnormal uterine bleeding and endometrial thickening and to establish a correlation between these aspects and the higher risk of premalignant and malignant endometrial lesions. **Methods.** Clinical data were collected through structured interviews. Endometrial samples were taken using 3 mm ambulatory endometrial aspiration cannulas. The histological diagnosis followed the WHO 2014 nomenclature; immunohistochemistry for PTEN screening used murine monoclonal antibody. The inflammatory profile was assessed by measuring IL-6, TNF- α , IL-10 and TGF- β by ELISA in venous blood plasma. **Results.** There were 35 obese and 21 nonobese women. Risk variables for altered histology were BMI, bleeding days, and endometrial thickness and inversely in the CAH. The area of the fragment was not different between altered and unchanged histology. Only high blood pressure was associated with altered PTEN. There is an association between PTEN and changes in histology. There was no difference in the inflammatory profile between obese and non-obese. **Conclusion.** Obesity control decreased inflammatory process, and endometrial investigation may minimize the risk of endometrial changes in women with abnormal uterine bleeding and endometrial thickening the risk of endometrial changes in women with abnormal uterine bleeding and endometrial thickening.

Key words: Aspiration curettage, endometrial carcinoma, inflammation, metabolic syndrome, obesity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Fluxograma de inclusão de pacientes

Figura 2. Endosampler e cavidade uterina

Figura 3. Endométrio IHQ e HE - Endométrio sem hiperplasia ou atípias. Perda focal, em um agrupamento de células epiteliais endometriais, da expressão de PTEN (PTEN null clusters)

Figura 4. Endométrio IHQ e HE - Endométrio sem hiperplasia ou atípias. Perda focal, em agrupamentos, da expressão de PTEN (PTEN null clusters)

Figura 5. Endométrio e IHQ e HE - Hiperplasia endometrial com atípias. Perda difusa da expressão de PTEN

Figura 6. Adenocarcinoma endometriode FIGO I, perda difusa de PTEN (100x)

Figura 7. TNF- α

Figura 8. IL-6

Figura 9. TGF- β

Figura 10. IL-10

Figura 11. Amostras de sangue periférico coletadas, preparadas e estocadas em – 80 C

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição de mulheres por grupo

Tabela 2. Distribuição das variáveis clínicas, idade e renda por mulheres obesas e não obesas

Tabela 3. Razão de risco bruta e ajustada para a ocorrência de histologia alterada por variáveis clínicas selecionadas (n = 47)

Tabela 4. Valores médios da área do fragmento do endométrio entre histologia alteração ou não

Tabela 5. Avaliação de concordância entre IHQ1 e IHQ 2 (PTEN)

Tabela 6. Razão de risco bruta e ajustada para a ocorrência de PTEN alterada por variáveis clínicas selecionadas (n = 45)

Tabela 7. Associação entre resultados histológicos e PTEN

SIGLAS E ABREVIACÕES

IDH - Índice de desenvolvimento humano

IMC - Índice de massa corporal

WHO - Organização mundial de saúde

SM - Síndrome metabólica

RI – Resistência à insulina

SUA – Sangramento uterino anormal

GLOBOCAN – Estatística global de câncer

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

TGF- β – Fator transformação de crescimento beta

IL-6 – Interleucina 6

IL-10 – Interleucina 10

ELISA – Ensaio imunoenzimático

PTEN - Phosphatase and tensin homolog (fosfatase e homólogo da tensina)

EIN - Lesões intra-epiteliais endometriais

HRAN - Hospital Regional da Asa Norte

UnB – Universidade de Brasília

SAS - Statistical Analysis System (sistema de análise estatística)

pg/mL – Picogramas por mililitro

HE – hematoxilina e eosina

EH – endometrium hyperplasia

IHQ – Imuno-histoquímica

PI3K/AKT/mTOR – fosfatidil inositol 3 kinase/ alvo da rapamicina em mamíferos

HAC - Hipertensão arterial crônica

DM – Diabete melitus

SOP – Síndrome dos ovário policísticos

CMH - Teste de Qui-quadrado de Cochran-Mantel e Haenszel

Sumário

AGRADECIMENTOS	7
RESUMO	10
ABSTRACT	11
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	12
LISTA DE TABELAS	13
SIGLAS E ABREVIações.....	15
2 JUSTIFICATIVA.....	20
3 OBJETIVOS	21
4 MATERIAIS E MÉTODOS	22
5 RESULTADOS.....	28
7 CONCLUSÃO.....	51
8 REFERÊNCIAS	46
9 APÊNDICES.....	52
9.1 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE	52
9.2 QUESTIONÁRIO SÓCIO DEMOGRÁFICO	54
9.3 CARTA CONVITE.....	55
9.4 PROPOSTA DE PARTICIPAÇÃO/COLABORAÇÃO DO PATOLOGISTA.....	56
9.5 DIAGNÓSTICOS HISTOLÓGICOS.....	57
10 ANEXOS	58
10.1 PROTOCOLO DE COLETA DE SANGUE.....	58
10.2 PROTOCOLO DE COLETA DE AMOSTRA DE ENDOMÉTRIO	59
10.3 TRANSPORTE DAS AMOSTRAS ATÉ O ACONDICIONAMENTO NOS LABORATÓRIOS	60
10.6 APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA - PLATAFORMA BRASIL	63
11. COLABORADORES	64
12. CONFLITO DE INTERESSE	62

1 INTRODUÇÃO

A obesidade, segundo estudos da organização mundial de saúde, alcançou proporções epidêmicas globalmente, com pelo menos 2,8 milhões de pessoas morrendo a cada ano como resultado devido ao sobrepeso ou por estarem obesas. Aparentemente, esse problema estaria associado a países com alto Índice de Desenvolvimento Humano (IDH), no entanto, a obesidade em diversos graus é prevalente em países de médio e baixo IDH (BRAY et al., 2018). A obesidade representa um dos fatores de risco mais importantes para doenças crônicas, incluindo diabetes tipo 2 (DM2), doenças cardiovasculares e câncer que são, também, as principais causas de mortalidade e morbidade no mundo e relacionadas a síndrome metabólica.

Existem outros indicadores de obesidade, no entanto, pela praticidade, facilidade de uso e homogeneidade, utiliza-se Índice de Massa Corporal (IMC) como um parâmetro para caracterizar este agravo a saúde. O indicador é utilizado devido a dificuldades em medir diretamente a gordura corporal e sua distribuição quando se utilizam outros métodos mais caros e mais complexos como a tomografia, a densitometria ou bioimpedância entre outros (PARIS, 2019). Assim, o IMC (que é igual ao peso em quilogramas dividido pela altura ao quadrado) será normal entre 18,5 a 24,9; sobrepeso de 25 a 29,9; obesidade grau I de 30 a 34,9; obesidade grau II de 35 a 39,9 e obesidade grau III acima de 40 (BRAY et al., 2018).

As pessoas com sobrepeso e obesidade são aquelas cujo excesso de acúmulo de gordura traz consequências negativas à saúde bem como alguns tipos de câncer, como de endométrio, mama, ovários, próstata, fígado, bexiga, rins e cólon (RENEHAN; ZWAHLEN; EGGER, 2015; STEELE et al., 2017) entre cerca de 22 tipos de câncer relacionados à obesidade (BHASKARAN, 2014). O risco para essas doenças se eleva com o aumento do IMC e há fatores relacionando-o à síndrome metabólica (SM) à inflamação, e à resistência à insulina (RI) com repercussões em diversas vias de sinalização celular (MACKINTOSH ML, DERBYSHIRE AE, MCVEY RJ, 2019; STEIN, JENNIFER H. , RUTKOWSKI JOSEPH M., SCHERER, 2016).

Por outro lado, pacientes com obesidade mórbida estão entre as que podem apresentar alterações endometriais que se manifestam como sangramento uterino anormal (SUA) (CAIRO; FONSECA; SIMÕES, 2012) ou espessamento endometrial, alterações estas relacionadas aos precursores do câncer de endométrio do tipo endometrióide (hiperplasias endometriais/lesões intra-epiteliais endometriais e o próprio câncer de endométrio

endometrióide) (DISAIA, PHILIIP J., CRESMAN, 2018; MATTHEWS, 2014; ÖZDEMIR et al., 2015; SCHMANDT et al., 2011).

O estímulo do endométrio pelo estrogênio sem o efeito de diferenciação da progesterona é um fator etiológico primário associado ao desenvolvimento de hiperplasia endometrial e adenocarcinoma. Fontes endógenas (anovulação e *obesidade*) (ZHANG *et al.*, 2010) e exógenas (terapia hormonal) sem oposição ao estrogênio aumentam o risco de carcinoma de endométrio (ARGENTA et al., 2014; BERCHUCK; BOYD, 1995).

Os fatores de crescimento insulinóides podem modular a ação dos hormônios nos tecidos-alvo através de mecanismos autócrinos e parácrinos. As células endometriais produzem os fatores de crescimento insulinóides I e II (IGF-I e IGF-II), IGFBPs (DE PERGOLA; SILVESTRIS, 2013; SCHOR et al., 2004). O mecanismo de ação dos fatores de crescimento até o núcleo inclui: receptores dos fatores de crescimento, seus substratos, enzimas (quinases e lipases), fatores transformadores e proteínas ligadoras de DNA (SCHOR, 2004).

Os níveis dos esteroides sexuais assim como sua principal proteína carreadora (globulina de ligação de hormônios sexuais – SHBG) variam em função de fatores como sexo, idade, excesso de peso e *distribuição abdominal de gordura*, presença de diabetes e outras doenças crônicas. São também capazes de influenciar o metabolismo glicídico e o lipídico e a distribuição da gordura corporal (DIMETZ; GOMES, 2000). Os níveis desta globulina parecem estar diminuídos em mulheres com câncer de endométrio e com o aumento da localização de gordura abdominal (DISAIA, PHILIIP J., CRESMAN, 2018). Este fato propicia maior quantidade de hormônios biodisponíveis.

O precursor comum da produção endógena de hormônios sexuais é o colesterol. Existem diversas vias e enzimas que levarão a produção de estrogênios gonadais a partir de seus precursores e colesterol. Observa-se a eficiência aumentada de conversão no hipertireoidismo, envelhecimento, doença hepática e obesidade (KASE, NATHAN G., WEINGOLD, 1987). E existe uma significativa relação entre o peso corporal e o grau de conversão de androgênio para estrogênio tanto em mulheres pré como pós menopausa (KASE, NATHAN G., WEINGOLD, 1987; MATIAS-GUIU; PRAT, 2013; RIŽNER, 2013).

É dessa forma que a obesidade fornece substrato para a conversão periférica de androgênio em estrogênio, mas existem outros locais responsáveis por essa aromatização (vias de aromatização $\Delta 4$ e $\Delta 5$). Além do tecido adiposo, o músculo, a pele, a mucosa

intestinal e o cérebro podem produzir a aromatização de androgênio para estrogênio o que pode ter significativa importância clínica.

Outro importante esteroide precursor da formação de estrogênios é o E1-sulfato (estrone-sulfato) o mais importante estrogênio no sangue periférico de mulheres na menopausa, encontrado em quantidades relativamente altas (pós menopausa sem TH: de 35,60 a 96,60 pg/mL ou 0,6 nM/mL). Associado ao IMC, sugere-se que se origina a partir do tecido adiposo em mulheres com câncer de endométrio (RÍŽNER, 2013).

A atividade da aromatase é estimulada por vários fatores pró-inflamatórios derivados do tecido adiposo como IL-1 β , IL-6, prostaglandina E2 e fator de necrose tumoral α (TNF- α), além de fator de crescimento derivado do fígado (IGF-1). Ao mesmo tempo, ocorre a diminuição da produção hepática de SHBG, o que torna o estradiol disponível e bioativo (DIMETZ; GOMES, 2000). Esse processo, no qual haveria hormônio bioativo disponível, poderia explicar vários tipos de câncer relacionados à atividade da aromatase e conversão periférica de estrogênios em homens e mulheres com excesso de peso (DANNENBERG; BERGER, 2013).

A obesidade é um estado de inflamação crônica subclínica, substrato da maioria de suas complicações sistêmicas. Essa inflamação constitui-se em um ambiente propício ao desenvolvimento, progressão e manutenção do cenário neoplásico uma vez que diversos mediadores e sinalizadores são ativados, em diferentes sítios e vias, fazendo com que o quadro se perpetue (DENG et al., 2016).

Existem indivíduos obesos que não apresentam quadros metabólicos disfuncionais e, aparentemente, não teriam riscos aumentados para doenças cardiovasculares, diabetes ou câncer (DENG et al., 2016; VACHHARAJANI; GRANGER, 2009).

Por outro lado, a ingestão aumentada leva ao aumento de peso, e reflete as conexões entre o meio social e o indivíduo na medida em que o excesso de calorias e sua baixa utilização levam ao desbalanço funcional e energético (FAIR; MONTGOMERY, 2009).

A obesidade traz um aumento progressivo, hiperplasia e hipertrofia, dos adipócitos, no entanto a vascularização local aparentemente não acompanha a demanda de oxigenação, levando à hipóxia desse tecido (SORISKY; MOLGAT; GAGNON, 2013; VUCENIK; JONES; MCLENITHAN, 2015). Essa hipóxia ocasiona a necrose tecidual com consequente infiltração de macrófagos no tecido adiposo (TRAYHURN, 2013). Metabólitos são gerados, entre eles adipocinas que incluem o glicerol, ácidos graxos livres, substâncias da reação

inflamatória, interleucinas, inibidor do ativador do plasminogênio-1 (PAI-1) proteína C-reativa entre tantos outros (SORISKY; MOLGAT; GAGNON, 2013).

Disso resulta um processo pró-inflamatório local e as interações entre adipócitos e células imunes residentes em diferentes estágios aumentam a lipólise de adipócitos e a secreção de lipídios, bem como a produção de células adipocíticas e imunológicas com múltiplos fatores pró-inflamatórios (CALÌ; MOLON; VIOLA, 2017). Sistemicamente, essa reação local se manifesta com resistência à insulina, hiperinsulinemia, hiperglicemia, hiperlipidemia e dano vascular, todos associados ao estresse oxidativo e ao desenvolvimento e progressão do câncer (CALÌ; MOLON; VIOLA, 2017; HOTAMISLIGIL, 2017; LEE et al., 2015).

Na década de 1990, o interesse pelo tecido adiposo foi reavaliado, resultando na descoberta da leptina, em 1994, bem como de diversos hormônios, que têm sido isolados do tecido adiposo, relacionados à regulação de processos fisiológicos e metabólicos, entre eles imunidade e inflamação (RAUCCI *et al.*, 2013)

A leptina estimula a produção de IL-1, IL-6, IL-12 e fator de necrose tumoral α (TNF- α) por células da imunidade inata, estimula a produção de ROS e secreção de leucotrieno B4, ciclooxigenase 2 (COX2) e óxido nítrico. A leptina também exerce efeitos diretos sobre o aumento da proliferação de células T e sobre a polarização das células TH1 e inibição da proliferação de Treg (HOTAMISLIGIL, 2017; LIN; ZHANG, 2017; XU et al., 2013).

Em estados de obesidade, os níveis de adiponectina diminuem e os de leptina aumentam (PARK *et al.*, 2014). Estas duas adipocinas *têm efeitos opostos* na resposta inflamatória. Assim também o acúmulo de macrófagos pró-inflamatórios é uma característica central da obesidade e um componente importante da inflamação adiposa ligada a complicações sistêmicas da obesidade (DENG et al., 2016).

O microambiente tumoral é complexo e abrange várias vias de ativação para iniciação, promoção, manutenção e progressão das alterações tumorais. Basicamente, entre as células do sistema imune (SI) inato e adaptativo recrutadas para o local do tumor, os macrófagos são particularmente abundantes e estão presentes em todos os estágios da progressão do tumor (ROY NOY; JEFFREY W. POLLARD, 2014). Ou seja, tudo vai depender do fenótipo adquirido pelos macrófagos (M1 ou M2), que são metabolicamente ativos, influenciando as funções locais e sistêmicas pela secreção de uma grande diversidade de moléculas, como citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento. A estrutura dos

macrófagos, bem como seu perfil de citocinas secretadas, enzimas e marcadores de superfície, apresentam ligeiras variações que dependem da função e estágio de maturação.

A ativação de macrófagos pode se dar por duas vias distintas, a clássica e a alternativa (SOLINAS et al., 2009), assim eles podem tomar a designação de macrófagos M1 ou M2, de acordo com a via de ativação: clássica ou alternativa. Os M1 (via clássica) desempenham um papel preponderante na proteção contra agentes patogênicos intracelulares e células cancerígenas em virtude de sua grande atividade citotóxica e da resposta imune que desencadeiam (SOLINAS et al., 2009). A ativação clássica é mediada por estímulos como IFN-gama TNF- α , receptores TLR e lipopolissacarídeos (LPS), enquanto a alternativa se dá por interleucinas IL-4, e IL-13, atuando através de receptores IL-4R. A ativação clássica produz IL-1, IL-12, IL-23, TNF- α e CXCL10, bem como ROS e RNI (reactive nitrogen intermediates), como óxido nítrico (NO), com uma potente ação microbicida. Também podem funcionar com células apresentadoras de antígenos.

A ativação alternativa (M2) ocorre em ambientes de exposição a IL-4, IL-13, IL-10 ou corticosteroides, fator de crescimento transformador β (TGF- β) e de PGE2. Esse segundo modo de ativação é importante para a resolução da inflamação, no entanto tem sido associado ao desenvolvimento de neoplasias. A via alternativa produz substâncias como IL-10, IL-1R e as quimiocinas CCL17 e CCL22 e tem baixa capacidade de apresentação de antígenos (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010; SOLINAS et al., 2009).

No tumor primário, os macrófagos podem estimular a angiogênese e aumentar a invasão, motilidade e evasão de células tumorais, além de promover disseminação, sobrevivência e crescimento de células tumorais. Cada uma dessas atividades está relacionada a uma subpopulação identificável de macrófagos bem como ao desenvolvimento de diferentes patologias e cânceres (LIN; ZHANG, 2017). Os macrófagos também são *imunossupressores*, impedindo o ataque de células tumorais pelas células NK e células T durante a progressão do tumor ou logo após a quimioterapia ou imunoterapia (CORRÊA et al., 2017; ROY NOY; JEFFREY W. POLLARD, 2014) mantendo um ambiente tumoral imunossupressor. De qualquer forma, ainda existem muitas informações a serem descobertas relacionadas aos macrófagos e sua ativação.

A princípio, o tecido adiposo era visto apenas como o local de armazenamento de energia. No entanto, sabe-se que ele participa de uma série de eventos relacionados ao processo inflamatório muitos dos quais comuns ao desenvolvimento, progressão e manutenção de vias neoplásicas (isto é, câncer). Alguns desses mediadores serão avaliados

neste trabalho, como TNF- α e TGF- β , IL-6 e IL-10, tanto em mulheres consideradas não obesas (grupo controle) como em mulheres com obesidade, nas quais se investiga o endométrio devido ao sangramento uterino anormal e espessamento, que pode ser considerado uma alteração susceptível de evoluir para hiperplasias, EIN ou câncer de endométrio (CORRÊA et al., 2017; GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010)

No contexto da obesidade, a hipóxia local do tecido em torno de adipócitos promove a mudança de macrófagos de M2 para o fenótipo M1. Isso muda o perfil de produção de citocinas anti-inflamatórias, como interleucina-10 (IL-10) dos macrófagos M2 a citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e TNF- α dos macrófagos M1 (MAACHI et al., 2004; TRAYHURN, 2013). Conseqüentemente, tanto a produção como a secreção dessas duas adipocinas estão aumentadas e, em conjunto, elas aumentam a tumorigênese através de seu efeito pró-inflamatório (LEE et al., 2015).

Nesse sentido, é fundamental que se compreenda o papel central e complexo da imunidade do hospedeiro (CALÌ; MOLON; VIOLA, 2017) no desenvolvimento da neoplasia maligna. Por outro lado, o mesmo SI pode desempenhar um papel importante na progressão de precursores. Assim, pode haver um período de equilíbrio, quando as alterações precursoras estão sob controle do SI (CORRÊA et al., 2017), no entanto algumas células ou clones podem driblar o SI e progredir para a malignização (BARBERIS et al., 2016; MUTTER et al., 2014).

É importante ressaltar que, ao longo da evolução da neoplasia, diferentes subconjuntos de células do SI, tanto dos compartimentos imunes inatos quanto nos adaptativos, alcançam o microambiente tumoral, exibindo funções opostas à medida que a lesão progride (CALÌ; MOLON; VIOLA, 2017; CORRÊA *et al.*, 2017). Compreende-se assim, a importância do microambiente tumoral e suas implicações na secreção de citocinas para o desenvolvimento do tumor. O tecido adiposo propicia o crescimento e desenvolvimento tumoral quando produz mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios de forma inadequada. Citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e TNF- α promovem a proliferação e angiogênese; interleucina-13, IL-10 e TGF- β também tem papel na manutenção tumoral, regenerando tecidos e inibindo o recrutamento de células imune anti-neoplásicas.

Em relação às alterações endometriais, estas podem ser identificadas a partir da queixa de sangramento uterino anormal ou pelo espessamento endometrial diagnosticado através de ultrassom transvaginal realizado com o objetivo de investigar o endométrio ou

outras patologias relacionadas à consulta ginecológica (DISAIA, CRESMAN, 2018). Estudos mostram que pacientes assintomáticas, candidatas a cirurgia bariátrica apresentaram 27,6% das biópsias realizadas com cureta de Pipelle com resultados alterados, e entre os diagnósticos estão hiperplasia, metaplasia ou pólipos (KAIYRLYKYZY *et al.*, 2015). Estudos anteriores demonstraram prevalência de 6,8% de hiperplasia ou câncer de endométrio em pacientes com IMC > 35 (ARGENTA *et al.*, 2014). Viola *et al.* (2008) encontrou hiperplasia em 6,7% de mulheres obesas ou obesas assintomáticas, tanto na pré como pós-menopausa, submetidas à biópsia de Pipelle (VIOLA *et al.*, 2008). Também pode-se dizer que participam da obesidade e alterações endometriais, a síndrome dos ovários policísticos (CHARALAMPAKIS *et al.*, 2016).

Em geral, o fluxo menstrual dura de três a quatro dias, embora cada mulher apresente características peculiares. A média de perda varia entre 30 e 80 ml, com intervalos em dias de 26 a 34. O ciclo menstrual é caracterizado por diferentes fases como a proliferação e descamação, e delas depende a normalidade do endométrio (KING; CRITCHLEY, 2010; MARUYAMA; YOSHIMURA, 2008). Portanto, sangramento uterino anormal (SUA) é aquele que apresenta uma alteração em um ou mais desses parâmetros, ou seja, um sangramento excessivo em duração, frequência ou quantidade (STRUFALDI, 2014). Esse distúrbio tem diagnóstico eminentemente clínico baseado nos dados obtidos na anamnese e nos exames físico e ginecológico. Encontra-se na identificação da natureza do sangramento e nas repercussões clínicas a definição das possibilidades de tratamento desse agravo comum à saúde da mulher (MADHRA *et al.*, 2014; STRUFALDI, 2014).

O SUA é responsável por 20% das consultas ginecológicas e estima-se que 30% das mulheres informam quadros de menorragia anualmente. Essa condição debilitante é a indicação de dois terços das hysterectomias e cerca de 25% das cirurgias ginecológicas (PETRACCO; BADALOTTI; ARENT, 2009).

A Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia sugere uma classificação a fim de unificar diagnóstico e condutas diante de sangramentos uterinos anormais conhecida como sistema PALM/COEIN - Pólipo uterino (P), Adenomiose (A), Leiomiomia (L), lesões precursoras e Malignas do corpo uterino (M), Coagulopatias (C), distúrbios da Ovulação (O), disfunção Endometrial (E), Iatrogênicas (I) e Não classificadas nos itens anteriores (N) - acrônimo das possíveis alterações. Propõe a discriminação entre sangramento agudo ou não, e um fluxograma de investigação do qual faz parte a biópsia de endométrio (BENETTI-PINTO *et al.*, 2017; MADHRA *et al.*, 2014; MUNRO *et al.*, 2011).

Na avaliação ultrassonográfica do endométrio, tanto a aparência como a espessura dependem de se a mulher está no menacme (e neste caso depende também do período do ciclo menstrual) como se está na menopausa. As medidas esperadas para o endométrio são: período menstrual 2-4 mm, fase proliferativa precoce (dia 16-14 do ciclo) 5 -7 mm; fase proliferativa tardia ou pré-ovulatória até 11 mm; fase secretória 7-16 mm.

A espessura típica do endométrio na menopausa é inferior a 5 mm. Esta espessura pode variar em situações específicas com diferentes medidas em mulheres com antecedentes de sangramento uterino anormal ou não e menopausa. Considera-se um risco aproximado de 7% se o endométrio estiver acima de 5 mm em mulheres na menopausa e com sangramento. Sem antecedentes de sangramento, aceita-se uma variação de 8-11 mm; sendo o risco esperado de carcinoma de endométrio se este valor ultrapassar 11 mm de 7% (GUPTA; DESAI; BHATT, 2017; KIM; KIM; KIM, 2016; NALABOFF; PELLERITO; BEN-LEVI, 2001). Segundo a estatística global de câncer GLOBOCAN, houve cerca de 382.069 novos casos de câncer de corpo de útero em 2018 (BRAY et al., 2018). E entre as neoplasias malignas que acometeram o sexo feminino, o câncer do corpo do útero foi o sexto tipo mais frequente.

Entre todos os cânceres, o aumento do índice de massa corporal está mais fortemente associado à incidência e morte por câncer de endométrio. Segundo Schmandt et al., 2011, a compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes ao papel do tecido adiposo e à obesidade que contribuem para a patogênese do câncer de endométrio poderiam fornecer estratégias racionais para a prevenção da doença primária e recorrente (SCHMANDT et al., 2011).

Este estudo se propôs a analisar fatores relacionados ao sangramento uterino anormal e espessamento endometrial em mulheres obesas candidatas à cirurgia bariátrica comparando-as às mulheres em pré-operatório de cirurgia ginecológica não obesas a fim de estabelecer quais variáveis melhor caracterizam mulheres sob risco de desenvolver lesões endometriais pré-malignas e malignas, incluindo o estudo do processo inflamatório crônico de baixa intensidade uma vez que este relaciona-se com o início, desenvolvimento e progressão de neoplasias malignas (CALÌ; MOLON; VIOLA, 2017; LIN; ZHANG, 2017; VACHHARAJANI; GRANGER, 2009).

Os marcadores da reação inflamatória no sangue periférico estudados aqui foram o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), fator transformador de crescimento beta (TGF- β),

interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10) (LEE et al., 2015) pelo ensaio imunoenzimático (ELISA) no plasma obtido do sangue venoso periférico (THWE; AMIEL, 2018).

O padrão de identificação de fosfatase e homólogo da tensina (PTEN) no endométrio normal, ou com alterações pré-malignas e patológicas mostra certo padrão. Nos tecidos sem oposição estrogênica (hiper-estimulação estrogênica) existe a expressão de PTEN, mas podem ocorrer áreas de glândulas negativas. Existem trabalhos que associam a perda de PTEN a um risco aumentado de desenvolvimento de câncer de endométrio (MUTTER et al., 2000, 2014). Outros estudos correlacionam a perda desta expressão às lesões classificadas como lesões intraepiteliais endometriais (EIN) (MONTE et al., 2010) potencialmente malignas.

Por último, espera-se que na identificação de alterações detectáveis no sangue periférico, na natureza do sangramento uterino, nas repercussões clínicas da obesidade, existam alguns indicadores das possibilidades de tratamento deste agravo à saúde das mulheres sob risco aumentado de desenvolver lesões precursoras ou de câncer de endométrio (MADHRA et al., 2014; STRUFALDI, 2014).

A revisão de literatura foi conduzida após identificação de estudos primários e secundários, correlacionando obesidade e processo inflamatório, lesões pré-malignas de endométrio e câncer de endométrio, de fontes nacionais e internacionais, nas principais bases de dados como LILACS, Scielo e PubMed abrangendo, principalmente, o período entre 2010 e 2019.

2 JUSTIFICATIVA

É comum que mulheres candidatas à cirurgia bariátrica apresentem sangramento uterino anormal pré-existente ou resultante de alterações metabólicas pós-cirúrgicas, bem como ocorram déficits nutricionais específicos como a diminuição das reservas de ferro, devido a síndromes disabsortivas.

Mulheres nessa situação são, então, encaminhadas ao ginecologista para que se obtenha o controle da perda sanguínea e, conseqüentemente, da anemia. No entanto, a maioria delas não terá o endométrio investigado, apesar de estarem no grupo de maior risco para o desenvolvimento de lesões endometriais. Este estudo se propôs a avaliar a relação entre aspectos clínicos, o sangramento uterino anormal, o espessamento endometrial, o processo inflamatório relacionados às alterações endometriais e à obesidade. Compreender todos estes aspectos em conjunto poderia evitar tanto o subtratamento como o sobretratamento com intervenções desnecessárias. Além disto, estas mulheres podem apresentar alterações endometriais relacionadas ao desenvolvimento do câncer de endométrio em estágios iniciais passíveis de intervenções precoces.

3 OBJETIVOS

Objetivo principal: Comparar através da avaliação clínica, da histologia do endométrio e do perfil inflamatório no sangue periférico mulheres obesas e não obesas com sangramento uterino anormal e espessamento endometrial e estabelecer uma correlação entre estes aspectos e o maior risco de lesões endometriais pré-malignas e malignas.

Objetivos específicos:

- a) Identificar fatores clínicos relacionados ao sangramento uterino anormal e espessamento endometrial em mulheres obesas e não obesas.
- b) Avaliar os principais fatores de risco para o desenvolvimento de lesões endometriais;
- c) Estudar o endométrio de mulheres obesas e não obesas com sangramento uterino anormal e espessamento endometrial através da histologia e da imuno-histoquímica;
- d) Avaliar a expressão de PTEN no endométrio;
- e) Avaliar interleucinas pro-inflamatórias (IL-6, TNF- α) e anti-inflamatórias (IL-10, TGF- β) em mulheres obesas e não obesas;
- f) Correlacionar os achados histológicos e imuno-histoquímicos endometriais ao processo inflamatório: interleucinas pro-inflamatórias (IL-6, TNF- α) e anti-inflamatórias (IL-10, TGF- β);
- g) Padronizar a indicação da realização de biópsias endometriais para avaliação histológica e imuno-histoquímica do endométrio em mulheres com sangramento uterino anormal e espessamento endometrial.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Foi realizado um estudo transversal, comparativo com amostra de conveniência.

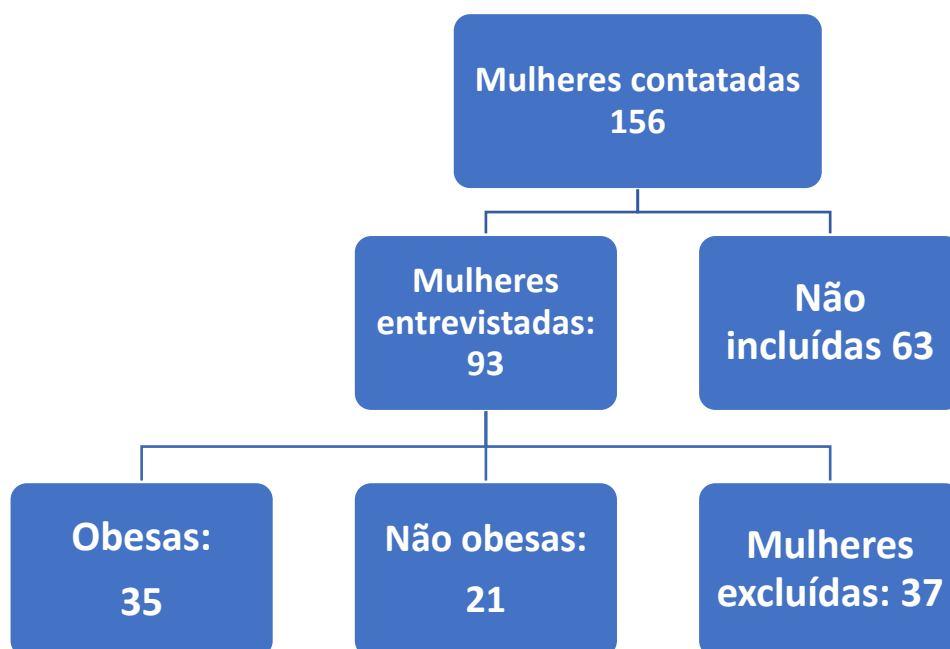
4.1. Local

A coleta de dados, biópsias e amostras de sangue foram realizadas no Hospital Regional da Asa Norte (HRAN) no ambulatório de cirurgia bariátrica e durante a internação pré-operatória de candidatas à cirurgia bariátrica; assim como no ambulatório de ginecologia oncológica ou durante a internação pré-operatória de candidatas a cirurgia ginecológica devido à sangramento uterino anormal. As dosagens de interleucinas foram realizadas na Universidade de Brasília no Laboratório de Imunologia e os exames histológicos e IHQ foram processados em laboratório parceiro sem ônus.

4.2 População

População de estudo: As mulheres convidadas a participar do estudo apresentavam obesidade mórbida, estavam em acompanhamento ambulatorial para a realização de cirurgia bariátrica e apresentavam sangramento uterino anormal e espessamento endometrial diagnosticado através de ecografia transvaginal previamente à cirurgia ginecológica e bariátrica. O fluxograma a seguir mostra a inclusão de mulheres entre julho de 2016 e julho de 2018 (Fluxograma 1).

Fluxograma 1. Mulheres contatadas



Grupo controle

O grupo controle foi constituído por mulheres sintomáticas, com sangramento uterino anormal, por doenças benignas, não obesas (IMC < 30) num total de 21 mulheres (arroladas através do ambulatório de ginecologia) submetidas à biópsia devido ao sangramento uterino anormal resistente ao tratamento clínico hormonal ou com anti-inflamatório.

A indicação de biópsia foi devida ao sangramento uterino anormal e espessamento endometrial detectado através de ecografia transvaginal realizada anteriormente aos procedimentos cirúrgicos independente de alterações estruturais (diagnóstico de pólipo, adenomiose, leiomioma) ou não estruturais. Considerou-se espessamento endometrial valores acima de 16 mm para mulheres no menacme, e para mulheres na menopausa acima de 5 mm sem sangramento

4.3 Comitê de Ética

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa sob número CAAE 45796515.3.0000.5553 Número do Parecer: 1.129.075, de 15 de maio de 2015 (Apêndice 9.1).

Após esclarecimentos sobre o projeto, assinava-se fornecido o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Um questionário foi preenchido com informações sobre hipertensão, diabete, tabagismo, asma (informação gerada espontaneamente pelas mulheres), síndrome dos ovários policísticos, antecedentes de neoplasia maligna pessoal e familiar; peso, altura, padrão menstrual, uso de terapia hormonal e espessura endometrial que era obtida através de exame de ultrassom transvaginal.

Foram 156 mulheres convidadas a participar do estudo (durante as reuniões da cirurgia bariátrica no terceiro sábado de casa mês no auditório do HRAN); destas, 63 não entraram no estudo. Para 93 mulheres foram feitas coletas de amostras; para análise estatística foram 56; trinta e sete não entraram na análise estatística: 15 por perda de amostras durante o processamento; 10 por biópsias sem sucesso; antecedentes de infarto miocárdico, duas com antecedentes de neoplasia (mama em uso de tamoxifeno e neoplasia maligna de endométrio usando dispositivo intrauterino hormonal); uma engravidou, entre outras inadequações ao estudo como a falta de seguimento, isto é, o não retorno com a ecografia transvaginal para avaliação da medida do endométrio e realização da biópsia endometrial.

Entre 63 mulheres, eventualmente havia mais de um motivo para não inclusão: 4 já submetidas à histerectomia; 3 sem início da vida sexual; 3 na menopausa sem alterações endometriais; 7 recusaram-se a participar no momento da coleta de endométrio; 2 por tentativa de autoextermínio; 8 sem contato prévio à cirurgia; 11 utilizando algum tipo de hormônio (anticoncepcional, dispositivo intrauterino, tibolona); e outras que não retornaram para dar continuidade como o não comparecimento para coleta de sangue ou endométrio. Outras mulheres já submetidas à cirurgia bariátrica procuraram ser atendidas na expectativa de conseguir cirurgia plástica, ou para reconstrução de mama (pós câncer de mama necessitando reconstrução com prótese), ou para correção do sangramento uterino anormal (aguardando histerectomias, inserção de dispositivo intrauterino, entre outros motivos).

Todas as mulheres arroladas pela cirurgia ginecológica foram operadas (26).

Foram coletas 17 colpocitologias oncóticas segundo o Protocolo Brasileiro de Prevenção de Câncer de Colo de Útero entre as mulheres obesas e inseridos 3 dispositivos intrauterinos. Uma paciente obesa, já submetida a cirurgia bariátrica, foi submetida a histerectomia, três meses daquele procedimento.

4.6 Critérios de exclusão

Mulheres gestantes, com câncer genital conhecido ou diagnosticados ao longo do período da pesquisa, soropositivas, com antecedentes de hiperplasia ou câncer de endométrio, em terapia hormonal. Além destas, aquelas em uso de contraceptivos orais ou dispositivo intrauterino contendo progesterona.

4.7 Tratamento dos resultados

Modelos regressão de Poisson com variância robusta foram empregados e razões de prevalência com intervalo de 95 % foram calculadas para se analisar a intensidade da associação entre variáveis demográficas e clínicas com as ocorrências de histologia e de PTEN alterados. Usou-se a regressão de Poisson porque ela fornece uma melhor estimativa das razões de prevalência, que por sua vez representam de forma mais significativas para as medidas de efeito para estudos transversais (BARROS; HIRAKATA, 2003). Empregou-se o coeficiente kappa ponderado para se avaliar a concordância entre os histologistas. Valores médios das citocinas foram comparados entre pacientes obesos e não obesos empregando-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney. O nível de significância foi fixado em p-valor < 0,05. As análises foram realizadas pelo aplicativo SAS 9.4.

4.8 Análise do perfil inflamatório

No momento da coleta de dados, também foi feita a coleta de 20 mililitros de sangue venoso periférico.

Foi feita separação do plasma para dosagem de interleucinas (IL-10, TNF- α e TGF- β , IL-6), e armazenados em frascos contendo 1 ml de plasma (1 a 3 criotubos) à -80°C, rotulados e enumerados na sequência em que foram coletados.

A quantificação dos níveis de citocinas secretadas foi realizada através de ensaio imunoenzimático pelo método de ELISA. Os níveis de citocinas foram demonstrados em valores absolutos (pg/mL), de acordo com as instruções (eBioscience e R & D System). As placas foram lidas depois de adicionar solução de parada a 450 nm usando espectrofotômetro SpectraMax M3 (Molecular Devices, Sunnyvale, EUA).

4.9 Avaliação histopatológica e imuno-histoquímica

Foram realizadas biópsias ambulatoriais anteriores ou no momento da cirurgia bariátrica, através de aspiração intrauterina com cânula Endosampler de 3 mm; e ginecológica, no momento da histerectomia. Cada amostra de endométrio foi armazenada em formol e encaminhada ao laboratório de histologia para a realização do diagnóstico. Os espécimes foram revistos por dois patologistas com especial interesse em patologia ginecológica, os quais foram “cegos” quanto às informações clínico-patológicas. Cada amostra ambulatorial foi realizada preferencialmente na primeira fase do ciclo menstrual nas pacientes no menacme e em qualquer período em mulheres na pós-menopausa (se apresentassem espessamento endometrial e sangramento uterino anormal). Entretanto, a coleta também dependeu do momento cirúrgico.

As amostras endometriais foram realizadas em todas as mulheres sendo as indicações o sangramento uterino anormal e espessamento endometrial independente de causas estruturais (diagnósticos ecográficos de pólipos, adenomiose, leiomioma) ou não estruturais de sangramento.

As amostras foram fixadas em formaldeído 3,47%, embebidas em parafina e coradas com hematoxilina-eosina (HE) e os resultados classificados pelos patologistas em: sem atipia sem hiperplasia; hiperplasia simples; hiperplasia com atipia ou lesão intraepithelial endometrial; adenocarcinoma de endométrio. As mulheres com ou sem anormalidades endometriais foram encaminhadas para o seguimento e tratamento com ginecologista em suas regionais de origem ou foram submetidas a histeroscopia cirúrgica, inserção de dispositivo hormonal ou histerectomia. As mulheres que apresentaram adenocarcinoma foram encaminhadas para o tratamento adequado (cirurgia, radioterapia).

Cada entrevista ocorreu apenas uma vez, o mesmo acontecendo quanto as amostras de endométrio e sangue periférico. Uma vez coletados os dados, o sangue periférico e o endométrio, considerou-se que aquela mulher não mais apresentava o processo inflamatório investigado por ter sido submetida à cirurgia.

Para imuno-histoquímica foi utilizado anticorpo monoclonal murínico 6h2.1 Dako, usado à diluição de 1:100 overnight; a 4°C.

A imuno-histoquímica foi classificada como positiva (considerado normal), PTEN nulo/negativo quando o sinal foi ausente no núcleo e em compartimentos citoplasmáticos de todas as células e em pelo menos uma glândula. PTEN null-cluster, quando a alteração se mostrava localizada e, PTEN null-diffuse, quando a alteração era difusa.

O Endosampler é um dispositivo de sucção de baixa pressão que funciona como uma cureta semirrígida de 3 mm com uma única ranhura na extremidade (Figura 1) é angulado e possui marcações em centímetros. A pressão negativa é criada por uma seringa de 10 cm³ na base do dispositivo. Existe um mecanismo de mola de bloqueio na seringa que impede o refluxo do espécime aspirado.

O endométrio coletado foi dividido em duas amostras:

- Amostra conservada em formol a 3,7%: para realização de histopatológico convencional e imuno-histoquímica (PTEN);
- Amostra conservada a – 80°C: para posterior reavaliação se necessária.



Figura 2. Endosampler e cavidade uterina
Fonte: MedGyn Endosampler™

5 RESULTADOS

As mulheres que tiveram seus dados incluídos na análise estatística estavam distribuídas conforme a tabela abaixo (Tabela 1).

Tabela 1. Distribuição de mulheres por grupo

	Bariátrica	Ginecológica	Total (n)
Não obesas	0	21	21
Obesas	30(85,71%)	5(14,29%)	35
Total	30	26	56

IMC < 30 = não obesas. IMC ≥ 30 = obesas N = número de mulheres

Das 35 mulheres obesas 85,71 % participaram do estudo pela cirurgia bariátrica, enquanto 14,29 % participaram pela cirurgia ginecológica (5 mulheres). Assim, para análise estatística os grupos estão distribuídos em mulheres obesas (35) e não obesas (21) num total de 56 mulheres.

Em relação aos dias de sangramento, as não obesas tinham em média $16,76 \pm 14,99$ dias de sangramento, enquanto as obesas cerca de $10,72 \pm 9,25$ dias; a espessura de endométrio foi de $9,54 \pm 11,61$ mm entre as não obesas, e de $9,30 \pm 6,05$ mm entre as obesas. Em relação a intensidade do fluxo, 90,48% das não obesas e 85,71 das obesas apresentavam fluxo intenso. Eram tabagistas: 2 pacientes não obesas (9,52%) e 3 obesas (8,57%). Tinham hipertensão arterial (HAC) entre as não obesas 4 (19,05%) e 15 obesas (42,86%); diabetes: 3 não obesas (14,29%) e 8 obesas (22,86%); asma 1 não obesa (4,76%) e 4 obesas (11,43%); SOP nenhuma paciente não obesa e 5 obesas (14,29%). Não houve hiperplasia com atipia ou carcinoma entre as não obesas (21 mulheres). Entre as obesas, foram os seguintes diagnósticos histológicos: sem atipia e sem hiperplasia 30 (85,71%), hiperplasia sem atipia 3 (8,57%), hiperplasia com atipia 1 (2,86%) e adenocarcinoma de endométrio 1 (2,86%) (Tabela 2)

O menor IMC foi 19,5 em mulher que pesava 44 kg, tinha 44 anos referindo sangramento por 30 dias; por outro lado, a paciente mais jovem também era a mais obesa com IMC de 64,1 pesa 185,4 kg aos 27 anos de idade e sangramento por 9 dias.

A única variável significativa entre os grupos foi a idade, sendo as mulheres não obesas significativamente mais velhas que as obesas ($p=0,0097$) (Tabela 2).

Tabela 2. Distribuição de características avaliadas por mulheres obesas e não obesas

Variáveis*	Grupo		p-valor [#]
	Não obesas	Obesas	
Idade	47,47 ± 8,58	40,41 ± 7,13	0,0097
Dias de Sangramento	16,67 ± 14,99	10,72 ± 9,25	0,1018
Espessura Endométrio (mm)	9,54 ± 11,61	9,30 ± 6,05	0,4849
Renda Familiar (reais)	2087,56 ± 894,81	1695,88 ± 791,32	0,1050
Fluxo Menstrual	(N)	(N)	0,6697
Não intenso	2 (9,52)	5 (14,29)	
Intenso	19 (90,48)	30 (85,71)	
Tabagismo			0,8218
Não fuma	16 (76,19)	24 (68,57)	
Fumante	2 (9,52)	3 (8,57)	
Ex fumante	3 (14,29)	8 (22,86)	
Hipertensão arterial	(N)	(N)	0,0685
Não	17 (80,95)	20 (57,14)	
Sim	4 (19,05)	15 (42,86)	
Diabetes	(N)	(N)	0,5079
Não	18 (85,71)	27 (77,14)	
Sim	3 (14,29)	8 (22,86)	
Asma	(N)	(N)	0,6402
Não	20 (95,24)	31 (88,57)	
Sim	1 (4,76)	4 (11,43)	
Síndrome ov. Policísticos (SOP)	(N)	(N)	0,1452
Não	21 (100,00)	30 (85,71)	
Sim	0 (0,00)	5 (14,29)	
Histologia	(N)	(N)	1,000
S/ Atipia e S/ Hiperplasia**	19 (90,48)	30 (85,71)	
Hiperplasia Sem Atipia	2 (9,52)	3 (8,57)	
Hiperplasia com Atipia	0 (0,00)	1 (2,86)	
Adenocarcinoma	0 (0,00)	1 (2,86)	
PTEN	(N)	(N)	0,4803
Não funcionou	2 (9,52)	1 (2,86)	
Positivo	15 (71,43)	23 (65,71)	
Null Cluster	4 (19,05)	9 (25,71)	
Null Difuse	0 (0,00)	2 (5,71)	

* Valores expressos em porcentagem (%) ou média \pm desvio padrão
 **A descrição destes diagnósticos encontra-se no apêndice 9.5
 # p-valor obtido pelo teste de qui-quadrado ou Mann-Whitney
 Total de mulheres: 56
 Idade em anos.
 (N) – número de mulheres
 PTEN - Phosphatase and tensin homolog (fosfatase e homólogo da tensina)

A tabela 3 mostra as variáveis IMC, HAC, dias de sangramento e espessura endometrial em relação ao risco de ocorrência de histologia alterada.

Tabela 3. Razão de risco bruta e ajustada para a ocorrência de histologia alterada por variáveis clínicas selecionadas (n = 47)

Variáveis Clínicas	Razão de Prevalência - RP (IC 95 %)			
	Bivariada	p-valor	Ajustada ^a	p-valor
IMC	1,03 (0,95; 1,13)	0,4444	1,11 (1,01; 1,22)	0,0256
HAC		0,4470		0,0122
Não	2,27 (0,27; 18,68)	0,4470	4,76 (1,40; 16,13)	0,0122
Sim	1	-	1	-
Dias de sangramento	1,07 (1,04; 1,09)	< 0,0001	1,13 (1,04; 1,22)	0,0045
Espessura do endométrio (mm)	1,04 (0,98; 1,09)	0,1844	1,13 (1,05; 1,21)	0,0010

a – Ajustada IMC, HAC, dias de sangramento e tamanho do endométrio

Obs.: Das 56 mulheres, 6 não realizaram ecografia para avaliação de espessura do endométrio; em 3 o endométrio foi descrito como não identificado.

Na análise bivariada, a única variável associada significativamente com a ocorrência histologia alterada foi o número de dias de sangramento, que apresentou uma associação positiva com a ocorrência de histologia alterada; isto é, quanto mais dias de sangramento, maior a possibilidade de haver alterações endometriais (Tabela 3).

Por outro lado, na análise multivariada (Tabela 3) todas as variáveis IMC, pressão arterial, dias de sangramento e espessura do endométrio se mostraram associadas positiva e significativamente com a ocorrência de histologia alterada. Ou seja, para cada acréscimo de uma unidade no IMC a prevalência de histologia alterada aumentou em 11% (p = 0,0256). Mulheres sem hipertensão apresentaram uma prevalência de histologia alterada 4,76 vezes maior do que mulheres com hipertensão arterial (p = 0,0122). Por outro lado, para cada aumento em um dia de sangramento ou para cada aumento de um milímetro na espessura do endométrio a prevalência de alteração histológica aumentou em 13 % (p = 0,0045 e p = 0,0010, respectivamente).

Foi feita avaliação do fragmento de endométrio comparando o tamanho do mesmo em relação a histologia alterada ou não uma vez que poderia ter havido diferença no tamanho das amostras prejudicando a avaliação histológica. A Tabela 4 mostra o tamanho em milímetros quadrados dos fragmentos e o “p-valor”.

Tabela 4. Valores médios da área do fragmento do endométrio entre histologia alterada e não alterada

Variável*	Histologia (cm ²)		p-valor [#]
	Alterada	Não Alterada	
Área do fragmento do endométrio	2,79±2,86	1,72±1,37	0,6532

* Valores expressos em média ± desvio padrão

p-valor calculado pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney

Conclusão – não houve diferença significativa da área média do fragmento do endométrio em relação ao diagnóstico de histologia alterada ou não (p = 0,6532).

As avaliações dos histologistas apresentaram concordância perfeita em relação a IHQ, ou seja, kappa = 1 em relação ao PTEN. (Tabela 5)

Tabela 5. Avaliação de concordância entre IHQ[#] 1 e IHQ 2 (PTEN)

		PTEN 2				Total
1	PTEN	0	1	2	3	
	0		3	0	0	0
		5.36	0.00	0.00	0.00	5.36
1		0	38	0	0	38
		0.00	67.86	0.00	0.00	67.86
2		0	0	13	0	13
		0.00	0.00	23.21	0.00	23.21
3		0	0	0	2	2
		0.00	0.00	0.00	3.57	3.57
Total		3	38	13	2	56
		5.36	67.86	23.21	3.57	100.00

Análise estatística de concordância entre os resultados de imuno-histoquímica[#] (IHQ) PTEN com intervalo de confiança de 95%. Kappa igual a 1.0.

Foi feita análise das variáveis como IMC, HAC, dias de sangramento, e espessura endometrial em relação às alterações de PTEN. Tanto na análise bivariada quanto na análise multivariada apenas a ocorrência de HAC se mostrou associada com a ocorrência de PTEN alterado. Mulheres com HAC apresentaram uma prevalência de 2,55 vezes maior de alteração de PTEN do que pacientes sem HAC, após o ajuste das demais variáveis ($p = 0,0380$) (Tabela 6).

Tabela 6. Razão de risco bruta e ajustada para a ocorrência de PTEN alterada por variáveis clínicas selecionadas (n = 45)

	Razão de Prevalência - RP (IC 95 %)			
	Bruta	p-valor	Ajustada	p-valor
IMC	1,02 (0,98; 1,06)	0,2553	1,00 (0,96; 1,05)	0,7 964
HAC		0,0187		0,0 380
Não	1	-	1	-
Sim	2,72 (1,18; 6,26)	0,0187	2,55 (1,05; 6,17)	0,0 380
Dias de Sangramento	1,00 (0,97; 1,03)	0,8200	1,01 (0,97; 1,04)	0,9 119
Espessura Endométrio	0,98 (0,93; 1,03)	0,4689	0,99 (0,94; 1,04)	0,6 416

a – Ajustada IMC, HAC, dias de sangramento e tamanho do endométrio

As histologias consideradas normais foram sem atipia e sem hiperplasia; em seguida o diagnóstico de hiperplasia sem atipia, depois hiperplasia com atipia (EIN) e por fim o diagnóstico de adenocarcinoma de endométrio, considerado o mais grave e patológico (Tabela 7).

Tabela 7. Associação entre resultados histológicos e PTEN

Histologia*	Código PTEN		
	Positivo	Null Cluster	Null Difuse
Sem atipia e sem hiperplasia ¹	33 (71,74)	13 (28,26)	0 (0,00)
Hiperplasia sem atipia	5 (100,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
Hiperplasia com atipia	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (100,00)

Adenocarcinoma de endométrio	0 (0,00)	0 (0,00)	1 (100,00)
------------------------------	----------	----------	------------

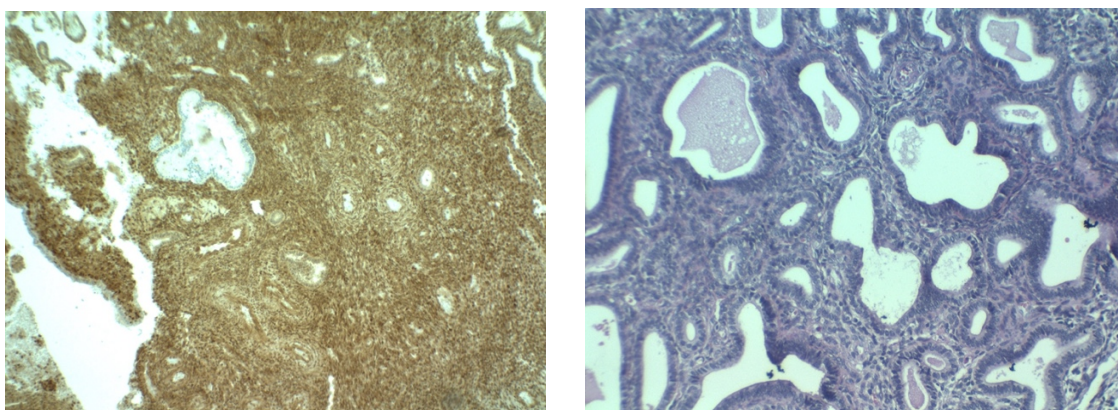
1 – Vide diagnósticos no apêndice 9.5

* Valores expressos em frequência (%) – Teste de Qui-quadrado de Cochran-Mantel e Haenszel para correlação (CMH) = 9,57; p-valor = 0,0076.

Existiu uma associação entre a gravidade da histologia e a gravidade do PTEN (CMH= 9,57; p = 0,0076), no sentido de que quanto maior a gravidade da histologia maior a gravidade do PTEN.

Seguem alguns exemplos de lâminas representando a imuno-histoquímica (IHQ) e coradas em HE (Hematoxilina-eosina)

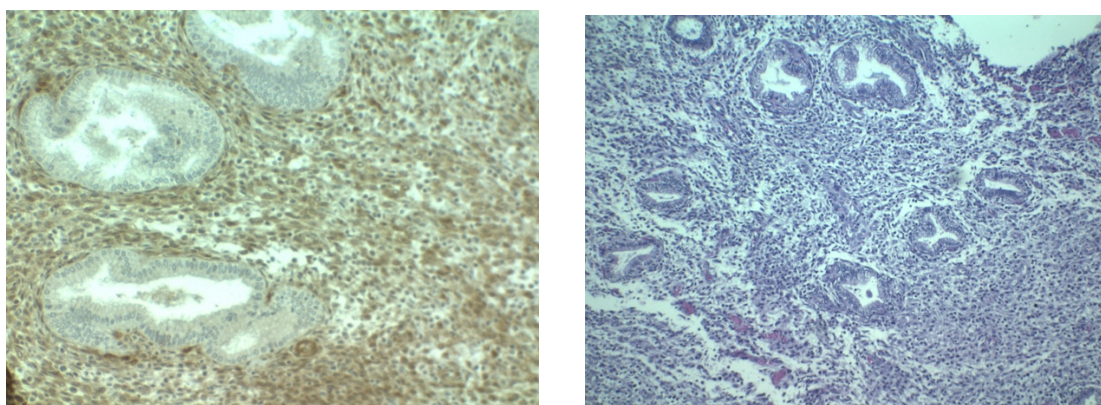
Figura 3. Endométrio IHQ e HE.



LÂMINA IHQ: Endométrio sem hiperplasia ou atipias. Perda focal, em um agrupamento de células epiteliais endometriais, da expressão de PTEN (PTEN null clusters) (Imunohistoquímica para PTEN, 200X).

LÂMINA HE: Endométrio sem hiperplasia ou atipias (HE 200X)

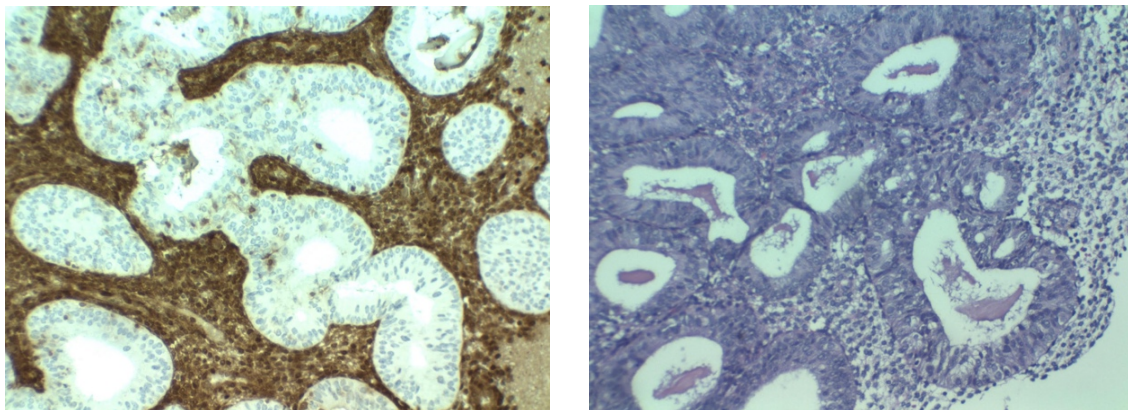
Figura 4. Endométrio IHQ e HE



LÂMINA IHQ Endométrio sem hiperplasia ou atipias. Perda focal, em agrupamentos, da expressão de PTEN (PTEN null clusters) pelas células epiteliais endometriais (Imunohistoquímica para PTEN, 200X)

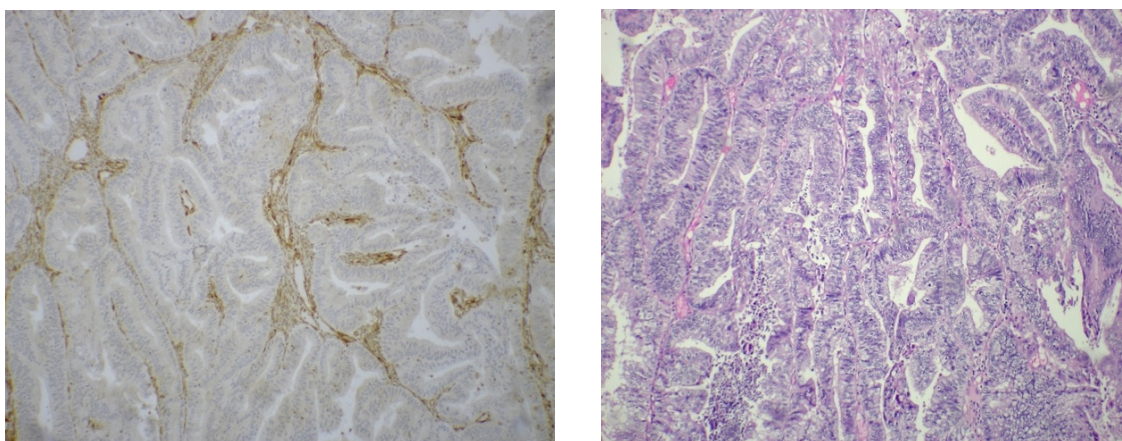
LÂMINA HE: Endométrio sem hiperplasia ou atipias (HE 100X).

Figura 5. Endométrio e IHQ e HE



LÂMINA IHQ: Hiperplasia endometrial com atipias. Perda difusa da expressão de PTEN (PTEN null diffuse) nas células neoplásicas (Imunohistoquímica para PTEN, 200X).
LÂMINA HE: Hiperplasia endometrial com atipias (HE 200X)

Figura 6. Endométrio IHQ e HE



Adenocarcinoma endometriode FIGO I, perda difusa de PTEN (100x)

Em relação às interleucinas, as figuras abaixo representam a distribuição dos resultados de forma semelhante dos valores médios de IL-10, TGF- β , TNF- α e IL-6 (Figura 7. TNF- α ; Figura 8. IL-6; Figura 9. TGF- β e Figura 10. IL-10).

Figura 7. TNF- α

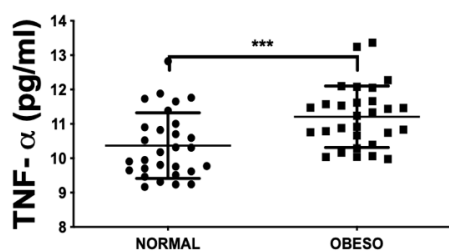


Figura 8. IL-6



Figura 9. TGF- β

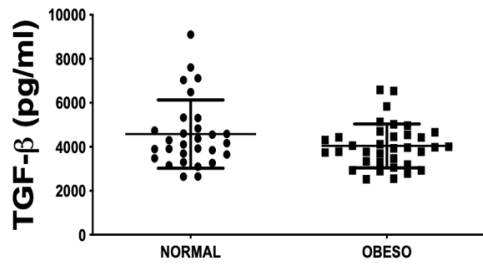
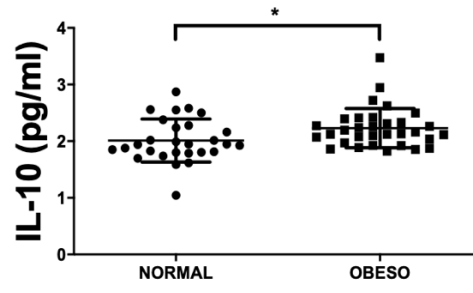


Figura 10. IL-10



6 DISCUSSÃO

O sangramento uterino anormal é uma queixa comum entre as mulheres durante consultas ginecológicas e contribui com boa parte das consultas devido as repercussões e prejuízos na qualidade de vida (PETRACCO; BADALOTTI; ARENT, 2009). Não obstante, existem grupos de mulheres, para as quais o sangramento uterino anormal e o espessamento endometrial podem estar associados a alterações endometriais pré-malignas ou malignas (MATSUO et al., 2015; SCHMANDT et al., 2011). Apesar das associações epidemiológicas, os mecanismos relacionando obesidade e o adenocarcinoma de endométrio do tipo endometrióide ainda não são completamente compreendidos mas, entre as associações estão o efeito proliferativo do excesso de estrogênio sem oposição da progesterona sobre o endométrio em mulheres no menacme anovulatórias (SOP) (CHARALAMPAKIS et al., 2016) e na menopausa a terapia hormonal (TH) e obesidade (fonte estrogênica) (O'ROURKE, 2014), a resistência à insulina (GARG et al., 2014; VUCENIK; JONES; MCLENITHAN, 2015) e o estado pró-inflamatório observado no excesso de tecido adiposo associados a síndrome metabólica e suas repercussões sobre o endométrio. O estudo de alguns destes fatores fez parte desta discussão.

Em relação a distribuição das mulheres em obesas (média de idade de $40,41 \pm 7,13$ anos) e não obesas, estas eram as mais velhas (média de idade de $47,47 \pm 8,58$ anos) com as idades variando entre 33 e 77 anos. Embora mais velhas, as mulheres não obesas não apresentaram hiperplasia com atipia ou carcinoma. O diagnóstico de câncer de endométrio ocorreu em uma mulher cuja medida do endométrio foi de 22 mm, apresentava sangramento menstrual por cerca de 30 dias seguidos, aos 51 anos e com IMC de 35,5. Por outro lado, a literatura apresenta como sendo a idade média para o aparecimento do câncer de endométrio de 63 anos. A maioria das pacientes apresenta idade entre 50 e 59 anos; cerca de 20% a 25% são diagnosticadas antes da menopausa, e entre estas, somente 5% estão abaixo dos 40 anos de idade (DISAIA, PHILLIP J., CRESMAN, 2018).

Segundo Cresman et al, alterações endometriais podem ser identificadas a partir da queixa de sangramento uterino anormal ou pelo espessamento endometrial diagnosticado através de ultrassom transvaginal realizado com o objetivo de investigar o endométrio (DERMAWAN et al., 2019) ou outras patologias relacionadas à consulta ginecológica (DISAIA, CRESMAN, 2018). A identificação de prováveis causas para o sangramento uterino anormal ou para o espessamento endometrial são fundamentais à conduta seguinte (AUCLAIR et al., 2019; MUNRO et al., 2011). Mulheres obesas, em geral, apresentam

comorbidades como hipertensão, diabete, isquemias miocárdicas, risco aumentado para tromboembolismo. Sendo assim, o risco-benefício da conduta terapêutica, clínica ou cirúrgica (SEIF; DIAMOND; NICKKHO-AMIRY, 2015) também deve ser bem avaliado.

Neste trabalho, o sangramento uterino anormal, em dias e volume de sangramento bem como a espessura do endométrio demonstraram associação com as alterações endometriais.

Estudos mostram que pacientes assintomáticas, candidatas a cirurgia bariátrica apresentaram 27,6% das biópsias realizadas com cureta de Pipelle com resultados alterados, e entre os diagnósticos estão hiperplasia, metaplasia ou pólipos (KAIYRLYKYZY et al., 2015). Em estudo recente, cerca de 15% das pacientes submetidas a biópsia de endométrio com resultados histológicos semelhantes apresentavam antecedentes de neoplasias de mama e cólon, e 26% com antecedentes de TH de duração variável. Entretanto, nem os fatores de risco aumentaram a probabilidade de as pacientes receberem novo acompanhamento nem de apresentarem a probabilidade de desenvolver atipias ou malignidade em amostras subsequentes (DERMAWAN et al., 2019). Entre o subconjunto de mulheres que receberam amostragem endometrial subsequente, apenas o IMC esteve significativamente relacionado à probabilidade de uma histologia de atipia endometrial ou malignidade.

Estudos anteriores demonstraram prevalência de 6,8% de hiperplasia ou câncer de endométrio em pacientes com IMC > 35 (ARGENTA et al., 2014). Viola et al. (2008) encontrou hiperplasia em 6,7% de mulheres obesas ou obesas assintomáticas, tanto na pré como pós-menopausa, submetidas à biópsia de Pipelle (VIOLA et al., 2008). Neste estudo, foram 56 diagnósticos histológicos em mulheres com queixa de sangramento uterino anormal e espessamento endometrial: 49 sem hiperplasia e sem atipias; 3 hiperplasias simples; uma hiperplasia com atipias e um adenocarcinoma endometrióide.

Por outro lado, o estímulo do endométrio pelo estrogênio sem o efeito de diferenciação da progesterona é um fator etiológico primário associado ao desenvolvimento de hiperplasia endometrial e adenocarcinoma (MATTHEWS, 2015; SEIF; DIAMOND; NICKKHO-AMIRY, 2015) Fontes endógenas (anovulação e *obesidade*) (ZHANG et al., 2010) e exógenas (terapia hormonal) sem oposição ao estrogênio aumentam o risco de carcinoma de endométrio (BERCHUCK; BOYD, 1995; LINKOV et al., 2014). Mulheres obesas apresentam produção extragonádica de estrogênios favorecendo o espessamento endometrial. Neste trabalho, trinta e cinco mulheres apresentaram IMC \geq 30 ao mesmo tempo em que apresentaram queixa de sangramento menstrual aumentado em dias, volume

e frequência (BENETTI-PINTO et al., 2017; MUNRO et al., 2011) corroborando com a possibilidade de alterações endometriais por aquela etiologia e entre elas o câncer de endométrio (BHASKARAN et al., 2014). Assim é que, para cada acréscimo no IMC, a prevalência de histologia alterada aumentou em 11%; para cada aumento em um dia de sangramento e para cada milímetro na espessura do endométrio, a prevalência de alterações endometriais aumentou em 13%.

Apesar da obesidade estar relacionada a síndrome metabólica, e a alterações como resistência à insulina, ao diabetes e ao ovário policístico, neste estudo não foi possível identificar esta associação pois não houve alterações endometriais em mulheres com DM e SOP provavelmente devido ao número de mulheres na amostra (FAIR; MONTGOMERY, 2009; ZHANG et al., 2010). Em relação a este aspecto, cabe salientar que as obesas eram também mais jovens, período em que ainda é pouco frequente o aparecimento de lesões endometriais ou câncer de endométrio, como já mencionado anteriormente (SANDERSON et al., 2017). Por outro lado, o sobrepeso, a obesidade e a síndrome metabólica oferecem um ambiente favorável ao desenvolvimento, progressão e recorrências de tumores tornando estas mulheres susceptíveis de desenvolver lesões endometriais ao longo do tempo (ANVEDEN et al., 2017; J., 2014; PARK et al., 2014)

Em relação as amostras de endométrio, existem trabalhos comparativos do tamanho do espécime mais adequado entre a biópsia aspirativa com cânula de Karmam, Pipelle e Endosampler entre outras, e neste trabalho, optou-se pela última em função da facilidade de aquisição, manuseio e quantidade aparente de material (ZUTSHI et al., 2018) bem como trabalhos que procuram estruturar a avaliação do espécime pelo patologista a fim de diminuir diagnósticos inadequados (BREIJER et al., 2016). As amostras coletadas e insuficientes para análise ocorreram em pacientes com muitos dias de sangramento e quando a coleta se deu próxima ao término deste. As amostras eram coletadas no momento da internação para cirurgia, de outra forma, como as mulheres apresentavam períodos prolongados de sangramento era mais difícil coletar as amostras dentro de um período mais adequado. Ou seja, as amostras endometriais eram coletas no melhor momento possível, mas não necessariamente no melhor período do ciclo. Na literatura, ainda existem controvérsias quanto aos critérios para se definir quando o espécime está adequado para o diagnóstico histológico (MCCLUGGAGE, 2006; PHILLIPS; MCCLUGGAGE, 2005) na medida em que diversos dispositivos de uso ambulatorial vem substituindo a internação com anestesia e curetagem semiótica, considerada anteriormente, padrão ouro. Outro aspecto considerado

em diversos estudos relativos à sensibilidade, especificidade e acurácia relacionam-se a fase de vida da mulher (menopausa ou não), ao diagnóstico encontrado e a habilidade na realização da biópsia pelo ginecologista. Ao contrário do que se espera, ainda existem falhas a serem vencidas quanto ao diagnóstico por biópsia de endométrio (VAN HANEGEM, N., PRINS, M.M.C., BONGERS, M.Y., OPMEER, B.C., SAHOTA, D.S., MOL, B.W.J., TIMMERMANS, 2016) e Reijnen et al propõe um valor mínimo de superfície endometrial de 35 mm² para valores preditivos positivo e negativos de 92,6% e 85,7%, respectivamente (REIJNEN et al., 2017). Não houve diferença significativa da área média do fragmento do endométrio em relação à histologia ($p = 0,6532$) na presença ($2,79 \pm 2,86$) ou ausência de alterações endometriais ($1,72 \pm 1,37$); neste trabalho a presença de endométrio alterado não modificou a quantidade de fragmento obtido.

O diagnóstico histológico foi dividido em 4 categoria (sem atipias e sem hiperplasia; hiperplasia sem atipias; hiperplasia com atipias/EIN e carcinoma de endométrio). Diagnósticos discordantes foram resolvidos através de consenso através de microscópio com múltiplas oculares.

Em seguida, foi avaliado o índice de concordância dos resultados de imunohistoquímica (IHQ). Neste caso, kappa foi igual a 1, isto é, 100 % de concordância entre os observadores. A IHQ em muitas patologias pode identificar a origem ou a linhagem celular que caracteriza a neoplasia maligna permitindo um tratamento adequado (KASPAR; CRUM, 2015). Em relação ao câncer de endométrio do tipo I, carcinoma endometrióide, 5 alterações moleculares já foram descritas e são a instabilidade microsatélite (MSI) e mutações no PTEN, K-ras, PIK3CA e β -caterina (LLAURADÓ et al., 2012). Tem sido proposto que a MSI seja precedida por alterações PTEN. Quando considerada isoladamente, a IHQ para PTEN continua a provocar visões conflitantes quando se trata de sua utilidade como biomarcador nas EH e seu valor como preditor de progressão de EH para EC. Mas sem dúvida, seu papel no processo de carcinogênese endometrial é ainda de grande importância e, portanto, a investigação sobre a inclusão de sua avaliação em qualquer "perfil" de biomarcador deve ser incentivada (SANDERSON et al., 2017).

Foi realizada IHQ para PTEN, uma vez que a inativação do gene supressor de tumor PTEN tem sido associada a neoplasia intra-epitelial (EIN) endometrial e ao desenvolvimento de adenocarcinoma de endométrio (GEORGESCU et al., 2016; WENHAM; BANSAL; YENDLURI, 2009).

Em relação ao PTEN e as variáveis avaliadas (IMC, HAC, espessura do endométrio, dias de sangramento), apenas a HAC mostrou-se como fator de risco para as anormalidades de PTEN de forma significativa. É possível que estes dados estejam relacionados a evolução de quadros ao longo do tempo pois idade, obesidade, síndrome metabólica e alterações endometriais com alterações da expressão de PTEN compõem o quadro de fatores de risco para o câncer de endométrio, isto é, a síndrome metabólica. No entanto, seriam necessárias mais análises com um grupo maior de mulheres para conclusões mais expressiva ao longo de um período maior de tempo. A inativação ou perda de PTEN é observada em 40% dos cânceres endometriais do tipo I(endometrióide). Juntamente com o IGF-1 circulante elevado (fator de crescimento I), a perda de PTEN promove a hiperatividade da via PI3K / AKT / mTOR (alterações nas vias de sinalização intracelular comuns à síndrome metabólica e obesidade) (JU et al., 2013; MATIAS-GUIU; PRAT, 2013) e facilita o crescimento do câncer endometrial em indivíduos obesos (MUTTER et al., 2014; ÖZDEMIR et al., 2015; SCHMANDT et al., 2011), isto é, pelas vias de proliferação celular dependentes do controle de várias kinases (AHMED FOUAD YOUSEF; AANEI, 2017; BARBERIS et al., 2016).

Trabalhos relatam que o carcinoma de endométrio do tipo I é sempre precedido em três ou quatro anos por um precursor geneticamente mutado, a neoplasia intraepithelial endometrial (EIN). Este precursor tem uma aparência histológica distinta que permite seu diagnóstico pelo patologista, entretanto a carcinogênese começou muito antes que qualquer lesão de EIN tenha começado a se desenvolver (MONTE et al., 2010). Por outro lado, somente as mutações no PTEN não são suficientes para causar a neoplasia de endométrio, pois 35 % da taxa de lesão latente definida como perda de PTEN é contrabalançada com um risco de 2,5% de câncer ao longo da vida. Fatores com a hiper-estimulação estrogênica sem oposição da progesterona (obesidade, SOP) contribuiriam para a perda da expressão de PTEN no tecido endometrial. A perda de PTEN em aglomerados de glândulas endometriais segue um padrão monoclonal, ou seja, essas células compartilham o mesmo status de expressão de PTEN. O clone de células que não expressam PTEN é designado como EIN (MUTTER, 2000; MUTTER et al., 2000) e está associado com a maior ocorrência de carcinoma endometrial através da transformação de suas células.

Segundo alguns autores, a hiperplasia atípica ou neoplasia intraepithelial endometrial (Figura 5) comporta a possibilidade de 25 a 59% de coexistência de câncer invasor (EMONS et al., 2015). Neste estudo houve correlação entre a gravidade da histologia e a gravidade do PTEN (CMH=9,57; $p = 0,0076$), no sentido de que quanto maior a gravidade da histologia

maior a alteração do PTEN (Figura 6, Adenocarcinoma endometriode FIGO I, perda difusa de PTEN (100x)).

Em relação ao processo inflamatório, foram possíveis algumas observações.

Muito mais que um local de armazenamento energético, considera-se o tecido adiposo como uma estrutura dinâmica, envolvida em muitos processos fisiológicos e metabólicos, que produz e libera uma grande variedade de peptídeos ativos conhecidos pelo nome genérico de adipocinas, que atuam exercendo efeitos endócrinos, parácrinos e autócrinos (PINTO, 2014; VACHHARAJANI; GRANGER, 2009). Além disso, expressa inúmeros receptores que lhe permite responder a sinais aferentes oriundos de órgãos endócrinos e também do sistema nervoso central os quais modulam diversos processos, que incluem apetite, gasto energético, imunidade e reação inflamatória bem como início, crescimento, progressão e recorrência de tumores malignos ou sua remissão (HEGMANS; AERTS, 2013; PARK et al., 2014).

O excesso de tecido adiposo leva a um processo disfuncional que produz níveis de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, juntamente com perfis alterados de adipocinas, suficientes para caracterizar um processo inflamatório crônico de baixa intensidade relacionado ao desenvolvimento da doença metabólica e de neoplasias malignas atribuídas à obesidade (HOTAMISLIGIL, 2017).

O microambiente tumoral é complexo e abrange várias vias de ativação para iniciação, promoção, manutenção e progressão das alterações tumorais (CALÌ; MOLON; VIOLA, 2017; KARKI; MAN; KANNEGANTI, 2017; LIN; ZHANG, 2017) Basicamente, entre as células do sistema imune (SI) inato e adaptativo recrutadas para o local do tumor, os macrófagos são particularmente abundantes e estão presentes em todos os estágios da progressão do tumor (NOY; POLLARD, 2014). Ou seja, tudo vai depender do fenótipo adquirido pelos macrófagos (M1, pró-inflamatórios e citotóxicos ou M2, responsáveis pela resolução da inflamação) (SOLINAS et al., 2009), que são metabolicamente ativos, influenciando as funções locais e sistêmicas pela secreção de uma grande diversidade de moléculas, como citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento.

Neste contexto, IL-10 e TGF-beta ao mesmo tempo em que são responsáveis pela resolução da inflamação, são também responsáveis pela progressão tumoral; por outro lado, TNF-alfa e IL-6, seriam responsáveis pela ação citotóxica sobre as células tumorais, mas estimulam a angiogênese e aumentam a invasão, motilidade e evasão de células tumorais

além de promover a disseminação, sobrevivência e crescimento de células tumorais. Cada uma dessas atividades está relacionada a uma subpopulação identificável de macrófagos bem como ao desenvolvimento de diferentes patologias e cânceres (LIN; ZHANG, 2017) . Os polimorfonucleares (PBMC) das quais fazem parte linfócitos, monócitos e macrófagos são importantes agentes na reação inflamatória. Os macrófagos em contato com células tumorais produzirão interleucinas e, a depender desta interação, a evolução da doença.

É importante ressaltar que, ao longo da evolução da neoplasia maligna, diferentes subconjuntos de células do SI, tanto dos compartimentos imunes inatos quanto nos adaptativos, alcançam o microambiente tumoral, exibindo funções opostas à medida que a lesão progride (CALÌ; MOLON; VIOLA, 2017; CORRÊA et al., 2017). A inflamação permeia todos os estágios da carcinogênese por diferentes vias de sinalização (KARKI; MAN; KANNEGANTI, 2017).

Neste sentido, este estudo procurou avaliar os valores de IL-10 e TGB-beta, como representantes do perfil anti-inflamatório, e de outro lado, IL-6 e TNF-alfa como representantes do processo inflamatório, em obesas (consideradas susceptíveis de apresentarem hiperplasias, EIN ou câncer de endométrio) e não obesas. Não houve diferença nos valores médios de interleucinas de pacientes obesas e não obesas (CORRÊA et al., 2017; GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010).

7 CONCLUSÃO

Mulheres que apresentam sangramento uterino anormal e espessamento endometrial apresentam alterações que necessitam ser investigadas especialmente naquelas cujo IMC está acima de 30.

Tanto homens como mulheres têm aumentado substancialmente de peso (IMC) em todas as faixas etárias, ao longo dos anos, e mais frequente também tem sido o aparecimento de câncer de endométrio do tipo I (endometrióide) em mulheres mais jovens, com sobrepeso ou obesas. Este trabalho permitiu identificar aspectos clínicos como dias de sangramento, espessura endometrial, alterações IHQ e alterações inflamatórias correlacionadas a alterações endometriais mais proeminentes em um grupo especialmente de risco, isto é, mulheres obesas comparando-as a não obesas, com sangramento uterino anormal e espessamento endometrial. Quanto mais dias de sangramento e mais espesso o endométrio, maiores as possibilidades de alterações endometriais.

Aparentemente, os diagnósticos histológicos foram possíveis a partir de biópsias ambulatoriais, quer existissem ou não alterações endometriais. A IHQ pôde fornecer informações complementares ao estudo histológico, principalmente ao demonstrar a perda difusa da expressão de PTEN em histologias de endométrio progressivamente mais alteradas em mulheres hipertensas.

A presença de processo inflamatório e alterações endometriais poderia vir a ser um bom marcador prognóstico e evolutivo destas alterações em mulheres obesas com sangramento uterino anormal e espessamento endometrial. Ao mesmo tempo, a compreensão dos mecanismos envolvidos no processo inflamatório poderia fornecer alvos para terapias mais eficazes para o controle da doença metabólica, da obesidade e do desenvolvimento de neoplasias a elas relacionadas. Neste trabalho, a distinção entre obesas e não obesas mostrou-se limitada provavelmente devido ao fato de incluir mulheres com IMC a partir de 30 como obesas e não 25, o que seria ideal.

Um estudo comparativo com maior número de mulheres poderia esclarecer e confirmar os aspectos estudados aqui (hipertensão arterial, obesidade, IMC, espessura do endométrio, dias de sangramento) e outros que possam estar relacionados a obesidade (como a síndrome metabólica), ao sangramento uterino anormal e espessamento endometrial, às alterações endometriais e ao processo inflamatório envolvidos na gênese de lesões pré-malignas e malignas de endométrio. Talvez este seja um modelo de estudo para compreensão de outros mecanismos envolvidos com o processo inflamatório e com neoplasias malignas

relacionadas à obesidade. Este estudo demonstrou que, para cada acréscimo de uma unidade no IMC ocorre uma alteração significativa na histologia, além dos dias de sangramento e espessura endometrial.

Não menos importante, parece ser a realização de biópsia endometrial em mulheres jovens com sangramento uterino anormal e espessamento endometrial com sobrepeso e obesas antes da instituição de tratamento, clínico ou cirúrgico, tendo em vista a possibilidade de diagnósticos de lesões potencialmente malignas (hiperplasia com atipia/ EIN) ou malignas. O tratamento destas alterações, EIN e lesões malignas, pode variar bastante; como as EIN são consideradas potencialmente malignas ou coexistem com neoplasias malignas, em alguns locais o tratamento é a histerectomia total radical sendo equiparada à neoplasia maligna.

A padronização do estudo do endométrio através de biópsias poderia ser realizada em situações como: mulheres com 40 anos ou mais, com sangramento uterino anormal e endométrio espessado (>16 mm em qualquer fase do ciclo) na ausência de alterações estruturais endometriais com IMC acima de 30 devido ao maior risco de câncer de endométrio; as demais indicações para a menopausa deveriam ser mantidas com maior atenção também para mulheres com IMC acima de 30.

É possível que, o controle da obesidade, a diminuição do processo inflamatório, e a investigação do endométrio minimizem o risco de alterações endometriais em mulheres com sangramento uterino anormal e espessamento endometrial. No entanto, os valores médios de IL-10, TGF-Beta, TNF-Alfa e IL-6 não foram significativamente diferentes entre mulheres obesas e não obesas. Assim, não foi possível correlacionar as alterações histológicas e IHQ com os valores encontrados de interleucinas.

8 REFERÊNCIAS

ANVEDEN, Å. et al. Long-term incidence of female-specific cancer after bariatric surgery or usual care in the Swedish Obese Subjects Study. **Gynecologic Oncology**, v. 145, n. 2, p. 224–229.

ARGENTA2014

BARROS, A. J. D.; HIRAKATA, V. N. Alternatives for logistic regression in cross-sectional studies: An empirical comparison of models that directly estimate the prevalence ratio. **BMC Medical Research Methodology**, v. 3, p. 1–13, 2003.

Barberis, I. et al. Hallmarks of cancer-the next generation. **Journal of Preventive Medicine**, v. 57, n. 1, p. 41-46, 2016.

BENETTI-PINTO, C. L. et al. Sangramento uterino anormal. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia**, v. 39, n. 7, p. 358–368, 2017.

BERCHUCK, Andrew; BOYD, Jeff. Molecular basis of endometrial cancer. **Cancer**, v. 76, S.10, p. 2034-2040, 1995.

BHASKARAN, K. et al. Body-mass index and risk of 22 specific cancers: A population-based cohort study of 5.24 million UK adults. **The Lancet**, v. 384, n. 9945, p. 755–765, 2014.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.

BREIJER, M. C. et al. A Structured assessment to decrease the amount of inconclusive endometrial biopsies in women with postmenopausal bleeding. **International Journal of Surgical Oncology**, v. 2016, p. 1–5, 2016.

CAIRO, A.; FONSECA, R.; SIMÕES, R. **Diretrizes Câncer de Endométrio 2012**. Brasil: FEBRASGO, 2012.

CALÌ, B.; MOLON, B.; VIOLA, A. Tuning cancer fate: the unremitting role of host immunity. **Open Biology**, v. 7, n. 4, 2017.

CHARALAMPAKIS, V. et al. Polycystic ovary syndrome and endometrial hyperplasia: an overview of the role of bariatric surgery in female fertility. **Eur J Obstet Gynecol and Reprod Biol**, v. 207, p. 220-226, 2016.

CORRÊA, L. H. et al. Adipocytes and macrophages interplay in the orchestration of tumor microenvironment: new implications in cancer progression. **Frontiers in**

Immunology, v. 8, n. SEP, p. 1–12, 2017.

DERMAWAN, J. K. T. et al. Thickened endometrium in postmenopausal women with an initial biopsy of limited, benign, surface endometrium. **International Journal of Gynecological Pathology**, v. 38, n. 4, p. 310–317, 2019.

DE PERGOLA, SILVESTRIS, 2013. Obesity as a major risk factor for cancer, **Journal of Obesity**, v. 2013, p. 1-11, 2013.

DIMETZ, T., GOMES, M. Interrelações entre SHBG e esteróides sexuais com medidas antropométricas, pressão arterial e lipídeos em mulheres com e sem diabetes mellitus tipo 2. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v.44, n.3, p. 239-47.

Deng, T et al. Obesity, inflammation and cancer. **Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis**, v.11, n. 1, p.421-449, 2016.

DISAIA, PHILIIP J., CRESMAN, W. T. **Clinical Gynecological Oncology**. 9 Ed. ed. Philadelphia, PA, United States: Elsevier Inc., 2018.

EMONS, G. et al. 2017-5-15 New WHO Classification of endometrial hyperplasias. **Geburtshilfe Frauenheilkd. Feb**, v. 75, n. 2, p. 135–136, 2015.

FAIR, A. M.; MONTGOMERY, K. Energy balance, physical activity, and cancer risk. **Methods in Molecular Biology**, v. 472, p. 57-88, 2009.

GARG, S. K. et al. Diabetes and cancer: two diseases with obesity as a common risk factor. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 16, p. 97–110, 2014.

GEORGESCU, T. A. et al. Histopathological, immunohistochemical and therapeutical assessment of premalignant endometrial lesions in a hospital based series of cases. **Maedica - a Journal of Clinical Medicine Maedica**, v. 11, n. 2, p. 115–121, 2016.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883–899, 2010.

GUPTA, A.; DESAI, A.; BHATT, S. Imaging of the endometrium: Physiologic changes and diseases. **Radiographics**, v. 37, n. 7, p. 2206–2207, 2017.

HEGMANS, J. P. J. J.; AERTS, J. G. J. V. Immunomodulation in cancer. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 17, p. 17–21, 2013.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders. **Nature**, v. 542, n. 7640, p. 177–185, 2017.

JU, Z. et al. PTEN loss as a context-dependent determinant of patient outcomes in obese and non-obese endometrioid endometrial cancer patients. **Journal of Clinical Oncology**, v. 31, n. 15, p. 1–10, 2013.

KARKI, R.; MAN, S. M.; KANNEGANTI, T.-D. Inflammasomes and cancer. **Cancer Immunology Research**, v. 5, n. 2, p. 94–99, 2017.

KAIYRLYKYZY et al. Endometrial histology in severely obese bariatric surgery candidates: an exploratory analysis. **Surgery for Obesity and Related Diseases**, v.11, n.3 , p. 653-658, 2015.

KASE, NATHAN G., WEINGGOLD, A. B. **Ginecologia Clínica**. Rio de Janeiro, RJ, Brasil: s.n., p. 69-92 , 1987.

KASPAR, H. G.; CRUM, C. P. The utility of immunohistochemistry in the differential diagnosis of gynecologic disorders. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 139, n. 1, p. 39–54, 2015.

KIM, M.; KIM, J.; KIM, S. Endometrial evaluation with transvaginal ultrasonography for the screening of endometrial hyperplasia or cancer in premenopausal and perimenopausal women. **Obstet Gynecol Sci**, v. 59, n. 3, p. 192, 2016.

KING, A. E.; CRITCHLEY, H. O. D. Oestrogen and progesterone regulation of inflammatory processes in the human endometrium. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 120, n. 2–3, p. 116–126, 2010.

LEE, C. H. et al. Obesity, adipokines and cancer: an update. **Clinical Endocrinology**, v. 83, n. 2, p. 147–156, 2015.

LIN, C.; ZHANG, J. Inflammasomes in inflammation-induced cancer. **Frontiers in Immunology**, v.8, n. mar., p. 1-22, 2017.

FAINA, L. et al. Bariatric surgery-induced weight loss changes immune markers in the endometrium of morbidly obese women. **Surg Obes Relat Dis**, v.10, p. 921-926, 2014.

LLAURADÓ, M. et al. Molecular bases of endometrial cancer: new roles for new actors in the diagnosis and the therapy of the disease. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 358, n. 2, p. 244–255, 2012.

MAACHI, M. et al. Systemic low-grade inflammation is related to both circulating and adipose tissue TNF α , leptin and IL-6 levels in obese women. **International Journal of Obesity**, v.24, n.8, p. 993-997, 2004.

MACKINTOSH ML, DERBYSHIRE AE, MCVEY RJ, B. J. The impact of obesity and bariatric surgery on circulating and tissue biomarkers of endometrial cancer risk.pdf. **Int J Cancer**, v. 144, n. 3, p. 641–650, 2019.

MADHRA, M. et al. Abnormal uterine bleeding: Advantages of formal classification to patients, clinicians and researchers. **Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica**, v.

93, n. 7, p. 619–625, 2014.

MARUYAMA, T.; YOSHIMURA, Y. Molecular and cellular mechanisms for differentiation and regeneration of the uterine endometrium. **Endocrine Journal**, v. 55, n. 5, p. 795–810, 2008.

MATIAS-GUIU, X.; PRAT, J. Molecular pathology of endometrial cancer. **Histopathology**, v. 62, p. 111-123, 2013.

MATSUO, K. et al. Prediction of concurrent endometrial carcinoma in women with endometrial hyperplasia. **Gynecologic Oncology**, v. 139, n. 2, p. 261–7, 2015.

MATTHEWS, M. Abnormal Uterine Bleeding in reproductive-aged women. **Obstet gynecol Clin N Am**, v.41, n. 1, p 103-115, 2014.

MCCLUGGAGE, W. G. My approach to the interpretation of endometrial biopsies and curettings. **Journal of Clinical Pathology**, v. 59, n. 8, p. 801–812, 2006.

MONTE, N. M. et al. Joint loss of PAX2 and PTEN expression in endometrial precancers and cancer. **Cancer Research**, v. 70, n. 15, p. 6225–6232, 2010.

MUNRO, M. G. et al. FIGO classification system (PALM-COEIN) for causes of abnormal uterine bleeding in nongravid women of reproductive age. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**, v. 113, n. 1, p. 3–13, 2011.

MUTTER, G. L. et al. Endometrial precancer diagnosis by histopathology, clonal analysis, and computerized morphometry. **Journal of Pathology**, v. 190, n. 4, p. 462–469, 2000.

MUTTER, G. L. Altered PTEN Expression as a diagnostic marker for the earliest endometrial precancers. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 92, n. 11, p. 924–930, 2000.

MUTTER, G. L. et al. Emergence, involution, and progression to carcinoma of mutant clones in normal endometrial tissues. **Cancer Research**, v. 74, n. 10, p. 2796–2802, 2014.

NALABOFF, K. M.; PELLERITO, J. S.; BEN-LEVI, E. Imaging the endometrium: disease and normal variants. **RadioGraphics**, v. 21, n. 6, p. 1409–1424, 2001.

NOY, R.; POLLARD, J. W. Tumor-Associated Macrophages: from mechanisms to therapy. **Immunity**, V. 41, n. 1, p. 49-61, 2014.

O'ROURKE, R. W. Endometrial hyperplasia, endometrial cancer, and obesity: convergent mechanisms regulating energy homeostasis and cellular proliferation. **Surgery for Obesity and Related Diseases**, v. 10, n. 5, p. 926–928, 2014.

ÖZDEMİR, S. et al. Relation of metabolic syndrome with endometrial pathologies in patients with abnormal uterine bleeding. **Gynecological Endocrinology**, v. 31, n. 9, p. 725–729, 2015.

PARIS, M. T. Body composition analysis of computed tomography scans in clinical populations: the role of deep learning. **Lifestyle Genomics**, p. 1-4, 2019.

PARK, J. et al. Obesity and cancer - mechanisms underlying tumour progression and recurrence. **Nature Reviews Endocrinology**, v.10, n.8, p. 455-465, 2014.

PETRACCO, A.; BADALOTTI, M.; ARENT, A. Sangramento uterino anormal. **Femina**, v. 37, n. 7, p. 389–394, 2009.

PHILLIPS, V.; MCCLUGGAGE, W. G. Results of a questionnaire regarding criteria for adequacy of endometrial biopsies. **Journal of Clinical Pathology**, v. 58, n. 4, p. 417–419, 2005.

PINTO, W. D. J. A função endócrina do tecido adiposo. **Rev. Fac. Ciências Méd. Sorocaba**, v. 16, n. 3, p. 111–120, 2014.

RAUCCI, R. et al. Cytokine functional and structural features of adipokine family. **Cytokine**, v. 61, n. 1, p. 1–14, 2013.

RENEHAN Andrew G., Zvahlen, M., Egger, M. Adiposity and cancer risk: New mechanistic insights from epidemiology. **Nature Reviews Cancer**, v. 15, n. 8, p. 484-498, 2015.

REIJNEN, C. et al. Diagnostic accuracy of endometrial biopsy in relation to the amount of tissue. **J Clin Pathol**, v. 70, n. 11, p. 1–6, 2017.

RIŽNER, T. L. Estrogen biosynthesis, phase I and phase II metabolism, and action in endometrial cancer. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 381, n. 1–2, p. 124–139, 2013.

SÁNCHEZ R., C.; IBÁÑEZ, C.; KLAASSEN, J. Obesidad y cáncer: La tormenta perfecta. **Revista Medica de Chile**, v. 142, p. 211–221, 2014.

SANDERSON, P. A. et al. New concepts for an old problem: The diagnosis of endometrial hyperplasia. **Human Reproduction Update**, v. 23, n. 2, p. 232–254, 2017.

SCHMANDT, R. E. et al. Understanding obesity and endometrial cancer risk: opportunities for prevention. **Am. J. Obstet. Gynecol**, v. 205, n. 6, p. 518–25, Dec. 2011.

SCHOR,N et al. **Bases moleculares da ginecologia**. São Paulo. Ed. Atheneu, p. 1-97, 2004.

SEIF, M. W.; DIAMOND, K.; NICKKHO-AMIRY, M. Obesity and menstrual

disorders. **Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v. 29, n. 4, p. 516–527, 2015.

SOLINAS, G. et al. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 86, n. 5, p. 1065–1073, 2009.

SORISKY, A.; MOLGAT, A. S. D.; GAGNON, A. Macrophage-induced adipose tissue dysfunction and the preadipocyte: should I stay (and differentiate) or should I go? **Advances in Nutrition: An International Review Journal**, v. 4, n. 1, p. 67–75, 2013.

STEIN, JENNIFER H. , RUTKOWSKI JOSEPH M., SCHERER, P. E. Adiponectin, leptin, and fatty acids in the maintenance of metabolic homeostasis through adipose tissue crosstalk. **Cell Metab.**, v. 23, n. 5, p. 770–784, 2016.

STRUFALDI, R. **Guia Prático de Menorragia Sangramento Uterino Anormal**. 2014/2015 ed. São Paulo, Brasil: Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia, 2014.

THWE, P. M.; AMIEL, E. The role of nitric oxide in metabolic regulation of dendritic cell immune function. **Cancer Letters**, v. 412, p. 236–242, 2018.

TRAYHURN, P. Hypoxia and Adipose tissue function and dysfunction in obesity. **Physiological Reviews**, v. 93, n. 1, p. 1-21, 2013.

VACHHARAJANI, V.; GRANGER, D. N. Adipose tissue: A motor for the inflammation associated with obesity. **IUBMB Life**, v. 61, n. 4, p. 424-430, 2009.

VAN HANEGEM, N., PRINS, M.M.C., BONGERS, M.Y., OPMEER, B.C., SAHOTA, D.S., MOL, B.W.J., TIMMERMANS, A. The accuracy of endometrial sampling in women with postmenopausal bleeding: A systematic review and meta-analysis. **European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology**, v. 197, n. 1, p. 147–155, 2016.

VIOLA, A. S. et al. 2008 Prevalence of endometrial cancer and hyperplasia in non-symptomatic overweight and obese women. **Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 48, n. 2, p. 207-213, 2008.

VUCENIK, I., JONES, L.P., McLENITHAN, J.C. Linking obesity, metabolism and cancer. **Metabolic Syndrome**, Springer International Publishing Switzerland, p. 1-21, 2015.

WENHAM, R.; BANSAL, N.; YENDLURI, V. The molecular biology of endometrial cancers and the implications for pathogenesis, classification, and targeted

therapies. **Cancer control**, v. 16, n. 1, p. 8–13, 2009.

XU, J. et al. Systematic review and meta-analysis on the association between IL-1B polymorphisms and cancer risk. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, 2013.

YOUSEF, A.F. ; AANEI, C. Revisiting the Hallmarks of Cancer. **Am J Cancer Res**, v. 7, n. 5, p. 1016-1036, 2017.

ZHANG, Y. et al. The association between metabolic abnormality and endometrial cancer: a large case-control study in China. **Gynecologic oncology**, v. 117, n. 1, p. 41–6, Apr. 2010.

ZUTSHI, V. et al. Office endometrial sampling: a comparison between Endosampler and Karman cannula number 4. **International Journal of Reproduction, Contraception, Obstetrics and Gynecology**, v. 7, n. 10, p. 3965, 26 Sep. 2018.

9 APÊNDICES

9.1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE

A Senhora está sendo convidada a participar do projeto: “Avaliação clínica, histológica e molecular do endométrio de pacientes com obesidade mórbida no menacme e sangramento uterino anormal/ espessamento endometrial antes e após a realização de cirurgia bariátrica”.

O nosso objetivo é avaliar a relação entre sangramento uterino anormal/ espessamento endometrial, perfil de citocinas/quimiocinas e o risco de câncer uterino em mulheres obesas antes e após perda de peso induzida por cirurgia bariátrica. A senhora receberá todos os esclarecimentos necessários antes e no decorrer da pesquisa e lhe asseguramos que seu nome não aparecerá sendo mantido o mais rigoroso sigilo através da omissão total de quaisquer informações que permitam identificá-la.

A sua participação será através de um questionário que você deverá responder no ambulatório de cirurgia bariátrica ou ginecologia em data combinada com um tempo estimado para seu preenchimento de 30 minutos. Não existe obrigatoriamente, um tempo pré-determinado, para responder o questionário. Será respeitado o tempo de cada uma para respondê-lo. Informamos que a Senhora pode se recusar a responder qualquer questão que lhe traga constrangimento, podendo desistir de participar da pesquisa em qualquer momento sem nenhum prejuízo para a senhora.

Os resultados da pesquisa serão divulgados aqui no Setor Ambulatório de Ginecologia Oncológica e na Ambulatório de Cirurgia podendo ser publicados posteriormente. Os dados e materiais utilizados na pesquisa ficarão sobre a guarda da pesquisadora Mirian Helena Hoeschl Abreu.

Se a Senhora tiver qualquer dúvida em relação à pesquisa, por favor telefone para: Dr. (a). Mirian Hoeschl, no Hospital Regional da Asa Norte/ Ambulatório de Ginecologia Oncológica. Telefone: 99939-1866, todas as segundas-feiras entre 8 – 11 horas pessoalmente ou em horário comercial pelo celular.

Este projeto foi Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da SES/DF. As dúvidas com relação à assinatura do TCLE ou os direitos do sujeito da pesquisa podem ser obtidas através do telefone: (61) 3325-4955.

Este documento foi elaborado em duas vias, uma ficará com o pesquisador responsável e a outra com o sujeito da pesquisa.

Nome / assinatura:

Pesquisador Responsável

Mirian Helena Hoeschl Abreu

Brasília, ___ de _____ de _____

9.2 Questionário Sócio Demográfico

Data do questionário: _____ Número do questionário: _____

Cirurgia Proposta: _____

Data da cirurgia: _____ Prontuário: _____

Nome: _____ DN: _____

Qual sua altura? _____ Qual seu peso atual: _____

Qual você considera a sua raça?

- (1) Branca
- (2) Parda
- (3) Preta
- (4) Amarela
- (5) Indígena
- (6) Sem identificação

Até que série estudou?

Qual a sua ocupação/ profissão?

Qual a sua renda familiar?

Quantas gestações:

G () PN () PC () A ()

Idade da primeira menstruação:

Data da última menstruação:

Qual método contraceptivo:

Qual o volume de sangramento:

Fluxo menstrual	
1	Discreto
2	Normal
3	Intenso

Dias e intervalo de sangramento:

ECO ___/___/___: volume uterino _____

Endométrio: _____

Você tem algum problema de saúde?

- (1) Diabetes
- (2) Pressão alta
- (3) Asma
- (4) Doença cardíaca
- (5) Ovário policístico
- (6) Câncer

Tipos de câncer:

Você fuma ou já fumou?

- (1) Nunca
- (2) Antecedentes
- (3) Atual
- (4) Não respondeu

Quantos cigarros por dia? _____

Há quanto tempo? _____

Assinatura/nome:

Email

9.3 Carta Convite

Convite para participar em pesquisa científica dentro do programa de Doutorado/UnB em Patologia Molecular/ 1º 2015

Vimos por meio deste, convidar o **Laboratório Lâmina** a participar da pesquisa **“Avaliação clínica, histológica e molecular do endométrio de pacientes com obesidade mórbida no menacme e sangramento uterino anormal/ espessamento endometrial antes e após a realização de cirurgia bariátrica”**, de responsabilidade da pesquisadora Mirian Helena Hoeschl Abreu Macedo, com a finalidade de investigar qual o melhor momento e qual a melhor abordagem para pacientes com sangramentos uterinos anormais e com obesidade mórbida, após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde/FEPECS-DF, em pacientes e/ou servidores da SES/DF, com previsão de início Junho/Julho/2015.

O estudo envolve:

- (X) realização de entrevistas;
- (...) administração de medicamentos;
- (X) procedimentos clínicos ou cirúrgicos;
- (X) exames laboratoriais ou de imagem;
- (X) pesquisa em prontuários;
- (X) outro: seguimento a curto e médio prazo

O pesquisador responsável informa que o projeto de pesquisa está sendo analisado pelo CEP da Instituição Proponente HRAN/ Ginecologia e Obstetrícia e está ciente que as etapas do estudo envolvendo a SES-DF ou Entidades Vinculadas, somente poderão ser iniciadas após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde/FEPECS-DF.

Em anexo, enviamos um resumo do projeto.

Aguardando manifestação.

Atenciosamente,

Brasília, 18 de junho de 2015.

Mirian Hoeschl

CRM 8899 DF

Ambulatório de Oncologia Ginecológica

HRAN sala 9

Pesquisadora responsável

9. 4 Proposta de participação/colaboração do Patologista

Proposta de participação/colaboração do Patologista:

- 1) Estima-se que participem da pesquisa cerca de 150 pacientes num período de 2 anos
- 2) Pretende-se realizar avaliações de amostras de fragmentos de endométrio, antes e após a perda de peso
- 3) Pretende-se que as amostras sejam avaliadas por dois patologistas
- 4) Pretende-se que a descrição e diagnóstico do material avaliado siga a classificação de Neoplasia Intra-epitelial Endometrial para fins de uniformização da avaliação pelos patologistas

Qualquer sugestão a esta proposta será bem recebida a fim de melhorar e assegurar a qualidade do Projeto de Doutorado.

Os patologistas poderão compor a relação de pesquisadores e colaboradores quando da publicação do Artigo de Revista.

Contato:

Mirian Hoeschl

Celular 99969-4656

E-mail: mirianhoeschl@gmail.com

9. 5 Diagnósticos histológicos

Diagnósticos histológicos	
Endométrio secretor	18
Endometrite	10
Endométrio atrófico	2
Pólipo	2
Endométrio proliferativo	13
Hiperplasia benigna	5
hiperplasia atípica	1
Câncer	1
Outros	4
Total	56

10 ANEXOS

10.1 Protocolo de coleta de sangue

Critérios e normas observados:

Norma Técnica de Biossegurança para Laboratórios de Saúde Pública

Portaria GM/MS nº 3.204, de 20/10/2010

CARTILHA DE SERVIÇOS LABORATORIAIS

Análises, ensaios, diagnósticos e fluxos

1ª edição Brasília – DF Julho/2015

SESDF, LACEN

- 1) Preparo do material a ser utilizado
 - a. 5 tubos de polietileno de 4,5 ml com EDTA, tampa roxa, previamente identificado com nome, data de nascimento e número de acordo com a sequência da pesquisa (sigla LOB 01, LOB 02*...)
 - b. Agulhas 25 x 7, algodão com álcool 70%, luvas, garrote, EPI
 - c. Caixa para acomodar as amostras no transporte
- 2) Identificação da paciente de acordo com o protocolo da pesquisa: assinatura do TCLE, critérios de inclusão.
- 3) Coleta de 20 ml de sangue total periférico (venoso) pós-consentimento e preenchimento do Questionário Auto-responsivo

*LOB: Laboratório de Obesidade

10.2 Protocolo de coleta de amostra de endométrio

- 1) Preparo do material a ser utilizado
 - a. Sonda Endosampler
 - ✓Espéculo, pinça Cheron, gaze, PVPI
 - ✓Pinça Pozzy
 - ✓Luvas estéril
 - ✓EPI
- 2) Identificação da paciente de acordo com o protocolo da pesquisa: assinatura do TCLE, critérios de inclusão.
- 3) Identificação dos frascos:
 - a. Criotubos
 - ✓Amostra de endométrio armazenada em 4,0 ml de formal a 3,7%
 - ✓Amostra de endométrio armazenada em criotubo a fresco: estocada em -80°C
 - b. Coleta de endométrio por aspiração endometrial e fracionamento do material em duas amostras semelhantes

10.3 Transporte das amostras até o acondicionamento nos laboratórios

Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA 2015. Pg 6, 22, 23, 25 a 27.

II – Amostras de pacientes: aquelas coletadas diretamente de seres humanos, incluindo (mas não se restringindo a) excreção, secreção, sangue e seus componentes, tecidos e amostras de fluidos, e partes do corpo a serem transportadas para fins de pesquisa, diagnóstico, investigação, tratamento e prevenção de doenças.

Classificação do material transportado segundo ANTT

Nesta categoria se inserem os materiais biológicos provenientes de indivíduos que foram submetidos a juízo profissional baseado em história clínica, sintomas e características individuais, bem como nas condições epidemiológicas locais que asseguram a probabilidade mínima de o material biológico conter microrganismos patogênicos, mesmo que esses materiais não tenham sido submetidos previamente a testes laboratoriais para marcadores de doenças transmissíveis. Esta classificação está definida nas diretrizes da OMS. Na Austrália, este material tem sido nomeado de categoria C ou também *exempt human specimen*.

Estes materiais biológicos não são considerados substâncias infecciosas, ou seja, não são artigos perigosos para fins de regulamentação de transporte.

10.4 Sangue venoso e endométrio

- 1) O transporte cuidadoso das amostras de sangue e tecido imediatamente após cada coleta. Para o transporte destes materiais: caixas resistentes à ação de desinfetantes químicos. Posição do material durante o transporte que evite derramamentos e desinfecção diariamente.
 - a. Posicionamento adequado dos tubos com amostra de sangue e criotubos para evitar acidentes no transporte
 - Caixas resistentes com acomodação do material (tecido endometrial e amostras de sangue)
 - b. Material acomodado na vertical: criotubos (tecido) ou tubos com EDTA (sangue venoso)
- 2) As amostras acondicionadas de maneira apropriada para assegurar a integridade dos materiais enviados e minimizar o risco potencial de danos durante o seu transporte.
- 3) Recipiente primário: resfriado com gelo
 - a. Recipiente a prova de vazamento, etiquetado
 - b. Fechamento das tampas com rosca
 - i. Criotubo contendo endométrio, ou tubos com amostra sanguínea com EDTA
- 4) Embalagem externa
 - a. Caixa de transporte de fácil manejo e resistente a temperatura e umidade
 - b. Identificação externa do material transportado: etiqueta

10.5 Separação sangue e plasma

- Procedimento estéril realizar todos as etapas no fluxo

- 1- Coletar 20 ml de sangue venoso total
- 2- Centrifugar os 20 ml de sangue com EDTA por 10 minutos a temperatura ambiente
- 3- Coletar o plasma e aliquotar em criotubos – máximo 2 ml por tubo, rotular e estocar a -80°C .

Universidade de Brasília

Laboratório de Imunologia e Inflamação – LIM I

Telefones: (61) 3107 – 3103/ 3107-3099

www.limiunb.com.br

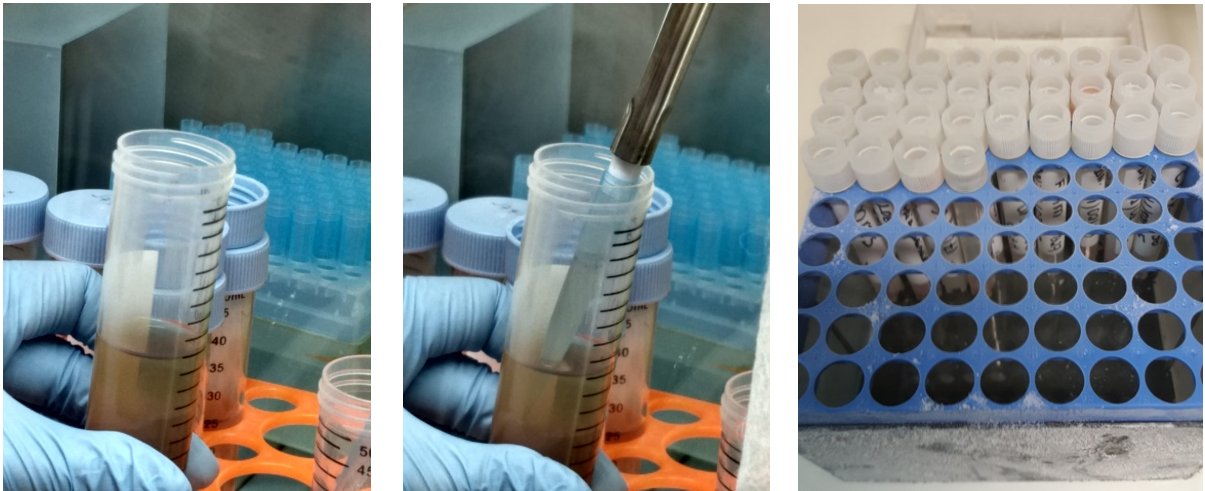
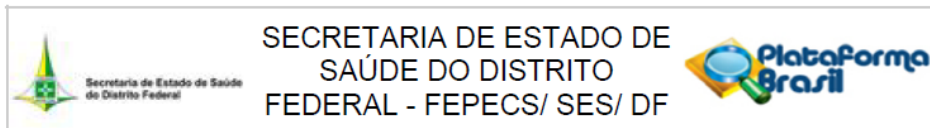


Figura 11. Amostras de sangue periférico coletadas, preparadas e estocadas em -80C

Fonte: Imagens próprias feitas em laboratório, 2017-2018.

10.6 Aprovação do Comitê de Ética - Plataforma Brasil



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Avaliação clínica, histológica e molecular do endométrio de pacientes com obesidade mórbida no menacme e sangramento uterino anormal/espessamento endometrial antes e após a realização de cirurgia bariátrica.

Pesquisador: Mirian Helena Hoeschl Abreu

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 45796515.3.0000.5553

Instituição Proponente: DISTRITO FEDERAL SECRETARIA DE SAUDE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.757.425

11. COLABORADORES

Dunya Bachour Basilio, médica patologista e citopatologista da Secretaria de Estado do Distrito Federal, que contribuiu com sugestões e observações quanto ao processamento de amostras histológicas.

Marcos Segura, médico patologista e citopatologista do laboratório Lâmina, realizou os exames histopatológicos e IHQ.

Melissa Vita, médica citopatologista, da Secretaria de Estado do Distrito Federal, realizou a leitura e revisão de histologia e IHQ.

Nabyla Paixão Pereira, Lorena Pereira de Andrade, Karen Letícia Rodrigues de Paiva (preparo e armazenamento), Luis Henrique Costa Corrêa (realização do ELISA) que participaram do processamento de amostras sanguíneas.

12. CONFLITO DE INTERESSE

Os autores informam que não há conflitos de interesse.