

A expressão da proteína p 27 em leiomioma e miométrio adjacente de mulheres com leiomiomatose uterina

The p27 protein expression in leiomyomas and adjacent myometrium in women with uterin leiomyomatosis

Vânia de Almeida¹, Sheldon Rodrigo Botogowski², Sônia Maria Rolim Rosa Lima³, Aline Daniele Conte⁴,
Cristina Sandri Rossato⁴, Luciana Maestri Karoleski⁴, Marco Fiorese Benites⁴

Resumo

Objetivo: Verificar a presença da proteína p27 no leiomioma uterino e no miométrio adjacente. **Método:** foram incluídas nesse estudo prospectivo, randomizado, estratificado, 35 mulheres, em idade reprodutiva, recrutadas no Ambulatório de Ginecologia do Hospital Santa Casa de Curitiba, entre os anos 2009 a 2010. As mulheres foram previamente avaliadas pela história clínica, exame físico, e ultrassonografia transvaginal, sendo submetidas à histerectomia total abdominal, após falha no tratamento clínico. O estudo da expressão da proteína p27 foi realizado pelo método imunohistoquímico e a análise estatística foi obtida através de médias dos dados colhidos. **Resultado:** encontramos que a média de idade foi 45 anos, sendo a raça branca predominante e com sobrepeso. O volume uterino médio foi de 284,45cm³ com miométrio de eco textura heterogêneo. A localização do mioma mais encontrado foi submucoso (30%) e com tamanho médio de 4,37cm. Através do nosso estudo encontramos que a proteína p27 esta fortemente presente no miométrio (73,33%), já no leiomioma a sua expressão é menor (43,33%). **Conclusão:** a proteína p27 esteve mais expressa no miométrio adjacente do que no leiomioma uterino.

Descritores: Inibidor de quinase dependente de ciclina p27, Leiomioma, Miométrio, Ciclo celular

Abstract

Purpose: Verify the presence of p27 protein in uterine leiomyoma and adjacent myometrium. **Method:** in this prospective randomized stratified study were included 35 women of reproductive age recruited at the Clinic of Gynecology, Santa Casa de Curitiba Hospital, between the years 2009 to 2010. Women were previously assessed by clinical history, physical examination and transvaginal ultrasound and underwent total abdominal hysterectomy, after clinical treatment failure. The study of expression of p27 protein was performed by immunohistochemistry and statistical analysis was obtained using the average of data collected. **Result:** the average age was 45 years, with a predominantly Caucasian and overweight. The mean uterine volume was 284.45cm³ with heterogeneous echo texture of the myometrium. The location of the fibroid was the most common submucosal (30%) and average size of 4.37cm. Through our study, we found that the p27 protein is strongly present in the myometrium (73.33%); since its expression in leiomyoma is lower (43.33%). **Conclusion:** the p27 protein was expressed in more than adjacent myometrium in uterine leiomyoma.

Keywords: Cyclin-dependent kinase inhibitor p27, Leiomyoma, Myometrium, Cell cycle

Introdução

Leiomiomas são tumores benignos, frequentes na idade reprodutiva e formados por células de origem miometrial e contém quantidade variável de tecido conjuntivo fibroso. Os achados de ultrassom demonstram uma variabilidade de 30%, ao redor dos 35 anos de idade e de 80%, ao redor dos 50 anos de idade⁽¹⁾. Os fatores de risco são raça negra, menarca antes dos 11 anos de idade, historia familiar que apresenta antecedente de leiomioma em parentes de primeiro grau e índice de massa corporal (IMC) maior que 30 kg/m².⁽²⁾

Os sintomas são relacionados diretamente ao

1. Médica Residente do Serviço de Ginecologia da Santa Casa de Curitiba – Aliança Saúde – Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR)

2. Professor Adjunto do Departamento de Tocoginecologia da Universidade Federal do Paraná e Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR)

3. Professor Adjunto da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo – Departamento de Obstetrícia e Ginecologia

4. Alunos do Curso de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR)

Trabalho realizado: Serviço de Ginecologia – Santa Casa de Curitiba – Aliança Saúde – Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR)

Endereço para correspondência: Sheldon Rodrigo Botogowski. Santa Casa de Curitiba – Sala de Ginecologia. Rua André de Barros, 694 – Centro – 80010-030 – Curitiba – PR – Brasil. E-mail: sheldon@centroeuropeu.com.br

tamanho, ao número e a localização dos miomas e sua transformação maligna, se houver, é evento extremamente raro⁽³⁾.

Sua etiopatogenia ainda não é completamente conhecida. O desenvolvimento e o crescimento dos leiomiomas resultam de complexa interação entre os hormônios esteroides, fatores de crescimento, citocinas e mutações somáticas⁽⁴⁾. Esses seguem o processo do ciclo celular, onde uma célula somática duplica seu material genético e o reparte igualmente as suas células filhas. O ciclo celular é dividido em duas fases: interfase (subdividida em G1, S e G2) e mitose (M). O período que mais sofre influência de fatores extracelulares, bem como inibidores e mutações do DNA que podem bloquear a proliferação é a fase G1 da interfase. Esta fase apresenta como característica o reinício da síntese de RNA e proteínas, interrompidos na mitose, proporcionando crescimento celular⁽⁵⁾.

As atividades do ciclo celular são comandadas por ciclinas, quinases dependentes de ciclina (CDK-s) e seus inibidores⁽⁶⁾. Os controladores positivos do ciclo celular estimulam a progressão da célula no ciclo celular e são as CDKs e as ciclinas. Já os controladores negativos inativam as funções dos controladores positivos, como as CKIs (inibidores de quinase dependente de ciclina), o complexo ubiquitina e as fosfatases.

A proteína p27 é membro da família dos inibidores das quinases dependentes das ciclinas (CKI) e ela bloqueia a transição da célula de G1 para S. Ela é considerada um potente tumor supressor e há uma relação direta entre o baixo nível de p27 e a rápida proliferação em estados benignos e muito malignos⁽⁷⁾. No leiomioma uterino ela induz apoptose, reduzindo a viabilidade e proliferação das células leiomiomatosas⁽⁸⁾.

Este estudo prospectivo, randomizado e estratificado teve como objetivo verificar a expressão da proteína p27 em mioma e miométrio adjacente de mulheres com leiomiomatose uterina.

Métodos

Foram incluídas neste estudo prospectivo randomizado estratificado, 35 mulheres no período reprodutivo e perimenopausa com diagnóstico de leiomiomatose uterina, que apresentavam diagnóstico de mioma uterino através da sintomatologia clínica, do exame físico e da ultrassonografia transvaginal, no período de 2009 até fevereiro de 2010 no ambulatório de patologias uterinas benignas do Hospital Santa Casa de Misericórdia de Curitiba. Destas, 30 preencheram os critérios de inclusão, com o diagnóstico de leiomiomatose sendo comprovado pela histerectomia total abdominal e estudo histopatológico.

Os critérios de inclusão foram: mulheres com

leiomiomatose uterina em período fértil e de perimenopausa, com sintomatologia clínica, exame físico compatível e ultrassonografia transvaginal demonstrando o mioma, e mioma e miométrio adjacentes retirados através da histerectomia total abdominal e confirmados pelo estudo histopatológico. Os critérios de exclusão foram: estudo histopatológico com diagnóstico de adenomiose e miométrio escasso para estudo da expressão imunohistoquímica para p27.

As mulheres do ambulatório realizaram ultrassonografia transvaginal no Hospital Santa Casa de Curitiba para confirmar a presença de leiomiomatose uterina. O exame teve como finalidade avaliar o volume uterino, através das respectivas medidas antero-posterior, longitudinal e transversa, bem como a espessura do endométrio, volume dos ovários e localização dos miomas e suas medidas.

A mensuração do eco endometrial foi realizada, com a imagem congelada, no sentido anteroposterior, em seções longitudinais do útero, incluindo suas camadas endometriais, a partir da interface ecogênica da junção miométrio-endométrio, de um lado ao outro. Foi realizada medida, na maior espessura possível, desde a interface miométrio-endométrio da parede anterior do útero até a interface miométrio-endométrio da parede posterior.

Para o cálculo do volume uterino foi utilizada a regra: volume = comprimento x largura x diâmetro AP x 0.45 nos úteros de formato piriforme e x 0.52 nos outros formatos⁽¹⁰⁾. O exame ainda avaliou morfológicamente os ovários e o volume ovariano através das medidas no eixo longitudinal, anteroposterior e transversal⁽⁹⁾.

Os miomas e o miométrio adjacente foram obtidos da peça cirúrgica uterina que foi retirada através da técnica cirúrgica denominada de histerectomia total abdominal. O material coletado da peça cirúrgica foi adquirido da seguinte forma: incisionada uma amostra do leiomioma com miométrio adjacente, sendo a espessura de 4 a 5 mm e dimensões não maiores que 2 cm. O tamanho padrão foi de 2 x 1,5 cm.

Os blocos parafinados, relativos aos casos em estudo, foram cortados em micrótomo de parafina e os cortes de 4 micra de espessura foram estendidos em lâminas ionizadas e colocados em estufa a 30°C durante 12 horas para melhor aderência desses às lâminas.

Depois de identificadas pelo anticorpo as lâminas voltaram a estufa a 60°C por 20 min e, a seguir, foram colocadas três banhos de xilol (2 minutos cada) e em três banhos de álcool em concentrações decrescentes de 95%, 70% e 50% (2 minutos cada), conforme procedimento histotécnico usual, em temperatura ambiente. A recuperação antigênica seguiu os procedimentos descritos no data-sheet do anticorpo. Foram mergulhadas em tampão CITRATO com pH 6.0 em câmara de pressão PASCAL

Após essas etapas, as lâminas foram lavadas em água destilada, em seguida a atividade da peroxidase endógena foi bloqueada através da imersão em peróxido de hidrogênio a 3% em metanol a 70% durante 20 minutos.

Após esta etapa, as lâminas foram lavadas em água destilada e colocadas em tampão PBS pH 7,4 com TWIN 20 marca Sigma cód. P7949 para diminuir o background, foram 3 banhos de 1 minuto cada. Em seguida, os cortes foram ciclados por uma caneta hidrofóbica de marca Dako cód. S2002 para evitar que a solução com o anticorpo diluído escorresse e aplicado o anticorpo p27 (clone SX53G8) da marca DAKO cód. K004. Após 10 minutos de reação em temperatura ambiente foi aplicado o kit MACH 4 UNIVERSAL HRP-POLYME da Biocare Medical, sendo que ao fim de cada etapa as lâminas foram lavadas em tampão PBS-TWIN20.

A seguir foi adicionado o cromógeno DAB marca DAKO cód. K3466 por 30 segundos a 1 minuto em média. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água destilada e contracoradas em hematoxilina de Harris, azuladas em água corrente, desidratadas em álcool com contrações crescente 50%, 70%, 90% e PA e depois quatro banhos de xilol e finalmente montadas com goma de Damar da marca Proquímicos para fixação das lâminas e posterior observação ao microscópio óptico.

Utilizou-se o programa Microsoft Excel 2003 para arquivamento de informações e contagem de campos, assim como foi realizado o cálculo das médias variáveis apresentado no estudo. O parâmetro empregado na imunohistoquímica da expressão da proteína p27 foi a quantidade em porcentagem das células coradas e a intensidade desta coloração entre si, identificados pela coloração marrom sépia das células⁽¹¹⁾. Todas as lâminas foram analisadas no mesmo dia e por um único profissional. As análises descritivas, para as variáveis qualitativas, foram tabuladas e descritas em porcentagem.

Resultados

A média de idade das pacientes estudadas foi de 45 anos de idade. Da população em estudo, 20 (66,6%) eram branca, 8 (26,6%) negra e 2 (6,66%) parda. O número de gestações foi de 1,8 nas que relataram parto normal; 0,43 partos cesáreos, 0,4 abortamentos e uma era nulípara. O peso médio foi de 75,87kg; a altura média foi 1,62m e o índice de massa corpórea foi de 28,4.

Na população analisada o principal sintoma foi metrorragia, apresentado por 21 mulheres (70%), seguido de dor tipo cólica em baixo ventre (DTCBV), apresentado por 9 mulheres (30%). Das pacientes estudadas 26(86,6%) realizaram tratamento clínico prévio

à cirurgia e 4 (13,3%) não realizaram, sendo indicada como primeira opção de tratamento a cirurgia.

Na análise da ultrassonografia transvaginal foram avaliados os seguintes dados: a espessura endometrial, volume uterino, volume ovariano, eco textura do miométrio e tamanho do mioma com sua respectiva localização.

A espessura média do endométrio foi de 8,83mm. O volume uterino médio foi de 284,45cm³; o volume ovariano direito médio foi de 6,015cm³ e o volume ovariano esquerdo médio foi de 6,05cm³. A eco textura miometrial demonstrou que 28 (93,3%) eram heterogêneos e os demais homogêneos. O tamanho médio do leiomioma uterino ficou na média de 4,37cm. Quanto à localização do leiomioma, 6 (20%) eram intramurais, 9 (30%) submucosos, 2 (6,66%) submucoso/subseroso, 1 (3,33%) submucoso/subseroso/intramural e 3 (10%) não foi especificada a sua localização.

No método imunoistoquímico foi analisado a expressão da proteína p27 no miométrio adjacente ao leiomioma e no próprio leiomioma uterino. Ela esteve presente na amostra do miométrio em 22 (73,33%) e 7 (23,3%) se apresentaram negativo, e ainda 1 demonstrou tecido miometrial escasso. No leiomioma uterino a p27 esteve negativa em 16 (53,33%) e positiva em 14 (43,33%).

Discussão

O papel da p27 como um possível gene supressor de tumor tem sido apontado por vários investigadores⁽¹⁰⁾. Podemos dizer que a proteína p27 em leiomioma uterino induz apoptose, reduzindo a viabilidade e a proliferação de células miomatosas⁽¹²⁾.

O estudo realizado por Ramachandran et al (2008)⁽⁸⁾ teve como primeiro objetivo investigar a expressão da p27 no leiomioma uterino, de maneira a identificar os caminhos moleculares que podem ser importantes no desenvolvimento do leiomioma uterino. A expressão da p27 em miométrio normal levanta a questão da sua exclusividade no papel da leiomiomatose uterina. A possível razão para supressão da p27 no leiomioma uterino é atribuída pelos hormônios. Estrogênio participa na proliferação de células miomatosas e na supressão da expressão da p27, que tem sido elucidada em tecidos de câncer endometrial⁽⁸⁾.

A meta principal do estudo foi analisar a expressão da p27 no miométrio normal adjacente ao leiomioma e no leiomioma uterino. Encontramos que ela aparece no miométrio normal em 73,33% e no mioma em 43,33%

Embora o tema seja controverso, mulheres com IMC aumentado tem chance maior de serem portadoras de leiomiomas em torno de 2 a 3 vezes mais que as magras⁽¹³⁾. Nossos dados demonstraram que a média do IMC foi 28,4 (mulheres com sobrepeso). No entanto,

não houve um grupo controle em nosso estudo para confirmar os dados previamente citados na literatura.

A principal queixa que encontramos foi metrorragia (70%). Duarte 2000, descreveu que o excesso menstrual ocorre em 30 a 60% dos casos. A ligação casual entre leiomioma e excesso menstrual, menorragia ou hipermenorreia, parece estar relacionada à indução de anormalidades vasculares nas adjacências do tumor, inclusive no endométrio.

Kupperman et al (2004)⁽¹⁴⁾ realizaram um ensaio clínico randomizado que comparou a histerectomia com o tratamento medicamentoso na função sexual e na qualidade de vida das mulheres com sangramento uterino não responsivo a medroxiprogesterona. Após seis meses, a histerectomia foi superior em melhorar todos os parâmetros analisados e com seguimento mais longo metade das mulheres randomizadas para tratamento clínico solicitaram a realização da histerectomia. Nas mulheres neste estudo o tratamento clínico foi realizado na maioria dos casos (86,6%), mas não obteve resultado desejado; tendo como melhor resposta o tratamento cirúrgico⁽¹⁴⁾.

Na pesquisa realizada por Ramachandran et al (2008)⁽⁸⁾ revelou que a expressão da p27 é mais predominante nas células leiomiomatosas comparadas com o tecido miometrial. Assim como, já foi relatado que a p27 esta marcadamente reduzida em tumores agressivos⁽⁸⁾.

Neste estudo, percebemos que a p27 está fortemente presente no miométrio, já no leiomioma a sua expressão é menor.

Através da revisão de literatura, podemos concluir que poucos estudos foram relacionados à expressão da p27 e leiomioma uterino. Os poucos realizados demonstram a importância dessa proteína no ciclo celular bloqueando a transição de G1 para S e na leiomiomatose uterina a p27 age como um potente tumor supressor. A análise da expressão positiva da proteína p27 em nosso estudo foi menos significativa no leiomioma uterino (43,3%) do que no miométrio adjacente (73,3%).

Sendo assim, esse trabalho demonstra a necessidade de realizar novos estudos para elucidar melhor o mecanismo da p27 no leiomioma uterino, assim

como possibilitar novas estratégias em relação ao seu diagnóstico, terapêutica e prognóstico.

Referências Bibliográficas

1. Parker WH. Etiology, symptomatology, and diagnosis of uterine myomas. *Fertil Steril*. 2007; 87:725-36.
2. Schwartz SM. Epidemiology of uterine leiomyomata. *Clin Obstet Gynecol*. 2001; 44:316-26.
3. Ozols RF, Schwartz PE, Eifel PJ. Ovarian cancer, fallopian tube carcinoma, and peritoneal carcinoma. In: DeVita Jr VT, Hellman S, Rosenberg SA, eds. *Cancer: principles and practice of oncology*, 6th ed. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p.1597-632.
4. Sozen I, Arici A. Interactions of cytokines, growth factors, and the extracellular matrix in the cellular biology of uterine leiomyomata. *Fertil Steril*. 2002; 78:1-12.
5. Glover DM, Ohkura H, Tavares A. Polo kinase: the choreographer of the mitotic stage? *J Cell Biol*. 1996;135:1681-4.
6. Saito T, Nakajima T, Mogi K. Immunohistochemical analysis of cell cycle-associated proteins p16, pRb, p53, p27 and Ki-67 in oral cancer and precancer with special reference to verrucous carcinomas. *J Oral Pathol Med*. 1999; 28:226-32.
7. Machesky LM, Mullins RD, Higgs HN, Kaiser DA, Blanchoin L, May RC, Hall ME, et al. Scar, a WASp-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2/3 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:3739-44.
8. Ramachandran S, Kwon KY, Shin SJ, Kwon SH, Cha SD, Bae I, et al. Cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 controls growth and cell cycle progression in human uterine leiomyoma. *J Korean Med Sci*. 2008;23:667-73.
9. Kepple DM. Ultra-sonografia transvaginal. In: Fleischer AC, Manning FA, Jeanty P, Romero R. *Ultra-sonografia em obstetria e ginecologia*. 5^a ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2000. p.35-41.
10. Lloyd RV, Jin L, Qian X, Kulig E. Aberrant p27kip1 expression in endocrine and other tumors. *Am J Pathol*. 1997; 150:401-7.
11. McGurgan P, Taylor LJ, Duffy SR, O'Donovan PJ. An immunohistochemical comparison of endometrial polyps from postmenopausal women exposed and not exposed to HRT. *Maturitas*. 2006b; 53:454-61.
12. Slingerland J, Pagano M. Regulation of the cdk inhibitor p27 and its deregulation in cancer. *J Cell Physiol*. 2000; 183:10-7.
13. Duarte G. Doenças benignas do corpo do útero. In: Halbe HW. *Tratado de ginecologia*. 3^a ed. São Paulo: Roca; 2000. p.1273-300.
14. Kuppermann M, Varner RE, Summitt RL Jr, Learman LA, Ireland C, et al. Effect of hysterectomy vs medical treatment on health-related quality of life and sexual functioning: the medicine or surgery (Ms) randomized trial. *JAMA*. 2004; 291:1447-55.

Trabalho recebido: 02/01/2013

Trabalho aprovado: 15/04/2013